

## 액아배양에 의한 희귀 수종 미선나무의 기내번식

문홍규\* · 석진영 · 권영진 · 손성호  
임업연구원 임목육종부 생물공학과

### Micropropagation of a Rare Species, *Abeliophyllum distichum* Nakai. via axillary bud culture

MOON, Heung Kyu\* · SUK, Gene Young · KWON, Young Jin · SON, Sung Ho

Division of Biotechnology, Forestry Research Institute, Forestry Administration

P.O. Box 24, Suwon 441-350, Korea

**ABSTRACT** Different kinds of cytokinins and auxins were tested for both shoot induction and rooting in a rare species, *Abeliophyllum distichum* Nakai. BA in WPM medium was the most effective in shoot induction, whereas zeatin seemed to be the most suitable for shoot elongation. Kinetin, at the concentration of 2.0~5.0 mg/L showed an effect in shoot induction, but the effect was inferior to BA and zeatin. Rapid shoot elongation could be achieved when the cultures were maintained on the diffuse light condition (below 500 lux) regardless of cytokinin treatments. For *in vitro* rooting, IBA was investigated as the best type of auxin tested when half strength GD medium was incorporated. The frequency of rooting using the plant growth regulator and medium just mentioned above was revealed as approximately 90%. In addition, the survival rate of rooted plantlets was almost 100% in an artificial soil mixture.

**Key words:** Endangered species, multiplication and rooting, cytokinin and auxin effect

## 서론

최근 급속한 산업 발전과 인구 증가는 여러 가지 해로운 공해 물질을 방출하여 자연 생태계의 파괴를 가속화시키고 있다. 자연 생태계의 보존 및 복구, 그에 대한 전략수립을 위해 최근 브라질의 리우에서 환경과 개발에 관한 리우선언을 하기에 이르렀고 1992년에는 국제자원연구소 (WRI: World Resources Institute), 국제자원보존연맹 (IUCN: The International Union for Conservation of Nature and National Resources) 및 유엔환경기구 (UNEP: United Nations Environment Programme)가 공동으로 생물다양성의 보존전략을 밝힌 바 있다. 국내에서는 1979년 자연보호 중

양협의회가 결성되어 범국민적인 자연보호 활동이 활발하게 이루어지고 있지만 아직은 전문적인 기관이나 보호시설, 보호법 등이 확실히 이행되고 있지 않아 생물종의 보존 및 복구를 위한 여러 가지 제약을 받고 있다 (Woo 1990; Lee 1990).

ICUN에 따르면 서력 2000년까지는 30만 식물 중 가운데 2만 종 이상이 멸종되거나 멸종위기에 처할 것이라 하며, Melville (1970)와 Molt (1989)는 약 9000종에 달하는 야생 식물 종이 멸종위기에 처해 적극적인 보존이 필요하다고 하였다.

미선나무는 물푸레나무과에 속하며 충북의 진천과 괴산에서 자라는 낙엽 활엽 관목으로 높이가 1.5 m에 달한다. 세계적으로 1속 1종밖에 없는 희귀종이며 천연기념물 제147, 220, 221호로 지정, 보호되고 있을 정도로 극히 한정된 일부 지역에서만 생육하는 대표적인 희귀 수종의 하나이다 (Lee 1976: 1990).

조직배양법은 희귀 및 멸종위기 수종에 대한 유전자원 보

\*Corresponding author. Tel 0331-290-1199

E-mail jesusmhk@ppp.kornet21.nm.kr

존과 번식에 매우 효율적인 수단이 되고 있으며 몇 가지 수종에 대한 기내배양 결과가 발표된 바 있으나 (Miller 1993; Youn et al. 1992; Moon et al. 1997; Withers 1991) 미선나무에 대한 조직배양 결과는 아직 이루어지지 않았다. 본 연구는 액아배양을 통해 미선나무의 기내번식이 가능하였기에 보고한다.

## 재료 및 방법

충북 진천 과산에서 수집하여 임업연구원 임목육종부의 구내에 이식하여 자라는 약 15년생 되는 미선나무 개체를 공시목으로 사용하였다. 5월 중순 신초지가 5~15 cm까지 자랐을 때 절간 액아를 수집하여 이를 약 4 cm 내외의 절편으로 조제한 후 기존의 보고된 방법 (Moon et al. 1997)으로 표면소독 하였다. 줄기 유도는 MS 배지 (Murashige and Skoog 1962)에 BA, kinetin 과 zeatin을 1.0, 2.0 및 5.0 mg/L 농도로 첨가하여 처리 당 30개씩의 절편을 사용하였다. 발근 유도를 위해서는 1/2 MS와 1/2 GD (Gresshoff and Doy 1972) 배지에 IBA와 NAA를 각각 0, 0.2, 0.5 및 1.0 mg/L 첨가하여 처리 당 2 cm 이상 되는 줄기 20개를 치상하였다. 배지의 조제 및 배양조건은 상용의 방법으로 하였다.

발근된 개체는 인공배양토 (peatmoss:perlite:vermiculite =1:1:1, v/v) 가 담긴 7 × 11 cm의 비닐 포트에 옮겨 온실에서 충분히 관수하며 2주간 환경순화시켰다. 순화되어 토양에 활착된 묘목은 보다 큰 비닐 포트에 옮겨 차후의 생장을 관찰했다.

## 결과 및 고찰

### 액아 배양에 미치는 사이토키닌의 효과

배양 1주 후부터 액아에서 줄기의 생장이 시작되었다. 줄기의 성장과 함께 절편의 기부가 부풀어 오르고 점차 캘러스화되어 자랐다. 증식에는 BA가 가장 효과적이었으나 다경 줄기는 절편당 3개 미만으로 형성되었다 (Table 1). 다경 줄기는 주로 절편 하부의 액아에서 형성되었으며 (Figure 1A), 다경 줄기가 없는 것은 하나의 우세줄기만으로 자랐다. Zeatin과 kinetin의 처리시 정아우세 현상이 심하게 나타났으며 BA 처리시에는 절편하부의 액아에서 유래되는 다경줄기의 생장으로 인해 정아우세가 뚜렷하지 않았다. 대부분 처리에서 줄기의 생장은 비교적 느리게 이루어 졌다. Zeatin 처리시는 BA보다 다경유도는 저조하였으나 비교적 줄기의 생장이 양호하여 어느 농도에서나 평균 2 cm 이상의 줄기 생장을 나타냈다 (Table 1). Zeatin 처리가 다경 줄기 형성에는 효과가 없는 것으로 나타났으나 줄기의 길이 생장이 양호함으로 절간 마디

의 액아를 다시 절편으로 이용하여 대량증식을 할 수 있는 가능성을 암시하였다. 그러나 줄기 생장이 동일한 성장호르몬의 조건에서도 시료로 사용된 절편에 따라 차이가 심하게 나타남으로, 시료의 성숙단계, 채취위치 등에 관한 연구가 필요할 것으로 생각되었다. 줄기의 성장과정에서 유리화나 정단괴저 (apical necrosis)는 심하지 않았다. 그러나 BA의 처리시에는 절편의 기부에서 유래된 줄기에서 배양 3주 후부터 정단괴저가 일부 관찰되었다. 액아 배양시에 나타나는 정단괴저의 원인으로 칼슘의 결핍, 정아 (apical bud)로의 칼슘 분배 부족, 과습으로 인한 통기성 불량 등이 원인으로 보고된 바 있다 (Sha et al. 1985). 그러나 이 수종의 증식과정에서 나타나는 정단괴저는 발생빈도가 BA 처리시에도 20% 미만으로 나타나고 또한 정단괴저로 정아가 고사되면 줄기하부의 액아에서 새로운 줄기의 발생이 이루어지기 때문에 증식상의 큰 문제는 되지 않았다. Kinetin의 경우 다른 사이토키닌에 비해 다경 유도와 줄기 생장이 저조했다. 또한 절편기부에 형성되는 캘러스의 형성이나 성장도 미약했다. 여러 활엽 수종의 기내배양에서 절편기부에 형성되는 캘러스는 절편의 양료 및 성장호르몬의 저장 기능을 담당하는 것으로 보고되고 있다 (Vieitez et al. 1989). 따라서 증식과 더불어 절편 기부에 어느 정도의 캘러스가 형성되는 것은 증식상 바람직하다고 생각되나 미선나무 액아배양에서 kinetin의 처리는 캘러스의 형성에 부적당했고 결국 액아로부터 줄기 발생에 크게 기여하지 못하는 것으로 사료된다. 절편 기부에서 캘러스의 형성은 5 mg/L zeatin 처리시에 가장 현저하였다. 한편 배양 과정에서 빛의 세기 (light intensity)가 줄기의 생장에 크게 영향을 미치는 것으로 관찰되었다. 500 lux 정도의 약광 하에서 배양하면 생장조절물질의 처리에 관계없이 줄기생장에 뚜렷한 효과를 나타냈다 (결과 미제시). 또한 약광 하에서 배양하면 배양 4주 후에도 신초지의 정단괴저가 거의 관찰되지 않고 절간 조직의 생장이 좋았다. 이 수종을 정상조건에서 배양하면

**Table 1.** Effect of cytokinins on shoot proliferation of *Abeliophyllum distichum*.

Cytokinins (mg/L)	Mean no. of shoot induced	Shoot length (cm)	Callus formation at basal part of explant
zeatin	1.0	2.1 ± 0.8 <sup>a</sup>	+ <sup>b</sup>
	2.0	2.3 ± 1.7	++
	5.0	2.3 ± 1.6	+++
kinetin	1.0	0.9 ± 0.3	+
	2.0	0.8 ± 0.3	+
	5.0	0.7 ± 0.4	+
BA	1.0	1.1 ± 0.7	++
	2.0	1.0 ± 0.6	++
	5.0	0.7 ± 0.3	+

<sup>a</sup> Mean ± standard deviation.

<sup>b</sup> +; small (> 0.2 cm in diameter), ++; moderate (0.2~0.4 cm), +++; large (<0.4 cm).

절간 생장이 매우 느린 점을 감안 할 때 이식 가능한 줄기의 연속생산을 위해서는 약광 하에서 배양을 고려함이 좋다고 생각된다. 약광 하에서도 잎은 진녹색을 띠었으며 외견상 생장에 큰 문제가 없었다.

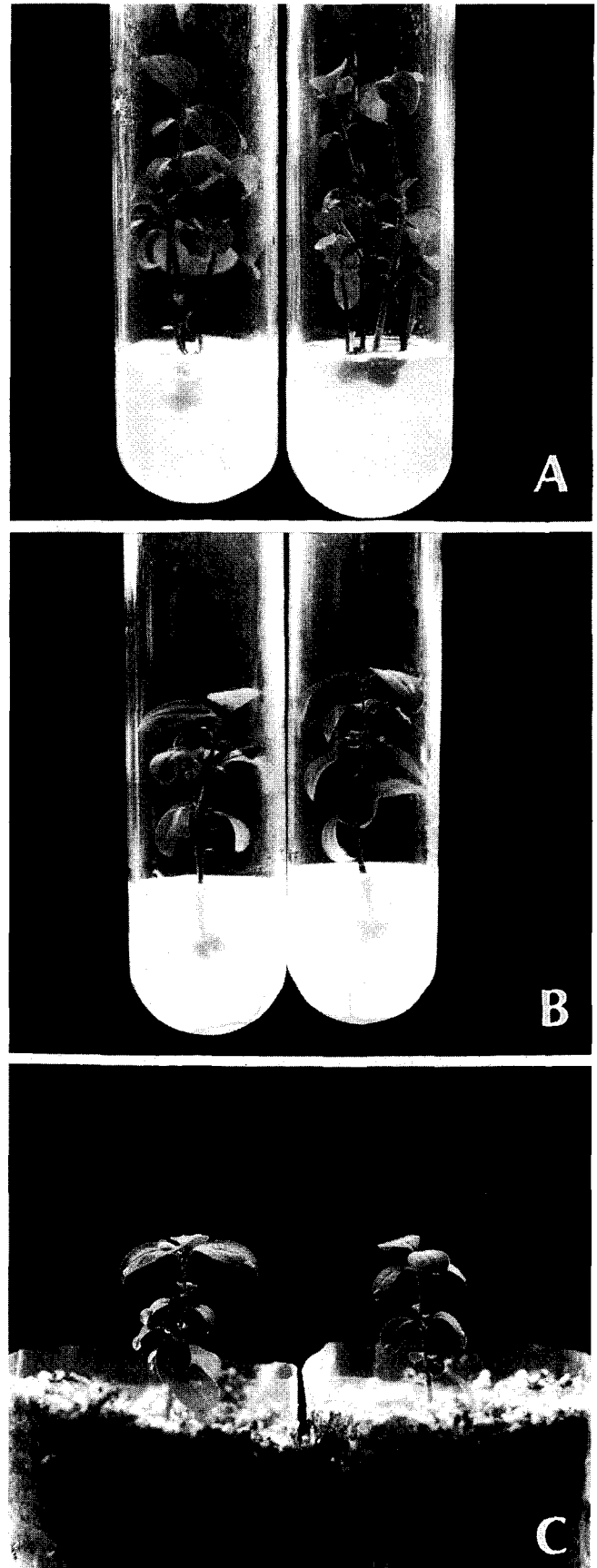
#### 발근에 미치는 배지 및 옥신의 효과

발근은 1/2 GD 및 1/2 MS 배지에 여러 농도의 IBA와 NAA를 첨가하여 비교하였다. 발근율은 IBA가 첨가된 1/2 GD 배지에서 90% 이상으로 가장 양호했다 (Table 2). 발근은 주로 절편기부가 부풀어 캘러스가 형성된 다음 이루어졌다 (Figure 1B). 그러나 절편에 따라서는 줄기에서 직접 뿌리가 형성되어 배지 속으로 들어가는 것도 있었다. 유도된 뿌리는 1차 근으로 2~3개씩 내렸으나 NAA가 처리된 1/2 MS 배지에서는 1차 근의 수가 특히 저조했다. 대체적으로 IBA 처리는 세근의 형성을 촉진한 반면 NAA 처리는 1차 근으로만 굵은 뿌리를 형성했다. 뿌리의 빛깔은 IBA 처리시는 초록색을 띠고, NAA 처리시는 흰색으로 나타남이 관찰되었다. 이것은 각각의 호르몬이 식물에 영향을 주는 생리적 작용과 그 활성도의 차이 때문으로 생각된다. IBA는 NAA보다 빛에 불안정하여 쉽게 분해되므로 활성이 빠르게 감소하고 일단 뿌리가 유도된 다음에는 일찍 광합성 작용을 하여 뿌리가 녹색을 띠는 것으로 추정된다. 발근시에도 거의 예외 없이 절편기부에 캘러스가 형성되었는데 이러한 캘러스 형성은 1/2 MS 배지보다 1/2 GD 배지에서 더 현저하였다. 뿌리는 NAA 0.2 mg/L 첨가한 1/2 GD 배지에서 평균 3.2개로 그 수가 가장 많았으나 발근율과 유도된 뿌리수를 감안하면 IBA가 처리된 1/2 GD 배지가 미선나무의 기내 발근에 적합한 것으로 보인다 (Table 2).

**Table 2.** Effect of media and auxins on rooting of *in vitro* shoots.

Media and auxins (mg/L)	Mean no. of roots induced <sup>a</sup>	Rooting rate (%)	
1/2 MS	IBA 0.0	2.7	30.0
	0.2	1.4	10.0
	0.5	1.8	20.0
	1.0	2.3	20.0
	NAA 0.2	1.1	50.0
	0.5	1.0	40.0
	1.0	1.0	30.0
	1/2 GD	IBA 0.0	2.3
0.2		2.4	100.0
0.5		2.7	90.0
1.0		3.1	100.0
NAA 0.0		3.2	80.0
0.5		2.1	70.0
1.0		2.2	70.0

<sup>a</sup>The values were calculated by averaging 20 replica from 2 different experiments.



**Figure 1.** A: Multiple shoots induced from the bottom part of the explants. B: *In vitro* rooting from stem cuttings and/or inter node of multiple shoots. C: Acclimatized plants in vinyl pot after two weeks of transplanting.

## 풋트묘 육성

발근된 식물체는 인공배양토 (peatmoss:perlite:vermiculite =1:1:1, v/v)에 이식하여 온실에서 2주간 순화시킨 결과 100% 활착 되었다 (Figure 1C). 이 식물체는 2개월 후 묘고 15 cm까지 성장하였으며, 개체에 따라서는 사립생장 (plagiotropism)도 나타냈으나 대부분 정상 성장에는 문제가 없었다.

## 적 요

미선나무의 기내번식을 위하여 MS 배지에 세 가지 사이토키닌 (zeatin, kinetin 및 BA)을 세 가지 농도로 처리하여 액 배양을 실시하였다. 줄기유도는 BA가 가장 효과적이었고, 생장은 zeatin이 좋았다. Kinetin은 2.0 및 5.0 mg/L 처리에서 줄기발생 효과가 있었으나 그 효과는 zeatin, BA에 비해 저조했다. 500 lux 정도의 약광 하에서 배양은 사이토키닌 처리에 관계없이 줄기의 성장을 촉진하였다. 발근은 IBA가 첨가된 1/2 GD 배지에서 주효했다. 발근된 개체는 인공배양토에서 100% 활착되었고, 정상 생장이 가능했다. 이상의 결과에서 미선나무의 기내 번식이 가능함을 보여 주었다.

## 인용문헌

- Gresshoff PM, Doy CH (1972) Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). Plant (Berl.) 107:161-170
- Kim CS, Koh JG, Cho RM (1993) Effect of media, growth regulators and dark treatment on *in vitro* propagation using vegetative buds of *Prunus yedoensis* M. Kor J Plant Tiss Cult 20:213-219
- Lee TB (1976) Studies on conservation of endemic species-*Abeliophyllum distichum* N. Nature Conservation 12:6-10
- Lee TB (1979) Illustrated flora of Korea. Hyangmun Press
- Lee TB (1990) Conservation of threatened plants in Korea. Bull Kwanak Arboretum 3:190-196
- Melville R (1970) Red data book. Vol 5. Angiospermae. ICUN Morges
- Miller CI (1993) Conservation of germplasm in forest trees. In: Ahuja MR, Libby WJ (eds). Clonal Forestry II: Conservation and Application, pp 42-65. Springer-Verlag Berlin
- Molt C (1989) Blueprint for conserving plant diversity: How to maximize genetic diversity among rare and endangered plants. Bioscience 39:364-368
- Moon HK, Suk GY, Kim SC (1997) Micropropagation of a rare species, *Forsythia saxatilis* N. through tissue culture. J Kor For Soc 86:430-434
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497
- Sha L, McCown BH, Peterson LA (1985) Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot culture. J Amer Soc Hort Sci 110:631-634
- Vieitez AM, Sanchez C, San-Jose C (1989) Prevention of shoot-tip necrosis in shoot culture of chestnut and oak. Sci Hort 41:151-159
- Withers LA (1991) Biotechnology and plant genetic resources conservation. Reprinted from the book of Plant Genetics Resources Conservation and Management, pp 273-297
- Woo BM (1990) Designation and conservation of the protected areas. Res Bull Seoul Nat'l Univ Forests No 26:68-86
- Youn Y, Lee SK, Park JI (1992) *In vitro* propagation of a rare species-*Berchemia berchemiaefolia*. Res Rep For Gen Res Inst Kor 28:63-67

(접수일자 1999년 3월 24일)