

희귀 및 멸종위기 수종 개느삼의 액아배양을 통한 기내번식

문흥규, 김용욱
국립산림과학원 생물공학과

In vitro propagation of a rare and endangered species, *Echinosophora koreensis* Nakai, by axillary bud culture

Heung-Kyu Moon and Yong-Wook Kim

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

ABSTRACT An efficient micropropagation was established by using axillary bud explants from two-year-old tree (*Echinosophora koreensis* Nakai), which has been known as a rare and endangered species. Among various basal media tested, DKW medium was shown to be the best for axillary shoot elongation. The addition of both BA and TDZ to the medium induced 6 to 10 shoots per explant during eight weeks of culture, without showing any abnormal morphology at the shoot proliferation stage. However, high concentration of TDZ (> 0.05 mg/L) appeared to cause hyperhydration on either leaf or shoot at the later developmental stage. Approximately 20 % of shoots produced roots by the addition of 1.0 mg/L NAA but not by IBA (0.2 ~ 1.0 mg/L). *Ex vitro* micro-cuttings were better source for root induction; up to 58.6% of the micro-cuttings rooted when 100 mg/L IBA was applied to the soil (vermiculite). More than 90% of plantlets with roots were successfully acclimatized and grew normally in the field. Therefore, we suggest that this endangered tree species can be effectively micropropagated by axillary bud culture system developed in this study.

서 론

개느삼 (*Echinosophora koreensis* Nakai)은 낙엽관목으로 높이가 1 m에 달하고 지하경이 길게 자라면서 번식하는 수종이다. 이 나무는 함경남도에서 처음 발견되어 명명된 식물인데 남한에서는 양구에서만 자란다. 분포지가 제한되어 있고 우리나라의 특산 속으로서 의의가 있는 수종이다 (Lee and Lee, 1997). 개느삼은 천연기념물로 지정되어 있으며 꽃이 아름다워 조경적 활용가치가 매우 높은 수종이며 환경부에서는 강원도 양구군의 임당리와 한전리 일대의 자생지를 천연기념물로 지정하여 보호하고 있다. 하지만 우리나라의 자생식물 특히 개느삼은 서식지, 형태적인 특성 그리고 번

식방법 등에 대한 선행연구가 부족한 상태이며, 종자의 결실이 불량하여 효율적인 번식도 잘 이루어지지 못하고 있는 실정이다 (Shim et al. 2006).

개느삼의 번식은 실생 (seedling)이나 분근으로 번식이 가능한 것으로 되어있으나 구체적인 연구 결과가 보고된 바는 없다. 꽃이 아름다워 관상적 가치가 있고 이로 인해 남획되어 왔으며, 최근에는 자생지에서 조차 분포지가 훼손되어 희귀 및 멸종위기 수종으로 분류하여 보존하고 있다 (Lee and Lee 1997).

조직배양 기술은 기존의 무성 번식법에 대한 대안으로 유용한 번식법이 될 수 있으며, 희귀 및 멸종위기 수종에 대한 조직배양 연구가 꾸준히 보고되고 있다. 국내에서는 망개나무 (Youn et al. 1992), 산개나리 (Moon et al. 1997), 미선나무 (Moon et al. 1999), 왕자귀나무 (Park et al. 2003), 왕벚나무 (Kim et al. 1993), 피뿌리풀 (Han et al. 2004) 등의 기내번식

*Corresponding author Tel 031-290-1163 Fax 031-290-1020
E-mail: hkmoon@forest.go.kr

Table 1. Effect of cytokinins on shoot proliferation of *Echinosophora koreensis*

Media, mg/L	No. of shoots/explant	Shoot length, cm	Remarks
DKW + BA 0	3.8±0.5	0.9±0.4	Normally expanded leaf
+ BA 0.2	4.5±0.5	1.3±0.6	"
+ BA 0.5	6.7±3.5	1.5±1.1	"
+ BA 1.0	7.3±4.4	1.2±0.6	Smaller size leaf
+ BA 0.5, TDZ 0.01	6.3±3.3	1.0±0.6	Normally expanded leaf
+ BA 0.5, TDZ 0.02	9.7±2.8	0.9±0.6	Smaller and folded leaf
+ BA 0.5, TDZ 0.05	9.7±5.1	0.8±0.5	Hyperhydrated leaf and shoot
+ BA 0.5, TDZ 0.1	8.5±4.3	0.7±0.3	"

연구가 수행되었으며, 외국에서도 조직배양을 이용한 희귀 및 멸종위기 식물의 번식연구가 최근까지 계속되고 있다 (Negash 2002; Rai 2002; Beena and Martin 2003; Gomes et al. 2003; Martin 2003; Chen et al. 2006; Faisal et al. 2007).

본 연구는 아직까지 효율적인 번식법이 연구된 바 없는 개느삼을 재료로 액아 (axillary bud)를 절편으로 줄기를 유도하고, 이 줄기를 재료로 다경줄기를 유도하며, 마지막으로 발근을 통해 식물체를 재생시키는 기내번식 방법을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

표면살균 및 줄기유도

온실에서 자라는 2년생 개느삼의 당년 신초 액아를 절편으로 사용하였다. 절편의 조제는 전정가위로 1~2개의 액아가 포함되게 줄기를 절단하여 500 ml 삼각후라스크에 넣은 다음 tween 20용액을 2~3방울 첨가 후 흔들어 주면서 2시간 정도 수돗물로 세척하였다. 다음 무균상에서 70% 에탄올로 1분간 세척한 후 다시 2% 차아염소산나트륨 (NaClO) 용액을 줄기가 잠길 정도로 붓고 Triton X-100 용액 2~3 방울 첨가하여 10분 정도 흔들어 주면서 표면살균 하였다. 그 후 소독액은 버리고 멸균 증류수로 5회 세척한 다음 액아배양을 실시하여 줄기를 유도하였다. 증식용 배지로는 DKW 배지 (Driver and Kuniyuki, 1984)를 기본으로 탄소원으로 2% sucrose, 경화제로는 0.3% gelrite를 사용하였다.

줄기의 증식

본 시험에서는 예비시험을 통해 MS 배지 (Murashige and Skoog 1962), WPM 배지 (Woody Plant Medium, Lloyd and

Table 2. Effect of auxins on in vitro root induction of *Echinosophora koreensis*

Medium, mg/L	% rooting	% callus formation	% Leaf hyperhydration
1/2DKW + IBA 0	0.0	20.0	20.0
+ IBA 0.2	0.0	30.0	30.0
+ IBA 0.5	0.0	30.0	20.0
+ IBA 1.0	0.0	30.0	30.0
+ NAA 0.2	0.0	10.0	0.0
+ NAA 0.5	9.1	27.3	0.0
+ NAA 1.0	19.2	54.5	0.0
+ NAA 3.0	0.0	100.0	0.0

McCown 1980), DKW 배지 (Driver and Kuniyuki 1984) 가운데 DKW 배지가 개느삼의 아배양에 가장 적합하다는 결과를 얻었으며, 이 배지를 기본으로 줄기의 증식에 미치는 BA 단독처리 혹은 BA와 TDZ의 혼용처리로 증식시험을 실시하였다 (Table 1). 각 배지에는 3% sucrose를 공히 처리하였고, 0.3%의 gelrite로 경화하였다. 배지는 조제 후 ϕ 2.5×15 cm 크기의 유리 시험관에 8 mL 정도 분주하여 상온에서 하룻밤 정도 굳힌 후 사용하였다. 4주간 초대배양 후에는 ϕ 6×11 cm 크기의 유리 배양병으로 옮겨 증식을 도모하였다. 배양환경은 온도는 25±1℃로 유지되고, 1일 16시간 조명 (냉백색 형광등, 40 μ mol m⁻² sec⁻¹)되는 배양실에서 수행하였다. 배양 4주 후 증식된 줄기 수, 길이 등의 성적조사를 실시하고 동일한 배지로 계대배양 하였다.

발근유도

기내 증식 후 약 8주간 배양된 건전한 줄기를 재료로 1/2DKW 배지에 IBA 및 NAA를 농도별로 처리하여 발근에 미치는 효과를 조사하였다 (Table 2). 또한 IBA 100 ppm을

Talc에 섞어 반죽된 형태로 기부에 처리하여 micro-cutting을 실시하였다 (Table 3). 기외삽목시 상토는 버미큘라이트 (vermiculite)를 단독으로 사용하였다. 기외 및 기내발근 유도 배양 환경은 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 가 유지되는 배양실에서 실시하였고, 조명은 1일 16시간의 조명 ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$)으로 유지하였다. 기외삽목 시에는 micro-cuttings 후에 충분히 관수를 하고 식물체의 습도 유지를 위해 투명비닐과 아크릴판으로 덮어주었고, 하루 한 차례씩 관수를 하였으며, 배양 1 주 후부터는 뚜껑을 열어 하루 1~2회씩 환기를 시키고, 3주 후에는 비닐을 제거하고 점차 외부 환경에 순화하였다. 4주 후에 처리에 따른 발근율을 조사하였다.

토양순화 및 포지 이식

발근된 개체는 혼합상토 (버미큘라이트+펄라이트+피트모스, 1:1:1 v/v)가 담긴 포트에 이식하여 온실에서 공중습도를 높게 유지하며 순화를 도모하였다. 6주간 순화 후 성적을 조사하고 생존된 묘목은 야외의 포지로 이식하였다.

Table 3. Root induction by micro-cuttings using in vitro proliferated shoots.

Treatment	% rooting	No. of roots/plant*	Root length*, cm
Cont.	20.9	2.2 \pm 1.3	1.8 \pm 1.2
IBA 100mg/L	58.6	4.5 \pm 2.2	3.0 \pm 1.3

* Mean \pm SD.

결과 및 고찰

70% 에탄올과 2% 차아염소산나트륨으로 액아 절편을 표면 살균하였을 때 오염율은 약 20%로 나타나 개느삼의 액아를 재료로한 초대배양은 큰 어려움이 없었다. 목본류의 기내배양시에는 절편을 주로 야외에서 채취하기 때문에 오염 제거 문제가 흔히 따르게 되는데, 본 실험의 재료는 온실에서 성장하는 개체로부터 재료를 절취하여 오염을 줄일 수 있었던 것으로 생각된다. 배양 1주 후에는 액아로부터 잎의 생장이 시작되었으며 줄기는 신장되지 않고 잎만 자라는 형태를 보였다. 배양 2 주 후에는 줄기의 생장이 시작되었으며 절편의 기부에는 캘러스가 형성되기 시작하였다. 이러한 캘러스는 배양기간이 경과하면서 점차 갈변화 되었다. 절편 기부의 캘러스가 갈변화 되면서 잎은 황화되고 일부 절편에서는 잎이 고사되어 낙엽이 나타났다.

본 시험의 예비실험 결과 개느삼의 액아로부터 줄기의 유도는 DKW 배지가 가장 양호한 것으로 나타났다. WPM 이나 MS 배지에서도 액아로부터 줄기 유도가 가능하였으나 생장이나 증식은 매우 저조한 것으로 나타났다 (데이터 미제시). 반면 DKW 배지에서의 줄기 증식은 매우 양호한 것으로 나타나 본 실험에서는 이 배지를 기본으로 증식에 미치는 생장조절제 효과를 조사하였다. 싸이토키닌의 처리효과는 BA 단독 처리보다 는 BA와 TDZ의 혼용처리가 더욱 효과적인 것으로 나타났다 (Table 1, Figure 1). BA 단독 처리시에는 농도가 증가할수록 줄기의 증식이 촉진되었으며, 1.0 mg/L에서 절편 당 7.3 개의 줄기가 유도되었다. 한편 BA

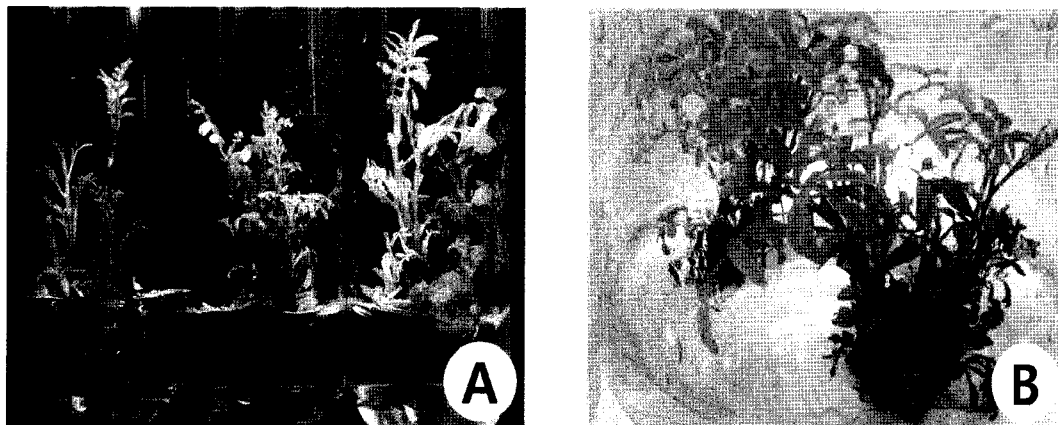


Figure 1. Shoot multiplication via axillary bud cultures of a rare species, *Echinosophora koreensis* N.

A - Growing shoots cultured on DKW medium with 0.2 mg/L BA;

B - Proliferated shoots in big culture vessel containing DKW medium supplemented with 0.2 mg/L BA after 8 weeks in culture.

와 TDZ의 혼용처리는 다경 줄기 유도에 더욱 효과적이었으며, BA 0.5 mg/L + TDZ 0.02 mg/L 혹은 BA 0.5 mg/L + TDZ 0.05 mg/L 처리 구에서 절편 당 9.7개의 줄기가 유도되었다 (Table 1). 기내배양시 증식에 영향을 미치는 성장조절제의 혼용 처리 효과는 wild cherry (Durkovic, 2006) 및 Elm (Conde et al. 2008)의 배양시에도 관찰된 바 있다.

한편 잎의 생장에 있어 BA 단독 처리시에는 농도에 관계 없이 정상적인 잎의 형태를 보였으나, 고농도인 1.0 mg/L 처리시에는 작은 잎으로 성장하였다. BA와 TDZ의 혼용 처리시에는 잎의 크기가 비교적 작고, 특히 0.05 mg/L 및 1.0 mg/L TDZrk 공조 처리된 조건에서는 잎에서 과수화가 관찰되었다 (Table 1). 하지만 동일한 처리조건 하에서도 절편에 따른 차이가 나타났는데 이러한 차이는 유전자형에 따른 차이로 추정되었다. 목본류의 액아배양에서 이러한 모수형에 따른 증식 차이는 여러 수종에서 관찰된 바 있으며 (Lieseback and Naujoks, 2004; Kartsonas and Papafiotou, 2007; Conde et al. 2008) 이로 인해 모수의 특성에 따른 배양조건의 적정화가 요구되는 어려움이 따른다.

개느삼의 액아배양 증식된 줄기의 기내발근은 매우 어려운 것으로 나타났다. Table 2에 제시한 것처럼 발근율은 1.0 mg/L NAA 처리로 20% 미만으로 나타났다. 그리고 발근 과정에서 잎이 노랗게 황화되며 낙엽이 되고 점차 고사하는 것으로 나타났다. IBA 처리시에는 일부 절편의 기부가 다소 부풀어 오르며 캘러스가 형성되었으나 발근은 전혀 이루어지지 못했다. 반면 0.5 mg/L NAA 처리시에는 일부 절편에서 발근이 가능하였고 (Figure 2 A) 뿌리는 1개씩만 내렸다. 그리고 고농도인 1.0 mg/L 처리시에는 기부에 캘러스와 더불어 발근되는 형태를 보였다 (Figure 2 B). 이렇게 캘러스와

더불어 발근된 개체는 차후 포트묘의 순화과정에서 활착되지 않고 대부분 고사되는 것으로 관찰되었다.

따라서 기내증식된 개느삼의 발근은 micro-cutting의 방법으로 기외발근을 유도할 필요가 있었다. 기내발근이 어려운 수종에 있어 이러한 micro-cutting의 방법은 여러 수종에서 발근을 향상을 가져오는 것으로 보고되고 있다 (Lieseback and Naujoks, 2004; Sanjaya et al. 2006; Debnath, 2007).

Table 3에 제시한 것처럼 대조구와 IBA 100ppm 처리로 버미쿨라이트 상토에 삽목하였을 때 대조구에서 20.9%, IBA 처리시 58.6% 까지 발근되어 기내발근에 비해 발근율이 현저히 향상되는 것으로 나타났다. 더욱이 발근된 개체는 절편 당 2~6개의 뿌리가 유도되고 기부에 캘러스도 거의 형성되지 않아 (Figure 3B) 차후 포트묘 육성시 활착이 양호하고 육묘시 성장상태도 좋은 것으로 관찰되었다. 따라서 기내증식된 개느삼의 발근유도는 인공상토로 버미쿨라이트를 사용하여 기외삽목을 실시하면 묘목의 육성이 가능함을 보여주었다. 다만 IBA의 처리로도 발근율이 60% 이하인 점은 앞으로 더욱 개선이 요구되는 부분이다. 이 같은 문제는 기내배양 과정에서 보다 건전한 줄기를 육성하고 다양한 배양토와 발근제의 처리를 통해 발근율 제고를 위한 시험이 요구된다.

한편 발근묘는 토양에 이식하여 온실에서 순화하였을 때 6주 후 95% 이상 생존하였다. 순화묘는 5월 초 포지에 이식하였을 때 정상적인 묘목으로 생장이 가능하였으며, 10월 초 생육조사 결과 91%가 생존하고 묘고는 19~40 cm까지 성장하였다 (Figure 3C). 이러한 조직배양묘는 야외에 식재 후 2년까지 정상 성장하였으며 봄에는 대부분 개화하는 것으로 관찰되었다.

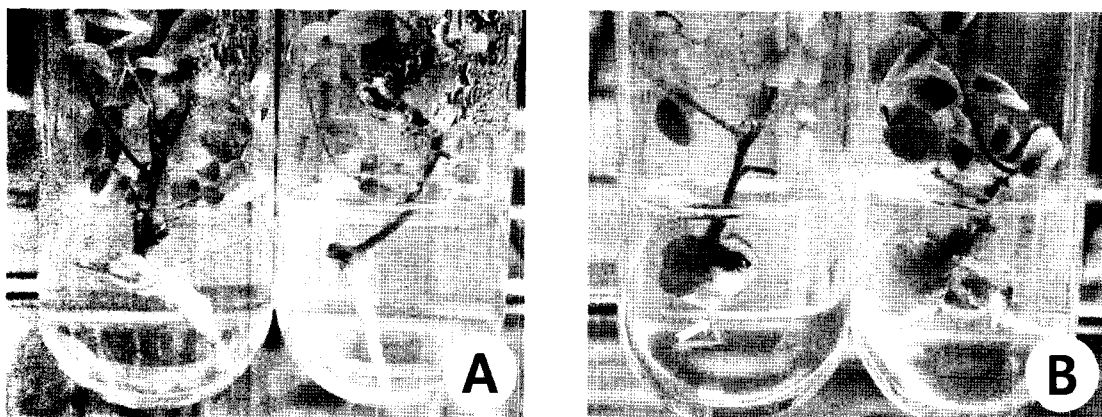


Figure 2. In vitro root induction by the auxin treatment.

A - Direct rooted plants cultured on 1/2DKW with 0.5 mg/L NAA.

B - Callusing and rooted plants on 1/2DKW with 1.0 mg/L NAA (Arrow shows the adventitious roots with callus).

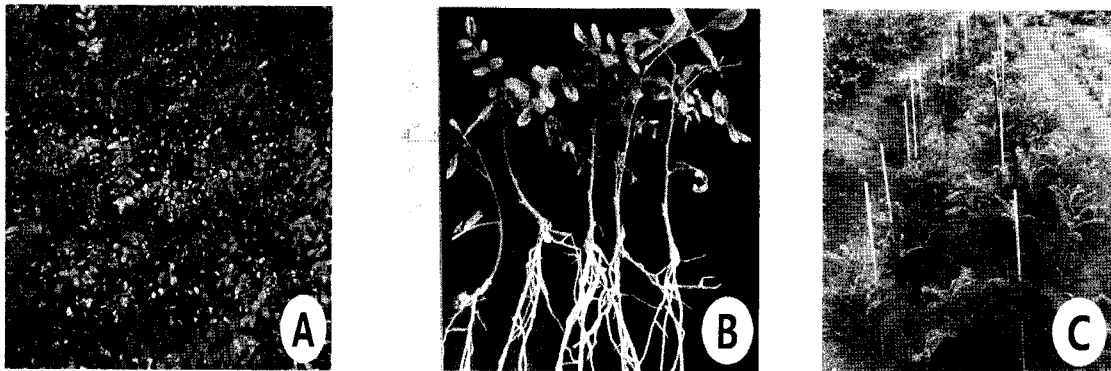


Figure 3. Root induction by micro-cuttings and growing plants in nursery.

- A - Micro-cutting plants on vermiculite soil;
 B - Normally rooted plantlets;
 C - One-year-old plants growing in nursery bed.

적 요

희귀 및 멸종위기 수종 개느삼의 액아배양을 통한 기내증식을 시험하였다. 2년생 개느삼의 액아 줄기를 절편으로 MS, WPM 및 DKW 배지에 배양결과 DKW 배지에서 양호한 성장을 보였다. DKW 배지를 기본으로 BA 단독처리 혹은 BA + TDZ 혼용 처리로 증식시험을 실시하였다. 액아로부터 줄기의 증식은 BA 단독처리보다 BA 및 TDZ의 혼용처리가 효과적이었으며, 절편 당 6~10개의 줄기가 유도되었다. 배양과정에서 비정상적인 줄기나 잎은 나타나지 않았으나 TDZ를 0.05 mg/L 이상 처리시에는 잎이 작고, 전개되지 않았으며 과수화 현상이 나타났다. 증식된 줄기의 기내 발근은 대체로 저조하였다. 1/2DKW 배지에 0.2~1.0 mg/L IBA 처리시 전혀 발근되지 않았으며, 0.5 mg/L 및 1.0 mg/L NAA 처리시 각각 9.1% 및 19.2%의 발근을 보였고, 1개의 뿌리만 내렸다. 반면 개느삼의 발근유도는 기외 micro-cutting의 방법으로 발근율 향상이 가능하였다. 기내증식된 줄기를 재료로 멸균된 인공 상토(버미큘라이트)에 기외 삽목을 실시한 결과 IBA 100 mg/L 처리시 58.6%까지 발근되었고, 뿌리수도 식물체 당 평균 3개가 유도되었다. 이러한 발근모는 온실에서 90% 이상 순화되었고, 포지에 이식하여 2년까지 정상생장이 가능하였다. 본 실험결과는 액아 배양을 통한 개느삼의 기내 줄기증식이 가능하며 micro-cutting의 방법을 좀더 개선하면 효율적인 모목생산이 가능함을 보여주었다.

인용문헌

- Chen IC, Hsia CN, Yeh MS, Agrawal DC, Rsay HS (2006) In vitro micropropagation and ex vitro acclimation of *Bulpleurum kaoi*- an endangered medicinal plant native to Taiwan. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 42: 128-133
- Conde P, Sousa A, Costa A, Santos C (2008) A protocol for *Ulmus minor* Mill. Micropropagation and acclimatization. *Plant Cell Tiss Org Cult* 92: 113-119
- Debnath SC (2007) Influence of indole-3-butyric acid and propagation method on growth and development of in vitro and ex vitro-derived lowbush blueberry plants. *Plant Growth Reg* 51: 245-253
- Driver JA, Kuniyuki AH (1984) In vitro propagation of paradox walnut rootstock. *HortSci* 19: 507-509
- Durkovic J (2006) Rapid micropropagation of mature wild cherry. *Biol Plant* 50: 733-736
- Faisal M, Ahmad N, Anis M (2007) An efficient micropropagation system for *Tylophora indica*: an endangered, medicinally important plant. *Plant Biotechnol Rep* 1: 155-161
- Gomes GAC, Paiva R, Paiva PDO, Santiago EJAD (2003) Plant regeneration from callus cultures of *Maclura tinctoria*, an endangered woody species. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 39: 293-295
- Han MS, Moon HK, Kang YJ, Kim WW, Kang BS, Byun KO (2004) Micropropagation of an endangered species, *Stellera rosea* N. by tissue culture. *Korean J Plant Biotechnol* 31: 31-35
- Kartsonas E, Papafotiou M (2007) Mother plant age and seasonal influence on in vitro propagation of *Quercus euboica* Pap., an endemic, rare and endangered oak species of Greece. *Plant Cell Tiss Org Cult* 90: 111-116
- Kim CS, Koh JG, Cho RM (1993) Effects of media growth
- Beena MR, Martin KP (2003) *In vitro* propagation of the

- regulators and dark treatment on *in vitro* propagation using vegetative buds of *Prunus yedoensis* M. Korean J Plant Tiss Cult 20: 213-219
- Lee YM, Lee WR (1997) Illustrated rare and endangered species in Korea. Korea Forest Research Institute, Jungbu Forest Experimental Station, pp 255
- Liesebach M, Naujoks G (2004) Approaches on vegetative propagation of difficult-to-root *Salix caprea*. Plant Cell Tiss Org Cult 79: 239-247
- Lloyd G, McCown BH (1981) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. Comb Proc Intl Plant Prop Soc 30: 421-427
- Martin KP (2003) Rapid *in vitro* multiplication and *ex vitro* rooting of *Rotula aquatica* Lour., a rare rheophytic woody medicinal plant. Plant Cell Rep 21: 415-420
- Moon HK, Suk GY, Kim SC (1997) Micropropagation of a rare species, *Forsythia saxatilis* N. through tissue culture. J Korean For Soc 86: 430-434
- Moon HK, Suk GY, Kwon YJ, Son SH (1999) Micropropagation of a rare species, *Abeliophyllum distichum* Nakai. via axillary bud culture. Korean J Plant Tiss Cult 26: 133-136
- Murashig T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15: 473-479
- Negash L (2002) Successful vegetative propagation techniques for the threatened african pencil cedar (*Juniperus procera* Hochst. ex Endl.). Forest Ecol. Manag 161: 53-64
- Park SY, Ahn JK, Lee WY (2003) High frequency shoot induction from root segments of *Albizia coreana*. J Korean For Soc 92: 626-631
- Rai VR (2002) Rapid clonal propagation of *Nothapodytes foetida* (Wight) sleumer- a threatened medicinal tree. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 38: 347-351
- Sanjaya, Muthan B, Rathore TS, Rai VR (2006) Micropropagation of an endangered Indian sandalwood (*Santalum album* L.). J For Res 11: 203-209
- Shim KK, Ha YM, Son CJ, Han DS, Lee SA (2006) A study on development of materials for native landscape tree-native area survey and characteristic of Korean endemic plant, *Echinosophora koreensis* Nakai. J Korea Tradition Landscape Architecture Soc 24: 32-42
- Youn Y, Lee SK, Park JI (1992) *In vitro* propagation of a rare species-*Berchemia berchemiaefolia*. Res Rep For Gen Res Inst Korea 28: 63-67

(접수일자 2008년 7월 18일, 수리일자 2008년 8월 7일)