

# Peace 포플러(*Populus koreana* × *P. trichocarpa*)의 줄기형성에 미치는 Thidiazuron 효과

강호덕\*, 문흥규<sup>1</sup>, 박인선<sup>2</sup>, 이민순<sup>3</sup>

동국대학교 생명자원과학대학 산림자원학과, <sup>1</sup>국립산림과학원 생물공학과, <sup>2</sup>중부대학교 환경임산학과

## Effect of TDZ (Thidiazuron) on Shoot Proliferation of Peace Poplar

Ho-Duck Kang\*, Heung-Kyu Moon<sup>1</sup>, In-Sun Park<sup>1</sup>, Min-Soon Lee<sup>2</sup>

\*Laboratory Forest Biotechnology, Department of Forest Resources, Dongguk University, Seoul, Korea

<sup>1</sup>Division of Biotechnology, Korea Forest Research Institute, Suwon, Korea

<sup>2</sup>Department of Environment and Forest Products, Joongbu University, Korea

**ABSTRACT** Shoot formation was investigated from *in vitro* cultivation of exotic hybrid poplar (*Populus koreana* × *P. trichocarpa*) with a specific stomatal character occurring both upper and lower surface of leaves. Two different explants (stem and leaf segment) of Peace poplar were cultured on half strength Murashige and Skoog (MS) basal medium supplemented with the various concentrations of thidiazuron as a plant growth regulator. Most adventitious shoots were produced from excised ends of stem or mid-veins of leaf segments. The highest average numbers of shoots were 7.1 and 5.3 with the treatments of 0.02 mg/L TDZ in both explants of stem and leaf segment. The highest shooting rates were achieved to 83.3% and 47.6% with the concentrations of 0.01 mg/L and 0.02 mg/L TDZ by axillary bud and leaf cultures, respectively.

**Key words:** Adventitious shoot formation, axillary bud, leaf segment, peace poplar, thidiazuron

### 서 론

전통적인 육종방법과 더불어 최근에는 생물공학 기술을 이용한 임목육종 기술이 폭넓게 시도되고 있다. 하지만 초본성 식물과는 달리 목본 수종 대부분은 재분화율이 매우 낮고 배양기간이 장시간 소요되기 때문에 다양한 수종에서의 기술개발이 늦어지고 있다 (Bonga and Aderkas 1992). 목본류의 기내조직은 일반적으로 액아 또는 부정아 유도를 통한 기관형성 (organogenesis)과 1990년대 이후에 활성화 되고 있는 독일가문비나무를 중심으로 한 체세포배형성 (somatic embryogenesis)의 방법이 주류를 이루고 있다. 사용되는 절편으로는

기관배양으로 정아 또는 절간 액아가 주로 사용되고, 체세포배형성에는 접합자배 (zygotic embryo), 어린나무의 신초 조직 또는 기내배양종인 잎이나 뿌리 조직이 널리 사용된다 (George 1996). 정아 혹은 액아를 이용한 기관형성은 유전적으로 안정된 식물체를 얻기 위해 기내배양에서 널리 활용하고 있으며, 부정아의 유도가 가능한 수종에 대해서는 엽육 절편을 재료로 형질전환을 통한 새로운 품종의 육성 기술로 이용되고 있다.

포플러속 수종은 목본류 조직배양의 모델을 개발하기 위해 가장 널리 연구된 수종으로 액아배양 (Coleman and Ernst 1990), 절간마디 배양 (Douglas 1984), 뿌리배양 (Kang and Moon 2001) 및 캘러스배양 (Son and Hall 1990)의 방법으로 식물체를 재생시킨 바 있다. 하지만 적정화된 배양조건은 수종 혹은 유전자형에 따라 매우 다양하기 때문에 일정한 protocol을

\*Corresponding author Tel 02-2260-3316 Fax 02-2263-5662

E-mail: HDK0225@dongguk.edu

적용하기 어렵고 이에 따라 대상 수종에 따른 배양조건의 구명이 필요한 것으로 시사되고 있다. 더욱이 형질전환을 통한 새로운 품종을 육성하기 위해서는 기내 재분화 체계 조건이 선행적으로 확립되어야 한다.

Thidiazuron은 기내배양된 식물의 생장이나 분화에 cytokinin과 유사한 효과를 나타내고 특히 목본류의 부정아 유도 및 액아의 분열촉진에 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (Lu 1993; Mok et al. 1987). 목본류에서 thidiazuron을 이용한 기내 배양 연구로는 *Acer saccharinum* (Preece et al. 1991), *Fraxinus americana* (Navarrete et al. 1989), *Robinia pseudoacacia* (Chalupa 1987), *Vitis vinifera* (Gribaudo and Fronda 1991) 등에서 기내대량증식 체계가 확립된 바 있다.

본 연구의 대상수종인 peace 포플러는 기공이 잎의 앞뒤 양면에 분포하고 있어 광합성 능력이 매우 뛰어나 이로 인해 포플러류 생리연구의 중요 수종으로 평가되고 있다 (Park et al. 1995). 본 연구는 지금까지 조직배양의 결과가 보고된 바 없는 peace 포플러를 대상으로 액아 및 부정아 유도를 통하여 줄기를 재생시키는 방법의 개발에 연구의 주안점을 두었다. 본 연구 결과는 향후 유용한 유전자를 이용한 형질전환 및 기내광합성 연구 등 수목생리 연구의 기초 자료를 제공함에 있다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 배지

Peace 포플러 (*Populus koreana* × *P. trichocarpa*)의 기내배양을 위해 모수로부터 휴면기의 가지를 절취하여 식물배양기에서 삼목을 실시하고 신초줄기를 유도하였다. 식물배양기는 온도 25°C, 16시간 명배양의 조건으로 유지시키고, 하루에 2회 관수하여 수분을 유지하였다. 삼목 1개월 후에는 복합비료 (20N : 10P : 20K, Peters Fertilizer Products, W. K. Grace and Co., Allentown, PA)를 1회 처리하여 줄기의 생장을 촉진하였다. 배양기에서 2개월간 배양 후 5-10 cm로 자란 신초줄기를 절단하여 절편을 조제하였다. 절편은 잎을 제거하고 절간 마디를 하나씩 절단하여 300 mL 삼각후라스크에 50개 정도 넣고 tween 20을 몇 방울 첨가하여 수돗물로 수회 씻어 내었다. 다음 무균상에서 70% 에탄올에 1분, 2% 차아염소산나트륨 (sodium hypochlorite)에 20분 동안 표면 살균하고 멸균 증류수로 4-5회 세척하여 준비된 배지에 치상하였다. 적정배지의 선정을 위해 초대배양시 MS (Murashige and Skoog 1962), WPM (Lloyd and McCown 1980) 및 B5배지 (Gamborg et al. 1968)를 사용하여 기본배지에서의 줄기생장을 비교하였다. 그 다음 유도된 줄기를 사용하여 MS 배지의 염류 농도를 1, 1/2 및 1/3로 조절하여 염류의 농도에 따른 줄기의 생장을 조사하였다. 배지는 탄소원으로 3% sucrose를 공히 처리하였고, 0.3%

gelrite로 경화하였다. 배지는 유리시험관 (15×2.5 cm, Sigma)에 8 mL 씩 분주하여 121°C에서 20분간 고온 멸균 후 사용하였다. MS 배지에서 2개월간 배양된 줄기를 사용하여 1/2 MS 배지에 TDZ (thidiazuron)의 처리로 다경 및 부정아 유도에 미치는 효과를 조사하였다.

### 다경 (multiple shoot) 및 부정아 유도

1/2 MS배지에 TDZ를 농도별 (0, 0.01, 0.02, 0.05 및 0.1 mg/L)로 처리하여 절간액아 및 엽육 절편에서의 다경 및 부정아 유도를 시험하였다. 줄기는 액아가 하나씩 붙도록 마디를 절단하여 치상하였고, 엽육은 잎이 잘 전개된 것을 골라 중앙의 엽맥이 포함되도록 4×5 mm 크기로 절단하여 엽이면이 배지에 접촉하도록 치상하였다. 절편은 1회용 Petri-dish (87×20 mm)에 5개씩 치상하였고 5반복으로 시험하였다. 배양조건은 23°C의 식물배양기에서 16시간 광조건(3,000 lux), 8시간 암조건에서 4주간 배양하였다. 배양 4주 후 줄기 유도율 및 유도된 줄기수를 조사하였다. 한편 유도된 줄기는 1/2 MS 기본배지로 계대배양하여 정상적인 줄기로의 성장을 도모하였다.

## 결과 및 고찰

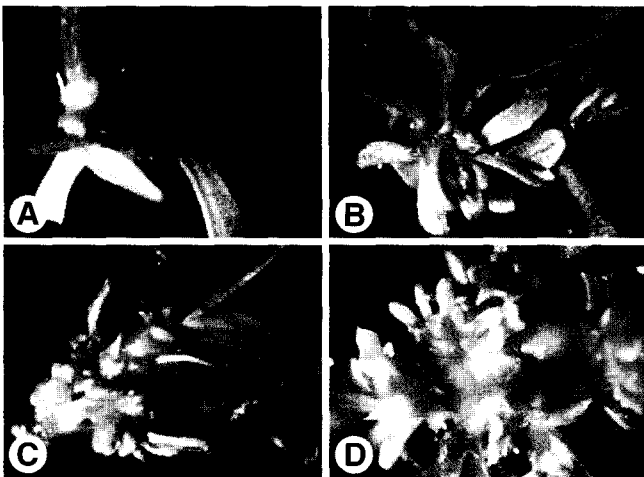
### 배지시험

초대배양 후 줄기유도 및 생장에 미치는 기본배지의 효과를 조사한 결과 3가지 배지 가운데 MS 기본배지에서 peace 포플러의 생장이 비교적 양호한 것으로 나타났다. 다음 MS 배지의 염류를 1, 1/2 및 1/3로 조절하여 줄기의 생장을 관찰한 결과 1/2 MS배지에서 녹색을 띠고 줄기생장이 가장 왕성하여 peace 포플러의 적정배지로 선정하였다 (data not shown).

### 다경 및 부정아 유도

절편에서 줄기의 유도는 액아 절편에서 먼저 시작되었다. 배양초기에는 이미 절편에 존재하는 액아로부터 줄기가 신장되는 것으로 나타났고 (Figure 1 A), 배양 2주 후에는 액아의 기부가 부풀어 오르며 부정아의 형태로 다경이 유도되는 것 (Figure 1 B-D)으로 나타났다.

대량증식 과정에서 식물시료로 이용한 절간줄기와 엽 시료간에 shoot 형성에 차이를 보였으며, TDZ의 농도의 변화에 따른 shoot의 유도 결과에서도 액아와 엽시료 모두에서 shoot 유도율이 상이하게 나타났다. 액아시료의 경우 1/2 MS배지에 TDZ 0.01-0.05 mg/L의 농도에서 6.1-7.1개의 multiple shoot가 형성되었다 (Table 2). 액아의 경우 TDZ의 농도에 따른 영향은 크지 않았다. 한편 엽 시료에서는 TDZ 0.02 mg/L에서 5.3



**Figure 1.** Effect of TDZ on shoot proliferation via adventitious bud formation from axillary bud. A, Control; B, 0.01 mg/L TDZ; C, 0.05 mg/L TDZ; D, 0.1mg/L TDZ. Each picture is magnified to 15 X.

**Table 1.** Effects of TDZ on adventitious shoot formation from leaf segments of Peace Poplar on half strength MS medium after 4 weeks of culture.

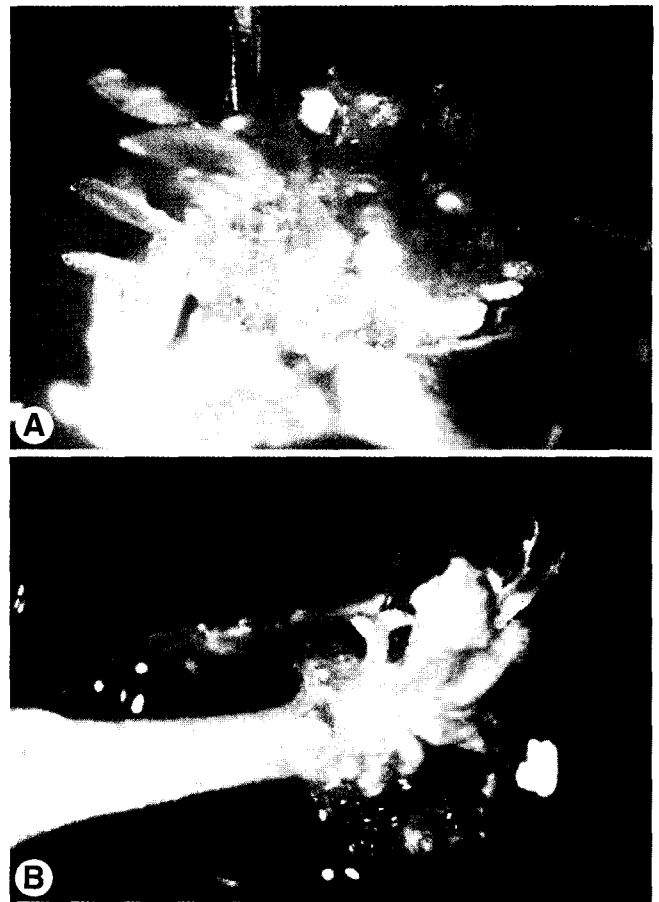
Medium (mg/L)	Adventitious bud formation from leaf segment	
	Frequency of shoot formation (%)	Mean No. per explant
1/2MS +TDZ 0.0	0	0
+TDZ 0.01	47.4	2.9
+TDZ 0.02	47.6	5.3
+TDZ 0.05	45.5	3.3
+TDZ 0.1	40.0	2.0

**Table 2.** Effects of TDZ on multiple shoot formation from axillary buds of Peace Poplar on half strength MS medium after 4 weeks of culture.

Medium (mg/L)	Multiple shoot formation from axillary bud	
	Frequency of shoot formation (%)	Mean No. of multiple shoot per explant
1/2MS +TDZ 0.0	40.0	0.7
+TDZ 0.01	83.3	6.1
+TDZ 0.02	73.6	7.1
+TDZ 0.05	75.0	6.8
+TDZ 0.1	72.7	4.8

개의 adventitious shoot를 형성하여 TDZ의 농도에 따른 변화를 관찰할 수 있었다 (Table 1). 전체적으로 액아의 경우 72.7% 이상의 대부분의 시료에서 높은 multiple shoot 유도율을 보였으나, 엽시료에서는 시료의 반복에 따라 큰 차이를 보이고 있어 40% 정도로 shoot 유도율이 낮게 나타났다 (Tables 1, 2).

대부분의 줄기는 정상적으로 생장되었으나 일부의 절편에서는 줄기가 배지 속으로 유도되어 과수화 (hyperhydration)된 줄기 형태로 자라기도 하였다.



**Figure 2.** Multiple adventitious bud formation from leaf disc of peace poplar. Adventitious bud formation from leaf (A) and petiole (B). Each picture is magnified to 15 X.

지금까지 보고된 포플러속 수종의 유사 연구로는 은백양, 미류나무, 양버들, *P. trichocarpa*, *P. tremula* 등이 있으며 대부분 MS 배지에 BA를 처리하여 줄기 증식을 시도한 바 있으나, 증식 효율이 매우 낮고 종에 따라서 차이가 큰 것으로 보고된 바 있다 (Whitehead and Giles 1977; Douglas 1984; Nadel et al. 1992). 미류나무에서는 선발된 몇몇 클론의 절간줄기를 재료로 대량증식 체계를 수립한 바 있는데 적정화된 배양조건에서도 클론간 증식율의 차이를 보여 클론에 따른 배양 적정화가 필요함을 시사하였다 (Coleman and Ernst 1990; Agrawal and Gupta 1991). 이상의 연구에서는 주로 cytokinin으로 BA를 첨가하여 다경을 유도하였기 때문에 본 시험의 결과와 정확한 비교는 어렵다. 그러나 peace 포플러에서 저농도의 TDZ 처리로 다경 및 부정아의 유도가 가능함을 보여 향후 포플러속 수종에서도 TDZ를 이용한 효율적인 식물체 재분화가 가능하지 않을까 추정된다. 최근에는 기내배양이 까다로운 몇몇 목본수종에서 TDZ를 이용한 효과적인 기내증식 결과가 보고되어 TDZ를 이용한 기내증식의 가능성을 밝게 하고 있다 (Murthy et al. 1998; Hosseini-Nasr and Rashid 2002).

엽절편 배양에서는 초기배양으로 부터 2주 경과 후 절편의

기부가 부풀어 오르면서 adventitious shoot 유도가 관찰되었다 (Figure 2-A). Adventitious shoot는 주맥의 형성층에서 대부분 유도되었으며, 부분적으로 미세줄기가 엽병 끝에서 유도되었다. 반면 엽 절편으로부터 유도된 식물체는 뿌리형성이 원활하여 기내에서 성장하였으나, 엽병 유도식물은 뿌리 형성이 안돼 작은 형태의 식물체로 배지 내에서 남아있었다 (Figure 2-A). 엽절편을 배지에 치상후 잎의 형태는 녹색으로 건전한 상태였지만 미세줄기의 형성과정에서 새롭게 유도된 식물체는 녹색 또는 적녹색을 띠었다. 엽절편 배상시 adventitious shoot형성은 절편에 따라 유도율에 있어 큰 차이를 보였다. 시험 재료로 활용하기 위해 기내에서 유도된 식물체에서 엽시료를 채취하여 증식연구를 시도했으나, 엽시료 중 엽번호 (leaf plastochron index)에 따라서 adventitious shoot 유도율이 다르게 나타났다. 일반적으로 엽번호가 정아를 중심으로 LPI 4-6번 주위에서 adventitious shoot 형성률이 높게 나타났다. 이러한 결과는 기내에서 식물체의 생리적인 작용에 기인하는 것으로 추정되며, 뿐만 아니라 식물체 치상시 시료의 배지 착상과 관련이 있는 것으로 판단된다.

임목을 대상으로 한 기내배양은 초본식물과는 달리 탈분화가 어려워 재분화율이 매우 낮은 편이다. 따라서 효과적인 배지 및 성장조절물질의 구멍은 배지의 적정화에 있어 필수적인 단계가 된다. 본 연구결과 *peace* 포플러는 1/2 MS 배지에서 정상적인 줄기생장이 가능하고 특히 저농도의 TDZ의 처리로 다경 및 부정아의 유도가 가능하여 이 수종의 대량증식은 물론 유용한 유전자를 이용한 형질전환도 가능하다고 생각된다.

위 연구에서 대량증식에 사용된 시료중 액아가 엽육보다 shoot 유도율이 높을 뿐만 아니라 줄기의 신장이 빠른 식물체를 생산했다. 지금까지 보고된 임목 조직배양 논문에서의 TDZ 활용은 *Silver maple* (Preece et al. 1991), *Fraxinus* (Navarrete et al. 1989), *Roninia* (Chalupa 1987) 등의 수종으로 제한되어 있고, *peace poplar*에 대한 연구는 보고된 바 없다. 본 연구결과는 형태적 특이성을 보유하고 있는 *peace* 포플러에 대한 대량증식을 통하여 식물체를 산지에 공급하는 기반을 마련하는데 있으며, 향후 본 임목의 생리적 현상 연구 및 유전자 형질전환 연구에 기초 자료를 제공할 것으로 사료된다.

## 적 요

기공이 잎의 앞뒤 양면에 존재하는 생리·형태적 특징을 가지고 있는 외래 교잡종인 *Peace* (*Populus koreana* × *P. trichocarpa*) 포플러의 효율적인 기내증식법을 개발하고자 액아와 엽육 절편을 이용하여 기내배양을 실시하였다. 몇 종류의 배지 시험을 통해 1/2 MS 배지를 적정배지로 선정할 수 있었고, 이 배지에 TDZ를 처리하여 multiple shoot 및 adventitious shoot 유도 효과를 조사하였다. 절간액아 및 엽육을 절편으로 TDZ의 농도별 처리로 배양 2주 후부터 multiple shoot 및

adventitious shoot가 유도되었으며 절편 및 TDZ 처리 농도에 따라 차이를 나타냈다. 액아로부터는 TDZ 처리로 절편당 5-7개의 multiple shoot가 유도된 반면 엽육 절편에서는 2-5개의 adventitious shoot가 유도되었다. 한편 부정아로부터 정상적인 줄기의 성장에 있어서도 절편에 따른 차이를 나타냈다. 이상의 결과는 저농도의 TDZ의 처리로 *peace* 포플러의 액아 혹은 엽육 절편의 기내배양을 통해 대량증식이 가능함을 보여주는 결과이다.

사사 - 본 연구는 동국대학교 연구비 지원에 의한 연구결과이다.

## 인용문헌

- Agrawal V, Gupta SC (1991) *In vitro* plantlet development from explants of 25-year-old trees of *Populus* × *euramericana* - a hybrid poplar. *Plant Sci* 78: 99-105
- Bonga JM, Aderkas PV (1992) *In vitro* cultures of trees. Kluwer Academic Publisher, pp 236
- Chalupa SC V (1987) Effect of benzylaminopurine and thidiazuron on *in vitro* shoot proliferation of *Tilia cordata* Mill., *Sorbus aucuparia* L. and *Robinia pseudoacacia* L. *Biol Plant* 29: 425-429
- Coleman GD, Ernst SG (1990) Axillary shoot proliferation and growth of *Populus deltoides* shoot culture. *Plant Cell Rep* 9:165-167
- Douglas GC (1984) Formation of adventitious buds in stem internodes of *Populus* spp. cultivated *in vitro* on basal medium: Influence of endogenous properties of explants. *J Plant Physiol* 116: 313-321
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151-158
- George EF (1996) *Plant propagation by tissue culture 2*. Exegetics Ltd, England, pp 834-1092
- Griboaud I, Fronda A (1991) Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated *in vitro*. *Hort Sci* 26: 1083
- Hosseini-Nasr M, Rashid A (2002) Thidiazuron-induced shoot-bud formation on root segments of *Albizia julibrissin* is an apex-controlled, light-independent and calcium-mediated response. *Plant Growth Regul* 36: 81-85
- Kang HD, Moon HK (2001) Shoot proliferation of *Populus euramericana* (*Populus deltoides* × *P. nigra*) through *in vitro* tissue culture. *Plant Res* 4: 111-120
- Lloyd G, McCown BH (1980) Commercially feasible micro-propagation 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 29: 92-96
- Mok MC, Mok DWS, Turner JE, Mujer CV (1987) Biological and biochemical effects of cytokinin -active phenylurea derivatives in tissue culture systems. Hort Sci 22: 1194-1196
- 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) Thidiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol* 34: 267-275
- Nadel BL, Hazanm G, David R, Hutterman A, Altman A (1992) *In vitro* propagation of *Populus* spp. Plant Sci 77: 111-118
- Navarrete NE, Van Sambeck JW, Preece JE, Gaffney GR (1989) Improved micropropagation of white ash (*Fraxinus americana* L.) Proc. 7th Central Hardwood Forest Conference, Carbondale, IL, pp 146-149
- Park SY, Furukawa A, Totsuka T (1995) Effect of CO<sub>2</sub> enrichment on growth of two poplar clones, I-214 (*Populus euramericana*) and peace (*P. koreana* × *P. trichocarpa*). Kor J Ecol 18: 255-263
- Preece JE, Huettnerman CA, Ashby WC, Roth PL (1991) Micro- and cutting propagation of silver maple. I. Results with adult and juvenile propagules. J Amer Soc Hort Sci 116: 142-148
- Son SH, Hall RB (1990) Plant regeneration capacity of callus derived from leaf, stem, and root segment of hybrid poplar (*Populus alba* × *P. grandidentata* Michx.). Plant Cell Rep 9: 344-347
- Whitehead HCM, Giles KL (1977) Rapid propagation of poplars by tissue culture methods. N Z J For Sci 7: 40-43

(접수일자 2003년 11월 29일, 수리일자 2004년 3월 17일)