

멸종위기식물 피뿌리풀의 기내증식

한무석*, 문흥규¹, 강영제, 김원우, 강병서, 변광욱
국립산림과학원 난대산림연구소, ¹국립산림과학원 산림유전자원부

Micropropagation of an Endangered Species, *Stellera rosea* Nakai by Tissue Culture

Mu-Seok Han*, Heung-Kyu Moon¹, Young-Jae Kang, Won-Woo Kim, Byung-Seo Kang, Kwang-Ok Byun

Warm-temperate Forest Research Center, Korea Forest Research Institute, Seogwipo 697-050, Korea

¹Division of Biotechnology, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350, Korea

ABSTRACT In order to develop an efficient micropropagation technique for an endangered species, *Stellera rosea* N., stem node cultures were conducted on MS medium supplemented with cytokinins. Generally, BA was better than zeatin on shoot proliferation from stem nodes, whereas zeatin showed more effective on shoot elongation. *In vitro* rooting of shoots was achieved by application of an auxin pre-culturing method. Overall rooting rate was relatively low and differed depending on the culture period. Pre-culturing of shoots for 15 days at 1.0 mg/L IBA revealed a slightly better rooting efficiency reaching 30% rooting rate than NAA. Root induction rate by NAA also varied with concentration of NAA and culture periods. Total 51% of the rooted plantlets survived on artificial soil mixture and grew normally without any distinct morphological variation. The results suggest that the endangered *Stellera* plants are propagated via *in vitro* culture system, but still need to more study for the improvement of rooting and acclimatization of the plantlets in soil.

Key words: Shoot proliferation and rooting, auxin pre-culturing for rooting, plantlets production

서 론

피뿌리풀 (*Stellera rosea* N.)은 팔꽃나무과에 속하는 다년생 초본으로서 뿌리의 색이 사람의 혈액 색깔과 같다고 하여 이름이 붙여졌으며, 크기가 30~40 cm에 달하고 꽃은 5~6월에 원줄기의 끝에 15~22개가 모여 핀다. 꽃의 색은 처음에는 약간 분홍색으로 피며 꽃이 지기 시작하면서 핏빛으로 변하여 색의 변화가 매우 아름다운 식물이다 (Figure 1A). 피뿌리풀은 국내에서는 제주도 오름 (기생화산 분화구)에서만 자라는 것으로 알려져 있으며, 그 중 한라산 동쪽 산록인 북제주군 구좌읍 높은 오름과 남제주군 표선면 개오름 등지에서만 드물

게 발견된다. 북한에서는 황해도 이북에서 분포하는 것으로 알려져 있으며, 특히 몽고의 초원에서 흔히 볼 수 있는 식물이다 (Lee 1993). 특이한 것은 황해도 이북과 몽고에서 자라는 북부지방의 식물이 남한에서는 제주도에서만 분포한다는 사실과 높은 고산지대에서 자랄 수 있는 고산성 식물임에도 불구하고 제주도의 중산간의 초원지대에서만 자란다는 사실은 아이러니한 부분이기도 하다. 이러한 피뿌리풀은 몽고가 고려를 침공할 때 말뚝이로 가져온 진초에 섞여 들어오거나 말의 치료제로서 들어왔다는 추측도 있으나 확실한 근거는 없다.

피뿌리풀은 꽃이 매우 아름답기 때문에 (Figure 1A) 마구잡이로 도취되어 자생지에서는 거의 찾아보기 힘들 정도로 잔존 분수가 그리 많지 않다. 따라서 산림청에서는 피뿌리풀을 희귀 및 멸종위기식물 후보 종으로 분류하여 보존에 힘쓰고

*Corresponding author Tel 064-732-8222 Fax 064-732-5840

E-mail: mshan99@foa.go.kr

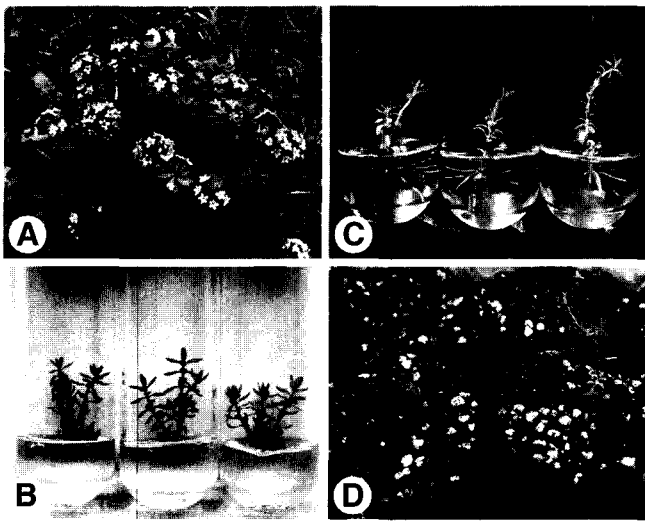


Figure 1. Micropropagation of a rare and endangered species, *Stellera rosea* N. through tissue culture. A, Normally flowered *Stellera rosea* N. in the field; B, Multiple shoots induced from bottom part of the explants; C, *In vitro* rooting of microshoots by IBA treatment; D, Acclimatized plantlets in the greenhouse.

있다 (Chungbu Forest Experiment Station 1997). 피뿌리풀은 일반적으로 포기 나누기 방법으로 번식시키고 있으나 다른 초본류와는 달리 잔뿌리 발달이 저조하여 활착이 어렵고, 종자를 통한 실생 번식법 역시 다른 초본류와는 달리 자생지에서의 개체수가 매우 적고 생장이 느려서 종자의 결실율이 낮기 때문에 효과적인 번식은 어려운 실정이다.

조직배양은 멸종위기에 직면한 식물의 번식수단으로 이용 가능하고, 적은 양의 시료를 사용하여 장기간 기내 보존이 가능한 현지의 보존 (*ex situ* conservation)의 효과적인 방법이 된다 (Krogstrup et al. 1992; Fay 1994). 국내에서도 몇 종의 희귀 수종에 대한 조직배양의 방법으로 현지의 보존을 위한 연구 결과가 발표된 바 있다 (Moon et al. 1997, 1999; Youn et al. 1992). 그러나 피뿌리풀에 대한 조직배양은 아직 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구는 멸종위기에 처해 있는 피뿌리풀의 조직배양 기술개발을 통해 자생지 복원 및 유전자원의 보존에 그 목적이 있다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에 사용한 공시재료는 국립산림과학원 난대산림연구소의 산림유전자원 보존원에 보존되어 있는 피뿌리풀 (*Stellera rosea* N.)을 재료로 하였다. 봄철에 자란 신초의 줄기를 채취하여 2~3 cm로 자르고 잎의 절반을 제거하였다. 절편체는 500 mL 삼각플라스크에 50개 정도 넣고 tween 20을 몇 방울 넣어 흔들어 거품을 낸 다음 수돗물로 수회 씻어내고 다시 흐르는 수돗물로 2시간 이상 씻어냈다. 무균상에서 70% 에

탄올에 1분, 0.1% $HgCl_2$ 로 2분 동안 흔들며 표면살균하고, 멸균수로 4~5회 세척하였다.

줄기유도

표면살균 후 줄기를 2.0~2.5 cm 크기로 조제한 후 0.8% water agar에 3% sucrose를 넣은 배지에 치상하여 1주일간 배양한 후 오염이 양된 줄기절편을 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에 0.1 mg/L zeatin을 처리하여 6주간 배양하여 줄기를 유도하였다. 그 다음 줄기의 증식에 미치는 싸이토킨 효과를 구멍코자 액아 마디를 약 1.5 cm 내외의 길이로 잘라 zeatin과 BA를 농도별 (0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 및 5.0 mg/L)로 처리하여 그 효과를 조사하였다. 배지는 150×30 mm의 유리시 험관에 8 mL씩 분주하여 121°C에서 20분간 고압멸균 후 사용하였다. 절편은 처리 당 10점씩 치상하여 3 반복하였다. 배양은 1일 16시간 조명 (40 μ M s), 25±2°C로 유지되는 배양실에서 배양하였다. 4주간 배양 후 줄기 길이 0.5 cm 이상 되는 것을 정상 줄기로 조사하고 길이를 측정하였다.

발근유도 및 포트묘 육성

증식된 줄기 중에서 정단부가 건전하고 생장이 양호한 것으로 길이 2.0 cm 이상 자란 건전한 줄기를 사용하였다. 배지는 염류농도를 1/2로 반감시킨 1/2 MS 배지에 IBA와 NAA를 농도별 (0, 0.5, 1.0, 2.0 및 5.0 mg/L)로 처리하여 시험하였다. 각각의 농도별로 5, 10, 15일간 전처리 배양한 다음 호르몬 무처리된 1/2 MS 기본배지로 계대배양하여 총 배양기간이 35일이 되도록 배양하였다. 그리고 비교구로서 오옥신 처리 (IBA 및 NAA) 후 35일간 연속적으로 배양하여 기간별 전처리 후 1/2 MS 기본배지로 옮긴 것과 발근율을 비교 조사하였다. 발근 유도는 처리 당 10점씩 치상하여 2 반복으로 하였다. 한편 발근된 식물체의 순화는 Moon 등 (1999)의 방법을 사용하였다. 기내발근된 어린 식물체를 조심스럽게 꺼내어 흐르는 물로 한천을 제거하고 인공배양토 (peatmoss: perlite: vermiculite = 1: 1: 1, v/v/v)로 옮겨 4주간 공중습도를 조절하며 순화하여 pot묘로 육성하였다.

결과 및 고찰

다경 (multiple shoot) 유도

줄기절편을 MS 배지에 0.1 mg/L zeatin을 처리하여 6주간 배양하였을 때 줄기 발생율은 70%로 나타났고 절편에 따라 줄기가 나오는 시기는 차이가 있었으나 대체로 배양 1~2주 사이에 줄기가 유도되었다. 따라서 줄기의 유도 및 신장에 있어 절편간 차이를 나타냈다. 절편 당 줄기 수는 대체로 1개씩

유도 되었으나 절편에 따라서는 2~3개가 자라기도 하였다. 이것은 액아로부터의 다경 줄기 유도가 아니라 이미 있는 액아로부터 자라는 줄기로 관찰되었다.

효과적인 식물체 증식조건을 구명을 위해 액아 마디를 MS 배지에 zeatin과 BA를 농도별로 처리하여 배양한 결과 다경 유도는 BA 처리가 주효한 것으로 나타났으며, 반면 줄기의 생장은 zeatin의 처리가 양호하여 BA 처리보다 2~4 배의 생장 차이를 보였다 (Table 1). 흥미로운 점은 다경 유도 및 줄기 생장에 있어 줄기 절편에 따라 차이가 크게 나타나 배지 및 적정 생장호르몬 처리는 물론 줄기 절편의 선택 역시 중요한 요소임을 보여 주었다. 한편 싸이토키닌 2.0 mg/L 이상의 고농도에서는 일부 줄기에서 정단괴저가 나타나고 특히 zeatin 고농도 처리로 신장된 줄기에서는 정단괴저 후 줄기 전체가 고사하는 절편도 관찰되었다. 이러한 줄기정단의 괴저 현상은 조직배양시 흔히 관찰되는 내용으로 Moon 등 (1999)은 미선 나무 다경 유도 증식에서 정단괴저를 관찰한 바 있다. 이러한 정단괴저 현상은 배지내 칼슘의 결핍으로 인한 정아로의 칼슘 분배 부족과 배지내 과습으로 인한 통기성 불량 등이 주요 원인으로 추정되고 있다 (Sha et al. 1985). 그러나 피뿌리풀의 줄기 증식에 있어서는 정단괴저가 생겨 초두부가 죽는다 할 지라도 그다음 액아에서 새로운 줄기가 계속 유도되어 생장 하였기 때문에 줄기의 증식에는 큰 문제가 되지 않는 것으로 나타났다.

다경 유도에 있어 zeatin 처리시 평균 2개 내외의 줄기가 유도되었지만 BA 처리시에는 절편 당 3~8개가 유도되어 매우 효율적 이었다 (Table 1, Figure 1 B). 이와 같은 결과는 기본배지와 비교할 때 약 5배의 줄기가 유도된 것으로 피뿌리풀의 기내 다경 유도에는 BA가 주효함을 보여주는 결과이다. 다경 유도에 가장 좋았던 조건으로는 BA 0.5~1.0 mg/L 수준에서 절편 당 약 8 개의 줄기가 유도되었으므로 이 조건이 적정농도로 생각되었다. 대부분 식물의 기내증식에 있어 줄기의 유도 및 증식은 처리된 싸이토키닌의 영향을 크게 받으며, 싸이

토키닌의 종류에 따라서는 식물에 따라 BA의 처리가 가장 주효한 것으로 보고되고 있다 (Cuenca et al. 1999). 이러한 BA의 증식 효과는 몇 가지 희귀 멸종위기 식물의 기내배양에서도 관찰된 바 있다 (Hammatt and Evans 1985; Lledó et al. 1995; Iriondo and Pérez 1996).

발근에 미치는 옥신의 효과

증식된 줄기를 배지의 염류농도를 1/2로 반감시킨 1/2 MS 배지에 IBA와 NAA를 농도별 (0, 0.5, 1.0, 2.0 및 5.0 mg/L)로 처리하였을 경우, 전반적으로 IBA가 NAA보다 발근유도에 다소 효과적이고 발근되는 시기가 빠르게 나타났으며, 기본배지에서는 전혀 발근되지 않았다. IBA의 5일간 전처리 배양시 5.0 mg/L 수준에서 25% 발근되어 가장 높았고, IBA 1.0과 2.0 mg/L 수준에서는 15%의 발근율을 보였다. 10일간 IBA 처리된 조건에서도 발근율은 큰 차이를 나타내지 않았으며 15일간 처리시에는 다소 발근율이 향상되고 모든 처리구에서 발근되는 양상을 보였다. 그러나 전처리 배양 없이 35일간 연속적으로 IBA 처리된 배지에서는 발근이 전혀 이루어지지 않았다. 한편 NAA 처리구에서는 IBA 보다 처리효과가 다소 늦게 나타나는 경향이었고 10일간 전처리 배양시 1.0 mg/L 수준에서 5% 발근되고, 15일간 전처리 배양시에는 모든 처리농도에서 15-25% 까지 발근율을 나타냈다. 전처리 배양 없이 35일간 연속적으로 배양시에는 대부분 발근되지 못했으나 NAA 5.0 mg/L 처리구에서만 20%가 발근되어 예외적인 결과를 나타냈다 (Table 2, Figure 1C). 그 이유에 대해서는 앞으로 좀 더 연구되어야 할 것이다. 전반적으로 저조한 발근율을 보였음에도 불구하고 전처리의 기간에 따라 발근율에 차이를 보이는 것은 흥미로운 결과이며, 특히 전처리 배양 없이 옥신 처리 후 연속적으로 35일간 배양한 경우는 거의 발근이 이루어지지 않은 사실은 주목해야 될 내용이다. 보편적으로 옥신 가

Table 1. Effect of cytokinins on shoot proliferation of *Stellera rosea* N.

Cytokinins (mg/L)	Mean no. of shoot induced	Shoot length (cm)
Control	1.88±0.6*	1.85±0.7
Zeatin 0.1	1.97±0.3	2.07±0.9
0.5	2.02±0.1	2.12±0.7
1.0	2.02±0.2	2.27±0.6
2.0	2.04±0.4	2.26±1.0
5.0	2.88±1.5	2.03±0.6
BA 0.1	7.06±2.6	1.53±0.6
0.5	8.79±3.3	0.74±0.3
1.0	8.48±4.8	0.73±0.2
2.0	7.20±3.8	0.62±0.1
5.0	3.26±1.7	0.57±0.1

*Mean±standard deviation.

Table 2. Effect of auxins on rooting of *in vitro* shoots after different days of culture.

Auxins (mg/L)	Rooting rate (day)*			
	5	10	15	35
Control	0	0	0	0
IBA	0.5	10	10	25
	1.0	15	15	30
	2.0	15	20	25
	5.0	25	20	20
NAA	0.5	0	0	25
	1.0	0	5	25
	2.0	0	5	25
	5.0	0	0	15

*After each auxin treatment, the cultures were subcultured on 1/2 MS basal medium. The total culture periods were adjusted for 35 days after subculture. In case of 35 days, the cultures were maintained on medium containing auxin without subculturing.

온테 NAA가 IBA 보다 활성이 낮고 발근유도 처리시 그 효과가 늦게 나타나는 것으로 보고되고 있는데 이러한 현상은 본 실험결과에서도 일부 확인되었다.

오옥신의 단기간 전처리 배양을 통해 발근율이 향상되는 것은 크게 두 가지의 이유로 추정될 수 있다. 하나는 발근 유도시 줄기의 절단면으로부터 방출되는 페놀성분 등 배양억제 물질이 계대배양을 통해 제거되었기 때문이고, 다른 하나는 오옥신이 뿌리원기의 유도를 촉진하고 다음 오옥신이 없는 기본배지에서 발근이 이루어 졌다고 볼 수 있다. 실제로 이러한 결과는 최근의 몇몇 연구결과에서도 찾아볼 수 있다. Siril 과 Dhar (1997)는 조구나무의 기내 발근 유도시 IBA를 48시간 전처리배양 후 1/2 MS 배지로 계대배양하여 83% 까지 발근율을 향상 시켰고, Agarwal 등 (1992)은 IBA를 30분간 전처리 배양하여 차나무 줄기의 발근을 촉진시킬 수 있었다. Barghchi (1988)는 *Alnus cordata*의 발근 유도에서 IBA를 24시간 전처리하는 것이 뿌리형성에 효과적이라고 하였으며, Ramírez-Malagón 등 (1997)은 일반적으로 발근이 어려운 *Photinia xfraseri*의 기내 발근유도에서 IBA 농도 및 전처리 기간을 달리한 조건에서 6일간 전처리하는 것이 발근에 가장 효과적임을 밝힌바 있다. 이러한 결과는 오옥신에 장기간 노출 될 경우 오히려 발근을 억제하는 요인으로 작용할 수 있음을 보여주는 것이다. 비슷한 결과로서 De Klerk (1995)도 식물체가 호르몬에 장기간 노출되어 있으면 식물의 종류에 따라서는 뿌리 형성을 억제할 수 있음을 시사한바 있다.

꽃트묘 육성

발근된 식물체를 인공배양토에 이식하여 꽃트묘로 육성하였다. 배양실에서 4주간 순화하였을 때 재분화 개체의 51%가 활착되었다. 피뿌리풀의 기내 식물체는 매우 연약하기 때문에 배양토로 이식하는 과정에서 건조 스트레스를 많이 받아 활착율이 저조했던 것으로 추정된다. 그러나 줄기의 증식조건이 어느 정도 확립되었기 때문에 대량으로 유도된 줄기를 이용하여 앞으로 기외삽목의 방법을 이용하고, 공중습도 조건을 적정화하여 배양토를 멸균해 사용하면 활착율을 높일 수 있을 것으로 생각된다. 한편 순화된 식물체는 형태적으로 기형이 나타나지 않고 정상적으로 성장하였다 (Figure 1D). 이상의 결과는 조직배양을 통한 피뿌리풀의 기내 배양 증식이 가능함을 보여준 것으로 앞으로 발근율 및 토양 활착율 증진을 위한 연구가 계속 요구된다.

적 요

멸종위기에 직면한 피뿌리풀 (*Stellera rosea* N.)의 기내증식법을 개발하고자 액아 마디를 MS 배지에 BAP와 zeatin을 처리

하여 다경 (multiple shoot)를 유도하고 기내발근에 미치는 IBA 및 NAA 처리 효과를 조사하였다. 액아 마디로부터 다경 유도는 BA가 현저히 양호한 반면 줄기의 생장은 zeatin이 BA보다 효과적이었다. 증식된 줄기로부터 기내 발근은 오옥신 처리로 가능하였으나 발근율은 대체로 저조하였고 오옥신의 전처리 기간에 따라 차이를 보였다. IBA가 NAA보다 다소 좋은 발근효과를 보였고 1.0 mg/L 농도로 15일간 배양시 30% 까지 발근되었다. NAA 역시 처리농도 및 처리기간에 따라 발근율에 차이를 보였다. 발근묘는 인공토양에서 51%가 활착되어 정상생장이 가능하였다. 이상의 결과는 발근 및 순화조건을 좀더 개선하면 피뿌리풀의 효율적인 기내번식이 가능함을 시사해준다.

인용문헌

- Agarwal B, Singh U, Banerjee M (1992) *In vitro* clonal propagation of tea (*Camellia sinensis* L.O. Kuntze). Plant Cell Tiss Org Cult 30: 1-5
- Barghchi (1988) Micropropagation of *Alnus cordata* (Loisel). Plant Cell Tiss Org Cult 15: 233-244
- Chungbu Forest Experiment Station (1997) Illustrated rare and endangered species in Korea. Korea Forest Research Institute, pp 255
- Cuenca S, Amo-Marco J B, Parra R (1999) Micropropagation from inflorescence stems of the Spanish endemic plant *Centaurea paui* Loscos ex Willk. (Compositae). Plant Cell Rep 18: 674-679
- De Klerk G J (1995) Hormone requirements during the successive phases of rooting of *Malus* microcuttings. In: Terzi M, Cella R, Falavigna A (eds), Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology, Vol 22. Kluwer Aca Pub, pp 111-116
- Fay MF (1994) In what situation is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? Biodiv Conserv 3: 176-183
- Hammatt N, Evans PK (1985) The *in vitro* propagation of an endangered species : *Centaurea junoniana* Svent. (Compositae). J Hort Sci 60: 93-97
- Iriondo JM, Pérez C (1996) Micropropagation and *in vitro* storage of *Centaureum rigualii* Esteve (Gentianaceae). Israel J Plant Sci 44: 115-123
- Krogstrup P, Baldursson S, Norgarrd JV (1992) *Ex situ* genetic conservation by use of tissue culture. Opera Bot 113: 49-53
- Lee TB (1993) Illustrated flora of Korea. Hyangmoonsa, Seoul, pp 561
- Lledó MD, Crespo MB, Amo-Marco JB (1995) *In vitro* multiplication of *Vella lucentina* MB Crespo (Brassicaceae), a threatened spanish endemic species. In Vitro Cell Dev Biol 31: 199-201
- Moon HK, Suk GY, Kim SC (1997) Micropropagation of a rare species, *Forsythia saxatillis* N. through tissue culture. J Kor For Soc 86: 430-434
- Moon HK, Suk GY, Kwon YJ, Son SH (1999) Micropropagation of a

- rare species, *Abeliophyllum disticchum* Nakai. via axillary bud culture. Kor J Plant Tiss Cult 26: 133-136
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Ramírez-Malagón R, Borodanenko A, Barrera-Guerra JL, Ochoa Alejo N (1997) Micropropagation for fraser photinia (*Photinia × fraseri*). *Plant Cell Tiss Org Cult* 48: 219-222
- 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
- Siril EA, Dhar U (1997) Micropropagation of mature Chinese tallow tree (*Sapium sebiferum* Roxb.). *Plant Cell Rep* 16: 637-640
- 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 2004년 1월 9일, 수리일자 2004년 2월 6일)