

## Thidiazuron 처리에 의한 히어리나무의 기내번식

강효진, 문흥규\*, 이재선<sup>1</sup>

임업연구원 생물공학과, <sup>1</sup>강원대학교 산림자원학부

### Micropropagation of *Corylopsis coreana* by Thidiazuron Treatment

Hyo-Jin Kang, Heung-Kyu Moon\*, Jae-Seon Yi<sup>1</sup>

Division of Biotechnology, Forestry Research Institute (KFRI), 44-3, Omokdong, Suwon, Gyeonggido 441-350, Korea

<sup>1</sup>Division of Forest Resources, College of Forest Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

**ABSTRACT** This study was conducted to evaluate the effect of thidiazuron (TDZ) on shoot proliferation and growth from axillary buds of 2-year-old *Corylopsis coreana*. Shoots proliferation was effectively achieved on WPM (Woody Plant Medium) supplemented with 0.03-0.1 mg/L TDZ. The highest shoot number ( $6.5 \pm 0.7$ ) was obtained on 0.1 mg/L TDZ treatment. On the TDZ medium shoots formed as clusters less than 1 cm in height and therefore needed to subculture on GA<sub>3</sub> containing medium to induce elongation. In consecutive cultures, phenolic compounds were excreted at the proximal part of the explants and inhibited growth of the explants. Growth inhibition by the compounds was overcome using liquid and paper bridge culture system. About 60% of the elongated shoots rooted on half-strength MS medium containing IBA. Generally, IBA was more effective on *in vitro* rooting than NAA with optimal range of 0.5 mg/L to 1.0 mg/L. Rooted plantlets were transferred in an artificial soil (vermiculite) and acclimatized in high humidity greenhouse condition. Survival rate differed greatly depending on rooting types of the explants. Two types of rooting were observed. The first type was direct rooting from the explant. The second type was callus formation followed by rooting from the callus. The explants showing the 1st type rooting survived and grew better than did those with the 2nd type rooting. Above results show that the shoots of this species can be multiplied *in vitro* by TDZ treatment followed by elongation with GA<sub>3</sub> and rooting with IBA.

**Key words:** Shoot proliferation, rooting, thidiazuron, plantlet production

## 서 론

히어리나무는 조록나무과에 속하는 수종으로 전 세계적으로 27속 140종이 분포하며 우리나라에는 1종이 자생한다 (Kim 1999). 우리나라에 자생하는 히어리나무는 한국특산 수종으로서 밀원식물로 이용 가능하고 환경오염에도 강하며 수형이 아름다워 조경수로서의 가치가 크며, 최근에는 다양한 형태의 잎이나, 꽃, 향기가 높은 개체가 선발되고 분재용 소재로서의 이용 가능성이 높아 신품종을 통한 농가의 소득증대가 기대되는 수종이다 (Shim et al. 2002). 히어리나무의 번식은

일반적으로 실생번식과 접삽목법의 영양번식법이 사용되어 왔으나 체계적인 연구가 수행되지 못하고 있다. 따라서 이용성의 증대를 위한 효율적인 번식기법의 개발이 필요한 수종이다. 조직배양은 기존의 번식법의 대안으로 사용될 수 있으며, 배양조건의 적정화를 통한 대량증식의 가능성이 여러 목본류에서 제시되어 왔으며 (Abuja 1987; Chalupa 1987; Dinkel 1992), 최근에는 히어리나무의 기내배양 결과도 발표된바 있다 (Moon et al. 2002). 이러한 결과는 앞으로 히어리나무의 새로운 품종의 선발 혹은 육성시 조직배양 기술이 효율적으로 이용될 수 있음을 시사하고 있다.

임목 수종의 조직배양 특히 활엽수종의 기내배양에서 줄기 증식을 위해 가장 보편적으로 사용해온 사이토키닌은 BA 이다. 그러나 수종에 따라서는 BA 이외의 여러 다른 사이토키닌

\*Corresponding author Tel 031-290-1163 Fax 031-290-1020  
E-mail: jesusmhk@hanmail.net

이 사용되며, 배양목적에 따라서는 오옥신과의 공조처리로 처리효과를 높이기도 한다 (Yancheva et al. 2003; Nirmai Babu et al. 2003; Vengade san et al. 2003). Thidiazuron (TDZ)은 치환 페닐우레아 화합물 (substituted phenylurea compound)로서 목화의 꼬투리를 기계적으로 수확하기 위한 수단으로서 상업적으로 개발되었다. TDZ는 구조적인 면에서 오옥신이나 purine 계통의 싸이토키닌과는 다르지만 배양된 절편의 생장이나 분화에 있어서는 싸이토키닌과 매우 유사한 효과를 나타내고 특히 목본류의 부정아 유도나 액아의 분열촉진에서 다른 싸이토키닌보다 효과적인 것으로 밝혀져 (Lu 1993) 여러 식물의 조직배양에 있어 TDZ의 사용이 증가하는 추세에 있다 (Murthy et al. 1998). 이전의 연구 (Moon et al. 2002)를 통해 히어리나무의 유묘 및 성숙목을 대상으로 줄기 증식에 미치는 BA 및 zeatin의 효과가 시험된 바 있으나 TDZ의 효과는 시험되지 못했다. 본 연구는 2년생 히어리나무의 기내식물을 재료로 액아로부터 다경 유도에 미치는 TDZ의 효과를 시험하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

본 실험은 기내 증식중인 2년생 히어리나무를 재료로 사용하였다 (Moon et al. 2002). 줄기는 1/2 MS 기본배지에 계대배양하여 3주 정도 자란 줄기 (10 cm 내외)의 절간 액아를 절편으로 사용하였다.

### 줄기 증식

절편은 액아 마디가 1~2개씩 볼도록 2.5~3 cm 크기로 절단하여 WPM (Lloyd and McCown 1980) 배지에 thidiazuron (TDZ, Sigma) 8농도 (0, 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mg/L)로 처리하여 치상하였다. 배지는 여과지 (Whatman, 55 mm $\phi$ )로 bridge를 만들어 유리시험관 (11 $\times$ 2 cm)에 넣은 다음 액체 배지로 조제하였다. 배지는 시험관 당 7 mL씩 분주하여 여과지 위로 배지가 넘치지 않도록 하였다. 배지는 탄소원으로 3% sucrose를 첨가하였고, pH는 5.7로 조절하였다. 배지는 121 $^{\circ}$ C에서 20분간 고압 멸균 후 사용하였다. 절편은 처리 당 15점씩 3반복으로 치상하였다. 한편 다경으로 유도된 줄기의 신장을 위해 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에 지베렐린산 ( $GA_3$ , Gibberellic acid, Sigma)을 1.0 mg/L 처리하여 신장을 도모하였다. 배양은 25 $^{\circ}$ C로 조절되는 배양실에서 1일 16시간 조명 (40  $\mu$ mol m $^2$  sec $^{-1}$ )으로 배양하였다. 배양 4주 후 유도된 줄기 수 및 길이를 조사하였다.

### 발근유도 및 순화

지베렐린산이 처리된 배지에서 4주간 배양된 줄기를 사용하여 1/2 MS 배지에 4농도의 IBA (0, 0.2, 0.5 mg/L 및 1.0 mg/L) 및 NAA (0.2, 0.5, 1.0 mg/L 및 3.0 mg/L)를 처리하여 발근유도를 시험하였다. 배지의 조제는 상기의 방법과 동일하게 하였고 0.3% gelrite (Sigma) 고형 배지를 사용하였다. 줄기는 처리 당 10 점씩 3반복으로 치상하였다. 배양조건은 상기의 방법과 동일하게 하였다. 발근된 식물체는 45 $\times$ 65 $\times$ 25 cm의 플라스틱 상자에 상토 (vermiculite)를 15 cm까지 채우고 발근형태를 구분하여 40개씩 이식하였다. 이식 후 충분히 관수하고 투명한 비닐을 덮고 다시 투명한 아크릴판을 덮어 수분이 포화되도록 하였다. 이식 후 매일 1~2회씩 아크릴판을 열어 환기해 주고 건조하지 않도록 관수하였다. 2주 후에는 비닐을 제거하고 아크릴판을 자주 열어 외부공기에 순화하였다.

## 결과 및 고찰

### TDZ의 줄기유도 효과

배양 1주 후 절편의 액아로부터 줄기의 생장이 시작되었고, 배양 2주 후에는 다경 줄기가 유도 되었으며 (Figure 1A) 4주 후에는 약 1 cm 정도로 자랐다. 다경 줄기의 유도는 대체로 TDZ 0.03~0.1 mg/L 농도 범위에서 양호하였으며 0.1 mg/L 처리구에서는 줄기의 수가 평균 6.5개로 가장 높았다. 줄기의 생장은 TDZ 농도가 증가될수록 저조한 경향을 보였다 (Table 1). 싸이토키닌은 일반적으로 신초의 정아우세를 억제시켜 액아로부터의 줄기분열을 촉진하는 것으로 알려져 있는데, 고농도의 TDZ 처리로 인한 줄기의 생장 억제는 TDZ의 싸이토키닌 활성이 높기 때문으로 보인다 (Huetteman and Preece 1993). 하지만 일단 유도된 줄기는 기본배지 혹은 저농도의 지베렐린산이 처리된 배지로 옮겨주면 줄기의 정상 생장이 가능하였다.

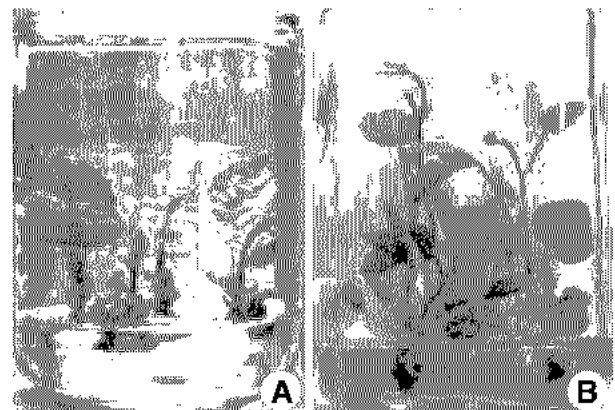


Figure 1. Multiple shoot induction and elongation. A, Multiple shoots induced from lower part of axillary buds by TDZ; B, Elongated shoots from axillary buds of figure A by  $GA_3$ .

### Phenolic compound의 문제점 극복

다경 유도의 과정에서 절편의 기부로부터 페놀성 물질이 분비되어 배지를 검게 만들고 이로 인해 잎의 갈변화 현상과 줄기의 생장억제가 관찰되었다. 이 같은 현상은 이전의 결과 (Moon et al. 2002)에서도 관찰된 내용으로 목본류의 조직배양 특히 활엽수종의 액아 배양에서 흔히 나타나는 현상이다. 이러한 페놀물질의 억제에 대해 절편을 액체배지에서 전 처리하거나, 활성탄 (activated charcoal) 혹은 polyvinylpyrrolidone (PVP)의 처리가 시도된 바 있다 (Shibli et al. 2001; Madhusudhanan and Rahiman 2000). 활성탄은 특히 페놀성분 등 조직배양시 나타나는 저해물질의 흡수에 효과적인 것으로 보고되며 (Pan and Staden 1998), PVP는 수소결합을 통하여 페놀류의 산화와 중합을 억제하거나 산화 phenolics와 결합하여 phenolase 효소에 의한 그 이상의 산화를 억제하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (George 1996). 본 실험에서도 이러한 페놀성분의 억제를 위해 활성탄 (0.02, 0.05, 0.15%)과 PVP (0.2, 0.5, 1.0 mg/L)를 처리해 보았으나 뚜렷한 효과는 보이지 않았다. 더욱이 활성탄의 고농도 (0.15%) 및 PVP 고농도 (1.0 mg/L)에서는 유도된 줄기의 생장이 저조해질뿐만 아니라 심한 경우 잎이 점차 갈변화 되어 식물체 자체가 고사되기도 하였다 (자료 미제시). 따라서 히어리의 액아 배양시 나타나는 페놀성물질의 억제를 위해 활성탄 혹은 PVP의 처리는 비효과적인 것으로 나타났다. 한편 본 실험에서와 같이 액체배지에 여과지로 bridge를 만들어 배양하면 페놀성 물질이 나타나기는 하나 미약하여 줄기의 증식이나 성장에는 큰 문제가 없고 계대배양이 필요할 경우에도 액체배지만 바꾸어 주면 되므로 히어리의 증식은 이 방법으로 배양하면 효율적인 것으로 나타났다.

### GA<sub>3</sub>에 의한 줄기신장

한편 TDZ의 처리로 히어리나무의 다경 유도는 효과가 있었으나 줄기의 생장은 저조한 것으로 나타났다. 이러한 줄기의 신장을 위해 MS 기본배지에 배양 혹은 1.0 mg/L GA<sub>3</sub>의 처리로 줄기의 신장이 가능하였으며 특히 GA<sub>3</sub> 처리는 줄기신

**Table 1.** Effect of TDZ on shoot proliferation of *Corylopsis coreana*.

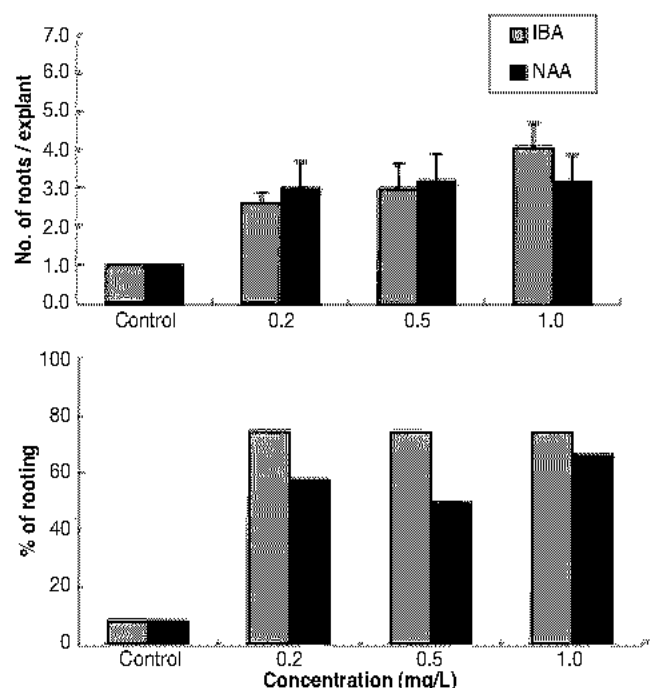
Medium (mg/L)	No. of shoots/explant*	Shoot Length*
WPM cont.	1.0±0.0	2.9±0.43
+ TDZ 0.01	4.3±0.60	1.7±0.08
+ TDZ 0.03	5.1±0.63	1.5±0.03
+ TDZ 0.05	5.6±0.63	1.1±0.02
+ TDZ 0.1	6.5±0.72	1.2±0.68
+ TDZ 0.2	3.1±0.38	0.8±0.03
+ TDZ 0.3	4.1±0.69	1.3±0.07
+ TDZ 0.5	2.9±0.24	0.7±0.01

\*Mean number of shoots ± standard error

장에 효과가 커서 3~7개로 유도된 다경 줄기가 모두 정상적인 줄기로 자랄 수 있었다 (Figure 1B). 더욱이 GA<sub>3</sub> 처리로 자란 줄기는 절간길이가 길고 있는 다소 작은 형태로 발달하여 액아를 다시 배양하거나 혹은 정아 줄기로 발근을 유도할 경우 절편의 조제에 유리한 장점이 있었다. 한편 배양과정에서 배지에 접촉된 잎에서 약간의 과수화 (hyperhydration) 현상이 나타나 진녹색의 잎을 가진 줄기가 관찰되었으나 증식에는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

### 뿌리유도 및 순화

기내발근은 3~4 cm 정도로 자란 정아 줄기를 하나씩 절단하여 1/2MS 배지에 IBA와 NAA를 처리하여 유도하였다. 배양 1주 후 절편의 기부가 2 mm 정도로 부풀어 오르는 형태를 보였고, 2주 후에는 절편에 따라 발근이 시작되었다. 뿌리는 흰색으로 세균이 없이 곧은 뿌리로 내렸다. 전반적으로 IBA가 NAA 보다 발근에 다소 효과적이었다 (Figure 2). IBA의 농도 별 처리는 뚜렷한 효과는 없었으나 고농도로 갈수록 절편 당 유도되는 뿌리수는 다소 증가하였고 (Figure 2), 캘러스와 더불어 발근되는 것이 많았다. 전반적인 발근율은 평균 60% 정도로 높지 않았으나 TDZ 처리로 유도된 줄기가 일반적으로 발근이 어려운 점 (Gray and Benton 1991; Preece et al. 1987)을 감안한다면 본 실험의 결과는 비교적 양호한 발근율로 생각된다. 이같이 발근율은 2년생의 어린 모수로부터 기내배양된 줄기를 사용하였기 때문으로 추정된다. 한편 발근되는 형태는, 절편의 기부에서 캘러스 없이 직접 유도되는 것 (Figure 3A)



**Figure 2.** Root induction of *Corylopsis coreana* by IBA and NAA treatment after 4 weeks of culture.

과 캘러스의 형성 후 캘러스로부터 혹은 캘러스와 더불어 발근되는 것 (Figure 3B)의 형태를 보였는데 대부분은 캘러스와 더불어 발근되었다. 대체적으로 기부에서 직접 발근된 것은 80% 이상 순화되고 활착 후의 생장도 건전하게 이루어졌으나 (Figure 4), 캘러스와 더불어 발근된 것은 20% 정도만 순화되고 차후의 생장도 매우 저조한 것으로 나타났다 (데이터 미제시). 이상의 결과는 TDZ 처리를 통해 히어리나무의 기내증식이 가능하다고 생각되나 발근 형태에 따라 토양에서의 순화율에 많은 차이를 보이므로 이 수준의 발근 유도는 기외삼목 등의 방법으로 절편의 기부에서 캘러스의 형성 없이 직접 발근되도록 향상시킬 필요가 있다.

적 요

2년생 히어리나무의 기내 줄기를 이용하여 thidiazuron (TDZ) 처리에 의한 증식효과를 시험하였다. 줄기증식은 WPM 배지에 TDZ 0.03~0.1 mg/L 처리로 가능하였으며 0.1 mg/L 처리시 주효하였다. TDZ 처리로 유도된 줄기는 1 cm 미만으로 다발 형태를 이루어 생장이 억제되었으나 지베렐릭산이 처리된 배지에서 정상적인 줄기로 성장하였다. 배양과정에서 나타나는 페놀성 물질에 의한 생장억제는 액체 배지에 paper bridge 배

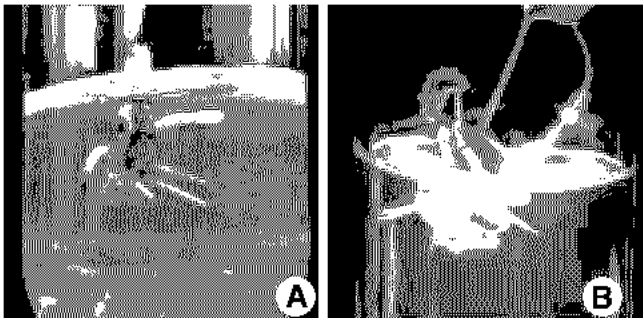


Figure 3. Two typical rooting types of explants. A, Direct rooting of an explant at the basal part without callusing; B, An explant with vigorous callus growth and roots.

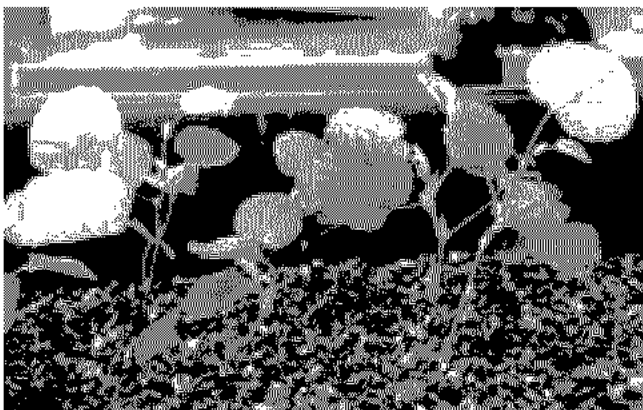


Figure 4. Acclimatized plantlets after transfer to artificial soil.

양법을 사용하여 극복될 수 있었다. 기내발근은 1/2MS 배지에 IBA 처리로 평균 60% 이상 발근이 가능하였고 NAA 보다 다소 효과적이었다. IBA의 적정농도는 0.5~1.0 mg/L로 나타났다. 발근된 식물체는 상토 (vermiculite)에 옮겨 고습상태로 온실에서 순화하였다. 절편의 발근 형태에 따라 토양에서의 순화 및 생장에 영향을 미쳤으며 두 가지 형태의 발근이 관찰되었다. 즉 캘러스 없이 직접 발근되는 것과 다른 하나는 캘러스가 형성되고 그 다음 캘러스에서 발근되는 형태이었다. 캘러스의 형성 없이 직접 발근되는 발근되는 형태가 순화율이 높고 생장이 양호한 것으로 나타났다. 본 실험 결과 TDZ 처리에 의한 히어리나무의 다경줄기 유도, 지베렐릭산 처리에 의한 줄기신장 그리고 IBA 처리에 의한 발근으로 기내증식이 가능한 것으로 나타났다.

인용문헌

Ahuja MR (1987) Cell and Tissue Culture in Forest - *In vitro* propagation of poplar and aspen. Kluwer Aca Pub, Boston, pp 207-223  
 Chalupa V (1987) Cell and Tissue Culture in Forest European Hardwoods. Kluwer Aca Pub, Co, Boston, pp 224-246  
 George EF (1996) Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd, England, pp 641-646  
 Gray DJ, Benton CN (1991) *In vitro* micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*). Plant Cell Tiss Org Cult 27: 7-14  
 Huetteman CA, Preece John E (1993) Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell Tiss Org Cult 33: 105-119  
 Kim TW (1999) The woody plants of Korea in color. Kyohak Pub Co. Seoul, Korea, pp 158-159  
 Lloyd G, McCown BH (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. Comb Proc Int'l Plant Prop Soc 30: 421-427  
 Lu CY (1993) The use of thidiazuron in tissue culture. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 29: 92-96  
 Madhusudhanan K, Rahim an BA (2000) The effect of activated charcoal supplemented media to browning of *in vitro* of *Piper* species Biol Plant 43: 297-299  
 Maier-Dinkel A (1992) Biotechnology in Agriculture and Forest 18. Micropropagation of Birches (*Betula spp.*) Springer Verlag, pp 40-79  
 Moon HK, Noh EW, Ha YM, Shim KK (2002) Micropropagation of juvenile and mature tree of *Corylois coreana* by axillary bud culture. Kor J Plant Biotech 29: 117-121  
 Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with *tobacco* tissue culture. Physiol Plant 15: 473-497  
 Murthy BNS, Murch SJ, Saxena PK (1998) Review-thidiazuron : a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. In Vitro Cell Dev

- Biol-Plant 34: 267-275
- Nimal Babu K, Sajina A, Minoo D, John CZ, Mini PM, Tushar KV, Rema J, Ravindran PN (2003) Micropropagation of camphor tree. *Plant Cell Tiss Org Cult* 74: 179-183
- Pan MJ, van Staden J (1998) The use of charcoal in *in vitro* culture. *Plant Growth Reg* 26: 155-163
- Preece JE, Huetteman CA, Puello CH, Neuman MC (1987) The influence of thidiazuron on *in vitro* culture of woody plants. *HortSci* 22: 1071 (Abstr)
- Shibli RA, Shatnawi M, Ein Abu, Al-Juboory KH (2001) Somatic embryogenesis and plant recovery from callus of *Nabali Olive*. *Sci Hort* 88: 243-256
- Shim KK, Ha YM, Park JH, Noh EW, Moon HK (2002) Development of new varieties of *Corylopsis coreana* its mass propagation *in vitro*. Sung Kyun Kwan Univ, Suwon, Korea, pp 168
- Vengadesan G, Ganapathi A, Amutha S, Selvaraj N (2003) High-Frequency plant regeneration from cotyledon callus of *Acacia Sinuata (Lour.) Merr.* *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 39: 28-33
- Yancheva SD, Golubowicz S, Fisher E, Lev-Yadun S, Flaishman MA (2003) Auxin type and timing of application determine the activation of the developmental program during *in vitro* organogenesis in apple. *Plant Sci* 165: 299-309

(접수일자 2003년 8월 25일, 수리일자 2003년 9월 20일)