

稀貴 樹種 산개나리의 器內 繁殖¹

文興奎 · 石眞瑛 · 金善昌²

Micropropagation of a Rare Species, *Forsythia saxatilis* N. through Tissue Culture¹

Heung Kyu Moon, Gene Young Suk and Sun Chang Kim²

요 약

희귀 수종인 산개나리(3년생)의 신초지 액아를 배양하여 식물체를 유도하였다. 효과적인 증식법 구명을 위해 MS 배지에서 세 가지 사이토키닌(BAP, kinetin, zeatin)의 농도별 효과를 조사하였다. 증식은 식물 생장조절 물질이나 농도별 효과가 뚜렷하지 않았으나 zeatin 처리시 줄기 및 잎의 발달에 효과가 있었다. kinetin 처리는 줄기 생장과 더불어 모두 발근되는 특징을 보였고, BAP와 zeatin은 발근은 가능하나 고농도로 갈수록 발근율이 감소하였다. 황화처리는 줄기의 생장을 촉진하였다. 줄기는 3년 이상의 계대배양 후에도 정상적인 증식이 가능했다. 발근된 식물체는 인공 배양토에서 100% 활착되었으며 신지에 이식하여 정상 생장하였다. 이상의 결과는 희귀 수종인 산개나리의 기내 번식으로 자생지의 복원이 가능함을 시사한다.

SUMMARY

Axillary bud explants from 3-year-old seedlings of *Forsythia saxatilis* N., rare and endangered species in Korea, were cultured on Murashige and Skoog's medium. The effect of various cytokinins (BAP, kinetin, and zeatin) at the different concentration(0.2, 0.5 and 1.0mg/L) was tested. Although an apparant shoot proliferation was not observed, zeatin showed slight promotional effect on normal shoot and leaf development. Both shoots and adventive roots could be induced simultaneously when the explants were cultured on the medium with kinetin, but adventive rooting was gradually reduced according as BAP and zeatin concentrations increased. Axillary shoot growth was promoted by the etiolation treatment. Shoot proliferation has been maintained more than three years with consecutive subculture. Rooted plantlets were successfully acclimatized in the artificial soil mixture and showed normal growth after transplantation into field.

Key words : One step micropropagation, Cytokinin effect

서 론

최근 급속한 산업 발달과 대기오염 물질의 증대는 생태계의 심각한 파괴를 야기시키고 있으며, 이로 인해 유용한 식물 자원의 소실이 가속화되고 있다(박용구, 1993; 조재명, 1994). 산개

나리는 우리 나라의 북한산, 관악산 및 수원의 화산에만 국부적으로 분포하며 오늘날에는 자생지가 파괴되어 멸종 위기 식물로 적극적인 보존이 요구되는 특산 수종이다(김용식과 김태욱, 1990; 이창복, 1990; 임업연구원, 1996).

조직배양 기술은 각종 병해충, 자연의 재해 혹은 인간의 활동에 의한 파괴로부터 보존 가능한

¹ 接受 1997年 7月 10日 Received on July 10, 1997.

² Forest Genetics Research Institute, Forestry Administration, Suwon 441-350, Korea

수단이 되며, 배양된 개체들은 세포, 체세포배, 줄기 등의 형태로 유지될 수 있고, 저온 저장, 초저온 저장 등의 방법으로 장기간의 보존도 가능하여 유용한 유전자원이나 희귀, 멸종 위기 식물의 보존 및 증식에 매우 유용한 도구가 될 수 있다(Bhojwani and Arumugam, 1983; 윤 양 등, 1992; 김찬수 등, 1993). 산개나리가 속한 물푸레나무과의 몇 수종에 대한 기내배양 결과가 발표된 바 있고(Browne and Hicks, 1983; Bulard and Monin, 1963; Einset and Alexander, 1985; Heiman and Preece, 1983; Preece et al., 1988; Wolter and Skoog, 1966), Bader 등(1982)은 *Forsythia suspensa*의 캘러스배양으로 해부학적 미세구조의 관찰을 보고하고 있으나, 산개나리에 대한 기내 번식 결과는 아직 발표된 바 없다. 본 연구는 멸종 위기에 달한 산개나리의 효율적인 기내 번식이 가능하였기에 보고한다.

재료 및 방법

임업연구원 광릉 수목원에서 3년생 산개나리 몇 본을 분양 받아 임목육종연구소의 구내 온실에서 생육시켰다. 3월 초순 신초지가 10~30cm까지 자랐을 때 절간액아를 절편체로 사용하였다. 신초 줄기는 액아가 1~2개 정도 붙도록 2~4cm 길이로 절단한 다음 tween 20 용액을 몇 방울 넣어 거품을 내었다. 다음 수돗물로 몇 차례 헹구어 거품을 완전히 제거하고, 무균대에서 70% ethanol에 시료가 잠기게 넣고 약 30초간 1차 표면 소독을 하였다. 마지막으로 2% 차아염소산나트륨 용액으로 15분 동안 소독하고 멸균수로 3회 씻어 내었다. 그 후 멸균수에 30분 동안 침지한 후 배지에 치상하였다.

MS(Murashige and Skoog, 1962) 배지를 기본으로, 생장 조절 물질로는 세 가지 사이토키닌(kinetin, BAP, zeatin)을 각각 0.2, 0.5, 1.0 및 3.0mg/L로 첨가하였다. 절편체는 처리구당 15~20개씩 사용하였다. 배지의 pH는 5.8로 조절하고, 0.2% gelrite로 경화하였다. 배지는 유리 시판관(2×15cm)에 8ml씩 분배한 후 알루미늄 호일로 봉하고 15기압, 121℃로 15분간 고압 멸균하여 사용했다. 적정배양 조건하에서 16시간의 일장으로 조명하였다. 배양 후 4~6주 사이에 성적을 조사하였다.

결과 및 고찰

배양 일주일 후에는 절편체의 기부가 부풀어오르고 액아에서 줄기 생장이 관찰되었다. 초기의 줄기 생장은 식물 성장조절 물질의 종류나 농도에 따라 큰 차이를 보이지 않았고, 절편체에 따른 차이가 생장에 영향을 주는 것으로 나타났다. 절편체의 직경이 비교적 크고 단단한 것에서 줄기발생이 양호하였는데 이것은 표면소독시의 약해를 적게 받고, 절편체 자체의 생리적 상태가 양호하였기 때문으로 추측된다. 액아에서 줄기가 생장하는 절편체의 기부는 예외없이 직경 0.3~0.5mm의 캘러스가 형성되었다. 캘러스는 모든 처리구에서 고농도로 갈수록 크게 형성되었고, 특히 zeatin의 처리시 가장 크게 형성되었다. 이러한 캘러스는 배양중 양료 및 식물생장 조절물질의 저장 기능을 담당하는 것으로 보고되고 있는데(San-Jose et al., 1985), 이 때문에 줄기의 건전한 생장과 연속 증식을 위해 캘러스와 조금 붙여 계대배양하는 것이 바람직하였다. 다경줄기의 형성은 싸이토키닌의 종류에 따라 두드러진 효과는 나타나지 않았으나, zeatin 처리구에서 다소 양호하게 관찰되었고, 잎과 줄기의 생장도 비교적 양호했다. 다경줄기는 주로 절편체의 기부에 있는 액아에서 유래하였다. 줄기는 1~2개의 우세줄기로 자라면서 또다른 줄기가 기부에서 발생하였는데, 배양 4주에도 잎의 고사나 정단부의 괴저는 나타나지 않았다.

이 수종의 기내배양에서 특이한 것은 줄기의 증식과 함께 직접 발근되는 점이었다(Fig. 1A). 부정근은 배양 2주 후 부터 형성되어 호르몬 무처리에서 95% 형성되었고, kinetin의 처리는 농도에 관계없이 뚜렷한 촉진 효과를 보여 4주 후에는 100% 발근되었다(Table 1). BAP는 0.2mg/L 처리시는 83.3%까지 발근되었으나 고농도로 갈수록 저조하였고, zeatin은 0.5mg/L 까지는 33.3% 발근되었으나 1.0mg/L 이상에서는 전혀 발근되지 않았다.

일반적으로 발근유도는 오옥신의 처리 특히 IBA나 NAA의 처리로 이루어지고 싸이토키닌의 처리는 발근을 억제시킨다. 그러나 조직배양에서 발근은 싸이토키닌의 antagonist에 의해 억제되므로 소량의 싸이토키닌 처리는 발근에 유리하게 작용한다. 이를테면 처리된 싸이토키닌은 오옥신

과 싸이토키닌의 비에 따라 발근을 촉진시킬 수 있다(Skoog et al., 1973). 이같은 결과는 여러 식물에서 관찰되었는데 *Brassica campestris*에서는 0.1mg/l BA와 1mg/l NAA를 처리하여 발근시켰고(Kuo and Tsay, 1977), 딸기에서는 0.2mg/l BA+0.2mg/l NAA를(Kartha et al., 1980), 콩에서는 0.43mg/l kinetin+2mg/l NAA를 첨가하여 발근을 유도하였다(Evans, 1981). 목본류에 있어서도 Whitehead와 Giles(1977)는 양버들 등 포플러류의 기내발근에서 0.01mg/l BA+0.01mg/l NAA를 처리하여 발근시킨 바 있다. Kuo와 Tsay(1977)는 싸이토키닌과 오옥신의 처리 비율이 1이하 일 때 발근이 잘 된다고 하였는데, 싸이토키닌의 처리로 오히려 발근이 촉진되는 것은 절편체의 내생 성장조절물질과의 상호작용에서 어떤 상승효과가 발근에 유리하게 작용하였기 때문으로 추측된다. 그러나 특정한 싸이토키닌이 어떻게 발근에 영향하는지의 연구는 매우 미약하다. 본 실험에서는 kinetin의 효과가 현저하였는데, 이러한 결과는 대상 수종에 따라서는 싸이토키닌의 처리가 발근을 촉진함을 시사해주는 것이다. 한편 뿌리는 대체로 배지 속으로 내리지만, 줄기 절편에서 직접 형성되어 배지 속으로 들어가는 것도 관찰되었다. 대체로 절편당 2~4개의 뿌리를 내렸는데, kinetin 처리시는 1차근과 함께 측근의 형성도 양호하였다.

액아 배양의 일반적인 방법은, 1)액아로부터 줄기발생, 2)줄기증식, 3)발근의 3단계 과정으로 식물체 재생이 이루어지는데, 이 수종은 1단계의

배양으로 완전한 식물체 유도가 가능하여 산개나리의 기내 번식법이 매우 효율적임을 시사해 준다. 최근 Herrera 등(1990)도 *Digitalis thapsi*의 정아 배양에서 1단계의 배양으로 다경유도 및 발근을 얻어 본 실험과 비슷한 결과를 보여 주었다. 황화 처리(etiolation)는 기내배양된 산개나리의 줄기 신장에 매우 효과가 있었다(미발표 자료). 황화처리는 동일한 배양 조건에서 배양 용기를 검은 비닐로 싸서 빛을 완전히 차단하여 배양하였다. 2~3주간 배양된 황화 처리된 줄기는 4~7cm로 정상 배양된 줄기보다 2~3cm 절간이 길었으며, 성장도 빠르게 이루어졌다. 때문에 정상 조건에서 배양하는 것보다 배양 주기를 단축시킬 수 있는 장점이 있었다. 황화처리된 줄기는 잎이 비교적 작고, 줄기가 가늘며 연녹색을 띠었으나 정상 조건에서 다시 배양하면 성장에는 전혀 문제가 없었다.

초대 배양으로 얻어진 줄기는 절간 액아를 재료로 증식을 감소없이 3년 이상 계대배양이 가능하였는데, 이것은 기내 번식은 물론 재료의 장기 저장도 가능함을 시사해준다.

발근된 개체는 인공 배양토(peatmoss : vermiculrite : perlite, 1 : 1 : 1 v/v/v)에 이식하여 온실에서 환경 순화하였다. 4주 후 100% 활착되었고, 8주 후에는 묘고 20cm 내외로 성장하였다. 그 후 이 개체들은 산지에 이식하여 2년 이상 정상 성장을 보였다(Fig. 1B). 이상의 결과로 볼 때 산개나리의 기내 증식은 zeatin의 처리가 양호하다고 생각되며, kinetin은 줄기 성장과 동시

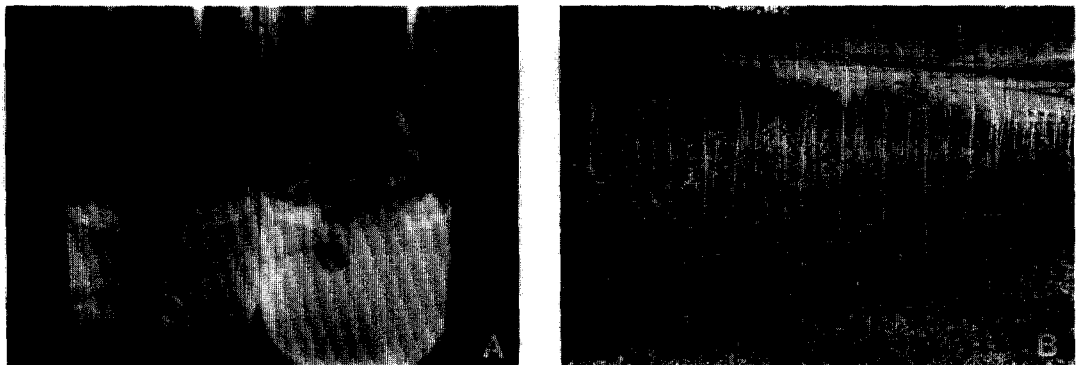


Fig. 1. Micropropagation and field performance of *Forsythia saxatilis* N.

A - Shoot development and direct rooting from primary explants.

B - Field growing plantlets derived through axillary bud culture. The plants are survived well and growing more than two years.

Table 1. Effect of cytokinins on shoot proliferation and adventive rooting of *Forsythia saxatilis*

Media mg/l	No. of shoots	Shoot length, cm	Rooting, %
MS control	1.0	0.6±0.4*	95.0
KN 0.2	1.3	1.7±0.4	100
0.5	1.1	2.4±0.6	100
1.0	1.1	2.1±0.7	100
3.0	1.1	1.9±0.8	100
MS+BA 0.2	1.0	2.0±0.6	83.0
0.5	1.8	1.9±0.4	33.0
1.0	1.5	1.9±0.8	17.0
3.0	1.5	1.5±0.7	17.0
MS+ZN 0.2	1.7	2.2±1.3	33.0
0.5	2.2	2.4±0.6	33.0
1.0	2.3	2.0±0.6	0.0
3.0	2.0	2.0±1.3	0.0

* Mean±standard deviation

에 높은 발근력을 보이므로 식물체 재생의 효율을 가져 올 수 있을 것으로 사료된다. 다경줄기는 peat plug를 이용한 기외 삽목법도 효과적인 것으로 사료되며(문홍규 등, 1993), 재생된 식물체의 환경 순화 및 토양 활착은 거의 문제가 없으므로 기내 번식에 의한 산개나리의 자생지 복원이 가능할 것으로 기대된다.

인용문헌

1. 김용식·김태욱, 1990. 한국산 회귀 및 멸종위기 식물의 보존과 식물원 및 수목원의 역할. 서울대 농대 연구보고 15 : 33-47
2. 김찬수·고정근·조리명, 1993. 왕벚나무 (*Prunus yedoensis* M.)의 영양아를 이용한 식물체 대량 증식에 미치는 배지, 식물 생장 조절 물질 및 암처리 효과. 식물조직배양 학회지 20 : 213-219.
3. 문홍규·윤 양·손성호·이석구·이재선, 1993. 상수리나무 기내배양에서의 pulse 처리에 의한 줄기 증식 및 peat plug를 이용한 참나무류 기내 줄기의 기외삽목. 한임지 82 : 221-226.
4. 박용구, 1993. 삼림자원의 보존과 개발전략. 한국식물학회 심포지움 pp.59-83.
5. 이창복, 1990. 멸종위기 식물의 보존. 관악수목원 연구보고, 3 : 190-196

6. 임업연구원, 1996. 회귀 및 멸종위기 식물, p.140
7. 윤 양·이석구·박재인, 1992. 회귀 수종인 망개나무의 기내 증식. 임육연보 28 : 63-67.
8. 조재명, 1994. 지구 환경변화에 대한 삼림연구 분야 대응 전략. 포플러 11 : 6-19.
9. Bader, S.M., D. Cachitz-Cosma, and C. Craciun, 1982. Ultrastructure of *Forsythia suspense* callus cells obtained from young shoot culture. pp.47-48.(In) Fujiwara(ed.), Plant Tissue Culture 1982. Proc. 5th. Int. Cong. Plant Tiss. Cell Cult., Japan. Jap. Assoc. Plant Tissue Culture ; Tokyo
10. Bhojwani S.S. and N. Arumugam, 1983. *In vitro* Propagation and Conservation of Some Endangered Medicinal Species of India. Advances in Development Biology and Biotechnology of Higher Plants. Korean Soc. Plant Tissue Culture. pp.110-127
11. Browne R. and G. Hicks, 1983. Development *in vitro* of white ash buds. Ann. Bot. 52 : 101-104
12. Bulard C. and J. Monin, 1963. Etude du compositement d'embryons de *Fraxinus excelsa* L. prélevés dans des graines dormantes et cultivés *in vitro*. Phytton, 20. pp.115-125
13. Einset J.W. and J.H. Alexander, 1985. Multiplication of *Syringa* species and cultivars in tissue culture. Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc. 34 : 628-636
14. Evans, D.A, 1981. Soybean tissue culture. Soybean Genetics Newsletter 8 : 27-29.
15. Heiman P.J. and J.B. Preece, 1983. Aseptic micropropagation of *Fraxinus pennsylvanica* Marsh and *Fraxinus americana* L. utilizing shoot tip explants. HortSci, 18 : 616
16. Herrera, M.T., M. Cacho, M.P. Corchete, and J. Fernandez-Tarrago, 1990. One step shoot tip multiplication and rooting of *Digitalis thapsi* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 22 : 179-182.
17. Kartha, K.K., N.L. Leung, and K. Pahl, 1980. Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. J. Am. Soc. Hort. Sci. 105 : 481-484.

18. Kuo, C.G. and J.S. Tsay. 1977. Propagation of Chinese cabbage by axillary bud culture. Hort. Sci. 12 : 459-460.
19. Murashige T, and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15 : 473-497
20. Preece J.E., P.H. Christ, L. Ensenberger, and J.L. Zhao. 1988. Micropropagation of ash(*Fraxinus*). Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc. 37 : 366-372
21. San-Jose, M.C., A.M. Vieitez, and E. Vieitez. 1985. In vitro establishment and multiplication of shoot cultures of *Quercus* genus. Phyton 45 : 31-40.
22. Skoog, F., R.Y. Schmitz, R.M. Bock, and S.M. Hechat. 1973. Cytokinin antagonists : synthesis and physiological effects of 7-substituted 3-methylpyrazolo(4,3-d) pyrimidines). Phytochem. 12 : 25-37.
23. Whitehead, H.C.M., and K.L. Giles. 1977. Rapid propagation of popalars by tissue culture methods. N.Z.J. For. Sci. 7 : 40-43.
24. Wolter K.E. and F. Skoog. 1966. Nutritional requirements of *Fraxinus* callus cultures. Am. J. Bot. 53 : 263-269