

## 노각나무 성숙 접합자 배로부터 부정아 유도에 미치는 BA 및 NAA 효과

손석규\*, 조윤진, 문흥규

임업연구원 산림유전자원부

### Effects of BA and NAA on Adventitious Shoot Formation from Mature Zygotic Embryos of *Stewartia koreana* Nakai

Seog-Gu Son\*, Yoon-Jin Cho and Heung-Kyu Moon

Forestry Research Institute (KFRI), Forestry Administration, Suwon, 441-350, Korea

#### ABSTRACT

Zygotic embryos of *Stewartia koreana* Nakai were cultured to determine the effects both of BA and NAA on adventitious shoot induction. Multiple shoots (about 11 per explant) were formed when the embryos were treated with 1.0 mg/L BA alone. On the other hand, NAA appeared to inhibit shoot induction when treated with BA. Adventitious shoots looked differ in form and color by the combinations of BA and NAA treated. When both BA and NAA were present, the shoots became short and developed dark color. The highest rooting was observed at 0.5 mg/L NAA. The results could be useful for the establishment of *in vitro* regeneration system for *Stewartia koreana* Nakai.

**Key words** : BA, NAA, embryo culture, shoots, roots.

#### 서언

노각나무 (*Stewartia koreana* Nakai)는 차나무과 (Theaceae)의 노각나무속 (*Stewartia*) 수종으로 높이 7~15m까지 자라는 낙엽활엽 교목이다. 재질이 치밀하고 결이 고와서 고급 가구재 및 장식용재로 쓰이고 있고, 나무껍질은 흑적갈색으로 큰 조각으로 벗겨지고 고목이 될수록 결이 아름다워진다. 전 세계적으로 분포되어 있는 8종의 노각나무 중 한국의 품종이 가장 아름다워 '비단목'으로도 불리며 조경 및 원예용 가치가 매우 높은 수종으로 알려져 있다

(Kim과 Song, 1981). 우리나라 특산 수종으로 되어 있는 이 나무는 가야산, 소백산, 지리산 등의 중턱 이상의 산지에 주로 분포하고 있으며, 동일지역에서도 개체간의 형태적 특성의 변이가 커서 선발에 의한 신품종 육성 가능성이 높다 (Shim 등, 1992). 이미 미국의 Princeton Nursery 사를 비롯한 여러 종묘회사에서는 국내산 종자를 이용한 내한성 품종을 육성하여 상품화하는 등 우리나라의 노각나무가 외국에서 먼저 개량 보급하고 있다 (Shim 등, 1993). 따라서 국내에서도 노각나무에 대한 새로운 품종 육성을 위한 노력이 필요한 시점이다. 만약 우리 국내산 노각나

\* 교신저자 : E-mail : sonsak@foa.go.kr

무의 효율적인 번식기법이 개발된다면 다양한 야생 집단에서 선발된 개체의 증식을 통한 노각나무 신품종 육성이 가능할 것으로 생각된다.

노각나무의 번식은 주로 종자 파종에 의존하고 있으나 2중 휴면으로 인해 발아에 2년이 소요되며 발아율 또한 30% 정도로 매우 낮고 생육속도가 느리기 때문에 조경수목으로서의 국내보급은 널리 이루어지지 않고 있다 (Shim 등, 1993; Struve 등, 1999). 실생번식의 대안으로 삼목번식법이 제시되고 있으나 모수의 나이 및 채취 부위에 따라 발근율의 차이가 크고, 발근 부위의 괴저 문제로 인해 효율적인 번식법 개발이 필요하다 (Gouveia, 1995). 조직배양을 이용한 식물 증식방법은 기존 번식법의 대안으로 사용될 수 있음이 여러식물, 특히 임목에서 시사된 바 있고 (Moon 등, 2001; Thimmappaiah 등, 2002), 캘러스 및 부정아 유도, 체세포배발생을 통한 대량생산, 인공종자 유도, 유용유전자 도입에 의한 신품종 육성 등 다양한 생명공학 기법의 도입이 가능하다 (Pena와 Seguin, 2001). 노각나무의 기내배양 연구로는 Gillis와 Kane (1994)이 *Stewartia malacodendron* 에서, Patrick 등 (1997)이 *Stewartia pseudocamellia*의 절간부위를 재료로 부정아를 유도한 사례가 있다. 국내에서는 주로 자생지 분포와 종자번식에 대한 연구 (Shim 등, 1992; Shim 등, 1993)가 대부분이며, Choi 등 (1995)이 미숙배로부터 체세포배를 유도하여 재분화시킨 사례가 있으나 정상적인 식물체로의 생장율이 저조한 것으로 보고하였다. 조직배양을 이용한 기내증식에는 식물생장 조절제의 선택 등 배양을 위한 적정화 조건을 찾는 것이 우선적으로 필요하다 (Yoon 과 Choi, 2002). 식물생장 조절제 중 BA는 저렴하게 일반적으로 쓰이는 사이토키닌이며, NAA는 사이토키닌과의 상호작용으로 발근을 촉진시키는데 가장 많이 쓰이는 합성 오옥신 중의 하나 인바 (Hudson 등, 1997), 본 연구는 노각나무 성숙배를 재료로 부정아 유도에 미치는 BA와 NAA의 효과를 조사하여 이 수종의 기내번식을 위한 기초 자료를 제공하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 시료 및 표면살균

경기도 화성에서 7-10년생 노각나무 모수로부터 종자를 2002년 9월에 채취하여 본 실험의 재료로 사용하였다. 채취한 종자는 tween 20 액을 2-3 방울 넣어 표면을 세척한 후 무균상에서 70% (v/v) 에탄올로 1분, 2% (v/v) 차아염소산나트륨 (NaClO)으로 15분간 표면 살균하였다. 이를 다시 5% (v/v) 과산화수소 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 3분간 재 살균한 후 멸균수로 3회 씻어내었다.

### 배지 및 배양환경

배지는 MS (Murashige와 Skoog, 1962) 배지에, 탄소원으로 sucrose 3%, 아미노산으로 L-glutamine 0.1%를 첨가하여 사용하였다. 부정아 유도에 대한

Table 1. Effect of BA and NAA on adventitious shoots induction from mature zygotic embryos of *S. koreana* after 10 weeks in culture

BA(mg/L)	NAA(mg/L)	% of adventitious shoots induced
	control	0
0.0	0.1	48.0
	0.2	36.0
	0.5	34.8
0.1	0.0	52.2
	0.1	47.8
	0.2	52.4
0.5	0.5	39.1
	0.0	54.5
	0.1	43.5
1.0	0.2	47.8
	0.5	60.9
	0.0	65.2
1.0	0.1	61.9
	0.2	60.0
	0.5	63.6

\*\* MS medium was used as a basal medium.

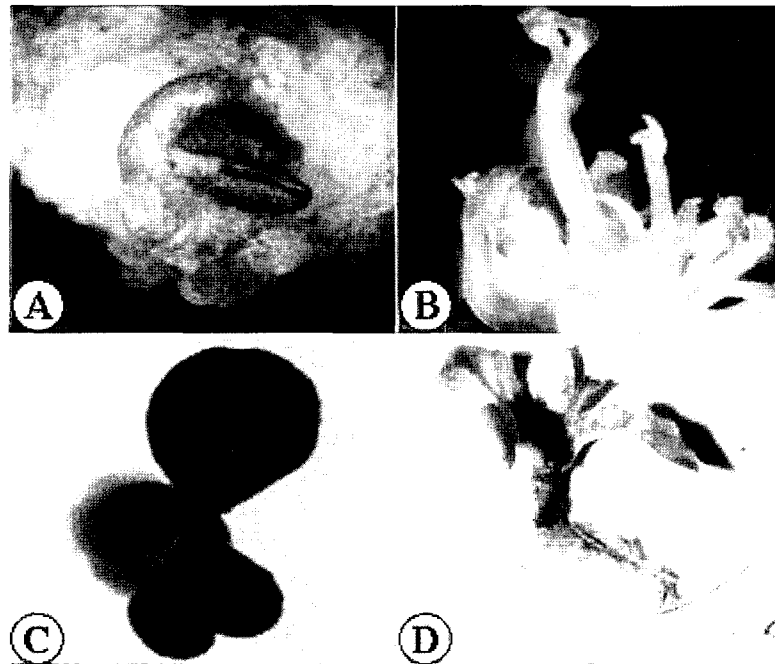


Fig. 1. Plantlet regeneration via adventitious shoot formation from zygotic embryos of *S. koreana*.  
 (A) : Mature embryo showing poor developed cotyledon with active callus formation  
 (B) : Elongated adventitious shoots  
 (C) : Normal looking plantlet with well developed cotyledons  
 (D) : A regenerated plantlet after rooting.

식물 성장조절제의 효과를 알아보기 위해 사이토키닌류는 BA (*N*<sup>6</sup>-benzyladenine)를 0, 0.1, 0.5, 1.0 mg/L의 네가지 처리로, 오옥신류는 NAA ( $\alpha$ -naphthalene acetic acid)를 0, 0.1, 0.2, 0.5 mg/L의 네가지 처리로 조합하여 처리하였다 (Table 1). pH는 5.7로 조정하여 0.3% gelrite를 넣고 121℃에서 15분간 고압 멸균 후 사용하였다. 배지는 1회용 Petri-dish (87mm×15mm, 녹십자)에 25ml 분주하였다. 표면 살균된 성숙종자를 해부 현미경하에서 절개하여 배를 적출한 후, 절단된 배의 절단면이 배지에 접촉되도록 치상하였다. 절편은 샤페 당 10점씩 3 반복으로 치상하였으며, 치상 후 매 3-4주마다 동일한 배지의 유리 시험관 (110×20mm)으로 계대 배양하였다. 치상 10주 후 유도된 부정아의 형태, 캘러스의 형성 및 발달 상태를 조사하였다. 한편 직접 발아되는 형태의 배를 선별하여 MS 기본배지에 계대배양 후 재분화를 도모하였다. 모든 배양은 24±2℃, 냉백색 형광등 (40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>)으로 1일 16시간 유지되는 배양실에

서 이루어졌다.

## 결과 및 고찰

### 부정아 유도

각 처리구당 모두 30점씩 치상된 절편체로부터 유도된 부정아율은 1.0 mg/L의 BA 처리구에서 다른 농도에 비해 높게 나타나 1.0 mg/L의 BA 단독 처리구에서 가장 높은 65%를 보였다(Table 1). 부정아의 수 또한 1.0 mg/L의 BA 단독 처리구에서 절편체 당 11.7±2.1 개가 유도되어 가장 많은 부정아수를 보였다(Fig. 2). BA와 NAA의 혼용 처리에서는 BA 단독 처리에 비해 부정아 유도율이 저조하였으나 0.5 mg/L의 BA와 NAA 그리고 1.0 mg/L의 BA와 0.5 mg/L의 NAA 두 가지 처리구에서 절편당 4.2±0.9개 및 4.5±1.0개의 부정아가 유도되었다(Fig. 2). 발생된 부정아의 형태에 있어 BA의 단독처리로 유도된

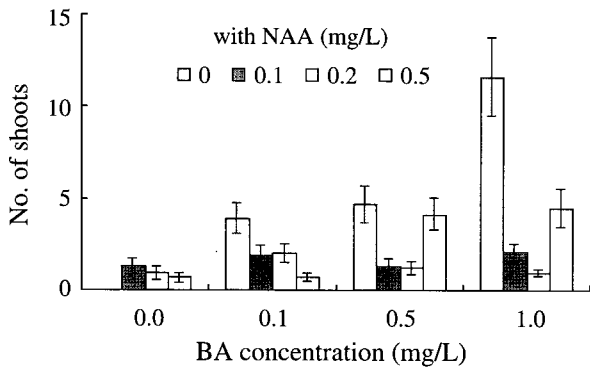


Fig. 2. Effect of the combination of BA with NAA on adventitious shoot induction from mature zygotic embryos of *S. koreana*.

부정아 보다 짧고 진녹색의 부정아로 유도되어 대조를 이루었다. 0.1 mg/L 또는 0.2 mg/L의 NAA 처리구에서는 BA와의 혼용여부에 상관없이 통계적인 유의차가 나타나지 않았는데 이는 0.5 mg/L 이상의 BA와 NAA 농도에서 그 혼용 처리효과가 나타남을 보이는 것으로 판단된다. BA의 효과는 처리량에 대해 일정농도까지는 정의 상관관계가 있다고 판단되는데, Abdulaziz와 Al-Bahrany (2002)는 꿀에 대한 기내 재분화 실험에서, BA를 단독 처리하였을 때 부정아 유도가 촉진되었으나 NAA를 혼용하였을 경우에는 반응을 보이지 않거나 부정아 유도율이 저조하였다고 하였으며 일정농도 이상의 NAA 처리시에 혼용 효과가 있을 수 있다고 하였다. 또한 고농도의 BA를 처리할 경우 부정아 유도율이 낮아지는 경향이 있으며 형성된 부정아 형태에 있어서도 관찰된 잎의 길이가 짧은 경향이 있다고 하여 본 실험과 유사한 결과를 보였다. 한편, Gillis와 Kane (1994)은 *Stewartia malacodendron* L.의 기내 증식실험에서 1.0 mg/L BA와 5 mg/L GA<sub>3</sub>의 조합에서 부정아 유도에 가장 효과적이었다고 보고하여 수종에 따른 차이를 보여주었다.

처리구에 따라 치상된 성숙배의 발달 양상이 다르게 나타나 유도된 부정아수와 캘러스 발달양상도 달랐다. 호르몬을 처리하지 않은 대조구에서는 신장된 절편체로부터 자엽전개가 이루어지기도 하였으며, 자엽이 다소 전개되고 기부에 캘러스가 크게 형

성되는 것(Fig. 1-A)과, 자엽이 정상적으로 전개되어 신장되고 기부에 캘러스가 형성되는 형태도 나타났다. 또한 절편에 따라서는 전개된 자엽에서 다수의 부정아가 유도되어 덩어리져 신장되기도 하였다(Fig. 1-B). 한편 이러한 형태의 부정아는 예외 없이 절편의 기부에 캘러스가 형성되었다. 부정아는 돌기 모양의 부정아 원기가 부풀어 오른 자엽에서 유도되거나 유도된 캘러스의 표면에서 관찰되었는데, 이것은 배자엽 표면의 유세포로부터 직접 유도되거나 혹은 유세포가 캘러스를 형성한 다음 탈분화 과정을 거쳐 기관분화가 이루어지는 것으로 추정되었다(Hudson 등, 1997; Sharma 등, 1999). 특히 대부분 부정아가 형성된 BA의 단독 처리구의 경우, 처음에는 자엽이 부풀어 캘러스를 형성한 다음 조직의 표면에서 다수의 부정아가 형성되는 것으로 나타났다. 이 과정에서 성장조절제의 영향이 흥미롭게 관찰되었는데 성장조절제의 단독 혹은 혼용처리 여부에 따라 배자엽의 발달이나 부정아의 유도시기가 다르게 나타나는 점이다. 이 수종의 접합자 배로부터 부정아를 유도하는데 있어 BA 단독처리의 경우 배자엽의 발달과 부정아의 유도가 약 2주 정도 늦게 나타나는 경향이였다. Lu (2002)와 Paloma 등 (2003)은 식물생장조절제의 혼용처리가 단독처리보다 처리의 효과가 빠르다고 하였는데 이 같은 결과를 본 실험에서도 확인할 수 있었다. Gillis와 Kane (1994)은 *Stewartia malacodendron* L.의 줄기를 재료로 한 기내 증식실험에서 실험 초기에는 GA<sub>3</sub>를 단독으로 처리하여 부정아를 유도하였으며, Patrick 등 (1997)도 2iP를 단독으로 처리하여 치상된 줄기를 신장시켜 부정아를 유도한 후 GA<sub>3</sub>를 혼용 처리 유도된 부정아의 성장을 도모하였다고 하였다. 따라서 앞서 언급한 부정아 유도율과 유도시기를 적정화 할 수 있는 식물생장조절제의 조합이 구명된다면 기내증식의 효율성을 더 높일 수 있을 것으로 생각된다.

### 발근 및 식물체 재생

발근을 위한 NAA의 모든 처리구에서 뿌리 형성을 관찰할 수 있었는데(Fig. 3), 처리량이 증가함에 따라 형성된 뿌리수도 많아지는 경향을 나타냈다.

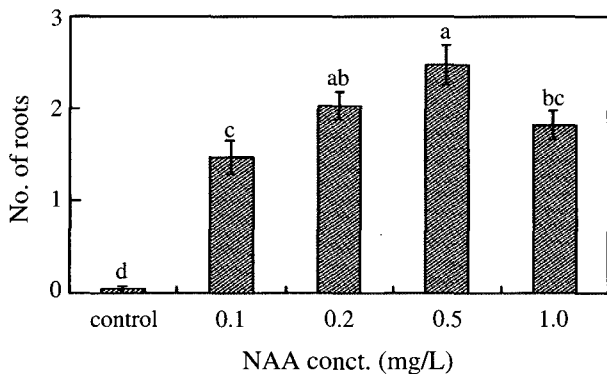


Fig. 3. Effect\* of NAA on root induction from mature zygotic embryos of *S. koreana*

\* : Duncan's multiple range test,  $p < 0.0001$ .

그러나 농도가 높아져 1.0 mg/L을 처리하였을 때는 약 1.8개로 오히려 낮아졌는데, Duncan의 다중검정 결과 그림 3에서 나타난 바와 같이 0.5 mg/L 처리구에서  $2.5 \pm 0.2$ 개로 가장 좋은 결과를 보였다 ( $p < 0.0001$ ). Gouveia (1995)는 국내산 노각나무의 삽목 증식에 있어서 IBA를 처리하여 발근율을 80%까지 높일 수 있었다고 하였으며, Thimmappaiah 등 (2002)은, 초본에 비해 기내 발근이 어려운 목본 식물에 있어 부정아 유도조건은 물론 발근 조건이 중요하다고 하였다. 본 실험의 결과로 미루어 볼 때, 노각나무의 부정아 유래 식물체의 발근유도는 0.5 mg/L의 NAA 처리가 효과적이라고 판단된다.

한편 배양과정에서 성장조절제 처리에 관계없이 성숙배가 직접 발달되어 식물체로 재생되는 것이 일부 관찰되었다. 이러한 배를 MS 기본배지에 계대 배양하였을 때 정상식물체로 재생되었는데, 배가 발달되는 형태는 캘러스가 거의 형성되지 않고 정상적으로 자엽이 전개되며 발근되거나(Fig. 1-C, D) 정상적인 뿌리와 함께 근모 (hairy roots)가 발달되기도 하였다. 이처럼 치상된 배에서 직접 식물체가 재생되는 것은 일종의 종자발아 현상으로 볼 수 있으며 종자의 냉장 보관 상태와 처리된 호르몬의 종류 및 농도에 대한 구체적인 조건이 확립된다면 일반종자의 발아율 증진에도 도움이 될 것으로 생각된다. 이렇게 절편에 따라 직접 발아하거나 부정아와 더불어 모상근을 발달시키는 것, 혹은 자엽만 길게 신장되는 것

등 여러 형태의 기관형성을 보이는 것은 시료로 사용된 접합자 배의 유전적 조성, 특히 발육 단계가 다르기 때문인 것으로 알려져 있다 (Dennis 와 Sreejesh 2003; Kim 등, 2001). 이 같은 결과는, 배양적정 시기를 고려하여 발아율을 향상시킨다면 성장조절제의 처리 없이도 노각나무의 접합자 배를 이용한 기내식물체 유도가 가능함을 시사하는 것이다. 한편 일부의 절편에서는 배발생의 형태를 보이는 캘러스가 유도되어 2,4-D 등의 오옥신 처리로 증식 및 배발생 조직을 유도중에 있는 바 앞으로 이러한 결과는 기내 배양체계의 확립을 통해 노각나무의 효율적인 기내 번식이 가능하리라고 사료된다.

## 적 요

노각나무의 기내번식법을 개발하기 위하여 성숙 배조직을 절편으로 MS 배지에 BA 및 NAA의 단독 또는 혼용처리로 부정아 유도에 미치는 효과를 조사하였다. 대체적으로 BA의 단독 처리가 부정아 유도에 효과적이었으며 1.0 mg/L 처리시 절편 당 약 11개의 부정아가 유도되었다. NAA와의 혼용 처리시는 대체로 부정아 유도율이 저조하였으나 0.5 mg/L 이상의 BA를 처리하였을 때 일부 혼용 효과를 확인할 수 있었다. 성장조절제의 처리에 따라 부정아의 형태에 많은 차이를 나타내어 BA와 NAA의 혼용처리시는 BA 단독처리시보다 짧고 진녹색의 부정아로 유도되었고, 뿌리발달은 0.5 mg/L의 NAA 처리구에서 가장 높아 정상적인 식물체로 재분화 되었다. 본 연구는 노각나무의 성숙 배조직을 절편으로 기내 식물체 유도가 가능함을 보여주었다.

## 인용문헌

Abdulaziz, M. and Al-Bahrany. 2002. Effect of phytohormones on *in vitro* shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. Sci. Horticult. 95(4):285-295.

- Choi, E.G., H.B. Park, K.S. Kim and Y.K. Lee. 1995. Plant regeneration from immature zygotic embryos of *Stewartia koreana* Nakai. via somatic embryogenesis. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 22(2):77-81.
- Dennis, T.T. and K.R. Sreejesh. 2003. Callus induction and plant regeneration from cotyledonary explants of ash gourd (*Benincasa hispida* L.) Sci. Horticult. (In press).
- Gillis, M.R. and M.E. Kane. 1994. *In vitro* multiplication of *Stewartia malacodendron* L., an endangered woody species. Hort. Sci. 29(5):516 (abstract).
- Gouveia, R.J. 1995. Korean *Stewartia* propagation. Combined proceedings Intl. Plant Prop. Soc. 45:506-507.
- Hudson, T.H., E.K. Dale, T.D. Fred Jr. and L.G. Robert. 1997. Plant propagation : principles and practices. 6th ed. Prentice Hall, Inc. U.S.A. pp. 289-292.
- Kim, C.M. and H.C. Song. 1981. A study of distribution and communities *Stewartia koreana* (1). Temple Huibang and Mt Sogri. Res. Rep. Agri. Sci. Tec., Chungnam Univ. Korea 8:11-17.
- Kim, D.C., H.J. Chung, B.H. Min and D.C. Yang. 2001. Plant regeneration from leaf and internode segment cultures of Boxthorn (*Lycium chinense* Mill.) Kor. J. Plant Tiss. Cult. 28(6):329-333.
- Lu, M-C. 2002. Micropropagation of *Morus latifolia* Poilet using axillary buds from mature trees. Sci. Hort. 96:329-341.
- Moon, H.K., P.Y. Hong, W.Y. Kim and J.S. Lee. 2001. Genotype effect on somatic embryogenesis and plant regeneration of 15 *Aralia elata*. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 28(3):129-134.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Paloma, M., R. Ana and F. Belen. 2003. Effect of different benzyladenine time pulses on the endogenous levels of cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid in micropropagated explants of *Actinidia deliciosa*. Plant Physiol. Biochem. 41(2):149-155.
- Patrick, J.M., A.B. Frank. and G.R. Thomas. 1997. Micropropagation of *Stewartia pseudocamellia*. J. Evt. Horticult. 15(2):65-68.
- Pena, L. and A. Seguin. 2001. Recent advances in the genetic transformation of trees. TRENDS in Biotech. 19(12):500-506.
- Sharma, M., A. Sood, P.K. Nagar, O. Prakash and P.S. Ahuja. 1999. Direct rooting and hardening of tea microshoots in the field. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 58:111-118.
- Shim, K.K., B.K. Seo, K.W. Lee, K.W. Cho and S.C. Shim. 1992. Study on the Korean native *Stewartia (Stewartia koreana)* I . Study on the native distribution of Korean *Stewartia (Stewartia koreana)* in Mt. Sobaek. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 33(5):413-424.
- Shim, K.K., B.K. Seo, N.H. Cho, K.H. Kim and S.C. Shim. 1993. Study on the Korean native *Stewartia (Stewartia koreana)* II . Seed germination and softwood cutting of Korean native *Stewartia (Stewartia koreana)* in Mt. Sobaek. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 34(2):160-166.
- Struve, D.K., B.A. Oleksak, T. Kawahara and A. Kanazashi. 1999. Germination of Japanese *Stewartia* seeds: The effects of warm and cold stratification. J. Evt. Horticult. 17(4):197-202.
- Thimmappaiah, R.A. Shirly and P.H. Sadhan. 2002. *In vitro* propagation of cashew from young trees. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 38(2):152-156.
- Yoon, E. S. and Y.E. Choi. 2002. Micropropagation and mass production of adventitious roots of *Polygonatum odoratum* via the culture of seedling explants. J. Plant Biotech. 4(1):33-37.

(접수일 2004. 9. 01)

(수락일 2004. 9. 30)