

물박달나무 (*Betula davurica*) 성숙목의 아배양에 의한 기내번식

문지연 · 문흥규*
임업연구원 임목육종부

Micropropagation of Mature *Betula davurica* by Bud Cultures

MOON, Ji Youn · MOON, Heung Kyu

Department of Tree breeding, Forestry Research Institute, Suwon, 441-350, Korea

ABSTRACT This study was undertaken to develop an efficient propagation technique for mature *Betula davurica*. Using aseptic materials taken from *in vitro* culture, the effects of media and plant growth regulators on shoot proliferation and rooting were investigated. DKW medium turned out to be the best in shoot proliferation among the media tested. Whereas axillary buds were better culture material than apical buds in proliferation of shoots, apical buds were slightly better than axillary buds on shoot elongation. Neither 1/2 MS nor WPM medium seemed to be suitable for shoot multiplication or elongation. When the explants were cultured on 1/2 MS medium, shoot elongation was retarded by forming big callus at the base. In the case of WPM, shoots could be formed normally, but they exhibited slow growing. NAA was so effective on *in vitro* rooting that more than 80% rooting could be achieved on half-strength DKW medium supplemented with 1.0 mg/L NAA after 4 weeks in cultures. *Ex vitro* rooting using elongated shoot was also applicable to rooting and acclimatization. Rooted plantlets were successfully acclimatized in an artificial soil mixture and grew normally. The results demonstrate that efficient mass propagation of mature *B. davurica* can be done through tissue culture.

Key words: Adult tree, cytokinin and media effect, regeneration

서 론

물박달나무 (*Betula davurica*)는 자작나무속 수종으로 경기도의 높은 산과 강원 이북에서 자라는 낙엽교목으로 수고가 20 m에 달한다. 목재는 견고하고 치밀하여 베니어 합판제의 생산에 적합하며, 농기구재, 방망이, 조각재, 공예품으로도 각광받는 유용 활엽수종이다 (Lee 1985). 임업연구원에서는 자작나무류에 대한 수형목 선발 및 채종원 조성 그리고 고산 지대에 적합한 수종 및 산지를 선발코져 천연 우량집단을 선발한 바 있다. 최근에는 내공해 수종으로 자작나무류에 대한 관심이 높아지면서 폐광지 등에서의 선발이 확대되고 있다 (임업연구원 미발표 자료). 자작나무류의 번식은 실생번식이

주류를 이루고 있으나 종자의 해결이 문제, 지역이나 채종시기에 따른 종자의 풍흉이 심한 것이 문제점으로 되어 있다. 자작나무류의 무성번식은 수종에 따라 삼목증식 가능성이 보고되고 있으나 실용화 단계에는 아직 이르지 못하고 있다 (Hannah 1988;1990).

그러나 물박달나무를 포함한 자작나무류의 기내배양은 비교적 기내반응이 용이하여 여러 수종에서 기내번식법이 확립된 바 있다 (Chalupa 1981; Ide 1987; Ide and Yamamoto 1990; Ide and Nishikawa 1993; Moon et al. 1991; Perez and Postigo 1989; Srivastava et al. 1985). 자작나무 (Moon et al. 1991), 박달나무 (Kwon et al. 1992), 거제수나무 (Kwon 1993) 등에서는 성숙목에 대한 기내증식을 보고한 바 있는데, 이것은 기내배양을 통해 자작나무류 선발목의 기내번식이 가능함을 보여주는 것이다. 물박달나무에 대한 기내배양은 당년생 신초지를 재료로 한 결과가 발표된 바 있으나 (Lee et al. 1986) 아직 성숙목에 대한 기내배양은 보고된 바 없다. 성숙

*Corresponding author. Tel 0331-290-1199
E-mail jesusmhk@ppp.kornet21.nm.kr

목 특히 형질이 우량한 선발목에 대한 무성번식이 가능하다면 육종계획 하에서 임목의 개량효과를 극대화시킬 수 있는 장점이 있다. 본 연구는 아배양으로 물박달나무 성숙목에 대한 기내번식 가능성을 얻었기에 보고한다.

재료 및 방법

본 시험에 사용된 공시목은 강원도 인제군 남면 천연림에서 선발하였다. 수형이 양호하고 비교적 통직한 단목으로 수령은 50년, 수고 16 m, 흉고직경은 25 cm이었다. 1995년 3월 수관 중하부에서 당년생 신초지를 채취하였다. 재료는 젖은 종이에 싸고 얼음 박스에 넣어 실험실에 운반하고, 4°C 냉장고에 저장한 후 (약 1주일) 배양재료로 사용하였다.

배양조건

절편은 절간이 두 세 개씩 붙도록 절단하여 기존의 방법 (Kwon et al. 1992; Moon et al. 1991)으로 표면살균하였다. 절편은 소독 후 약해를 받은 곳을 잘라내고, 액아가 1~2개씩 붙도록 조제하여 준비된 배지에 치상했다.

증식배지는 DKW (Driver and Kuniyuki 1984), 1/2 MS (Murashige and Skoog 1962) 및 WPM (Lloyd and McCown 1981) 배지를 기본으로 cytokinin은 BAP를 각 1.0 mg/L씩 첨가하였고, 옥신은 IBA (3-indole-butric acid)를 0.05 mg/L 씩 넣었다. 배지의 pH는 5.5~5.8로 조절하였으며, 배지는 0.8% gum agar (Sigma A-1296)로 경화했다. 유리시험관 (2 × 15 cm)에 8 ml씩 분주한 다음, 알루미늄 호일로 밀봉하고, 15기압 121°C에서 15분간 고압멸균 후 사용했다.

발근은 DKW 배지의 염류를 반으로 줄이고 IBA와 NAA를 각 0.2, 0.5, 1.0 mg/L 씩 첨가하여 유도했다. 배양은 온도 25 ± 2°C, 1일 16시간 일장 (40 μmol m⁻² s⁻¹)으로 유지되는 배양실에서 실시했다.

증식에 미치는 배지효과

초대배양 후 기내에서 성장중인 재료를 이용 액아지와 정아지를 구분하여 각각 눈 (bud)이 하나씩 붙도록 절편을 만들어 증식에 영향을 미치는 배지의 효과를 조사하였다. 배지는 DKW, 1/2 MS 및 WPM을 사용했다. 배지 당 30 점씩의 절편을 2 반복 배양하여, 4 주 후 증식된 줄기 수, 잎의 상태, callus 형성 정도를 조사했다.

기내발근 및 순화

증식된 줄기를 재료로 정아가 있도록 2~4 cm로 절단하여 발근을 유도했다. 발근은 염류를 반으로 줄인 DKW 배지에

NAA와 IBA를 0.2, 0.5, 1.0 mg/L의 농도로 조합하여 호르몬별, 농도별 발근 및 근계발달을 조사하였다. 처리별 20 점씩 2 반복으로 처리하였다.

기내발근된 식물체를 인공배양토 (peatmoss:perlite:vermiculite, 1:1:1 v/v)에 이식하여 온실에서 순화시켰다. 이식하기 전 인공 배양토에 L 당 2 mL 씩 4 중 액비 (비왕)를 관수한 다음 식물체를 이식하고, 비닐을 덮어 공중습도를 높게 유지시켰다. 이식 후 3 주간 매일 1 회씩 분무하였으며 3 주 후 비닐을 조금씩 열어주어 외부환경에 적응시키고, 4 주 후에는 비닐을 모두 제거하였다.

결과 및 고찰

액아배양에 의한 기내번식

액아로부터 신초형성 및 생장에 대한 배지효과는 table 1과 같다. 배양 후 3~5일이면 액아가 터지며 신초 생장이 시작되었다. 배양 초기의 신초 형성에 대한 배지효과는 뚜렷치 않았으나 배양기간이 경과하면서 많은 신초 형성과 생장은 배지 간 차이를 나타냈다. 4 주 후의 배양 결과 많은 신초 형성 및 생장은 DKW, WPM, 1/2 MS 순으로 나타났다. DKW 배지에 BAP 1.0 mg/L + IBA 0.05 mg/L를 함께 처리한 조건에서 신초 형성이 3.0 ± 0.6개로 양호하였고, 생장은 WPM의 2 배인 3.3 ± 0.1 cm로 가장 양호하였다. WPM 배지에서는 액아 당 2.0 ± 0.6개 신초가 유도되었으나 생장은 1.6 ± 1.2 cm로 매우 저조하였다. 배지별 줄기상태 및 기부의 callus 형성에도 차이가 나타났다. 1/2 MS에서는 엽이 1 cm 정도로 짧고 원통형에 가깝고, 진녹색이며 거치가 촘촘히 발달하였다. 기부의 callus는 매우 현저히 발달하여, 줄기의 생장에 비해 callus 발달이 큰 특징을 보였다. WPM에서는 엽이 1~2 cm로 길며 거치가 완만히 형성되고, 연녹색을 띠었고, 기부의 callus 형성은 미약하였다. 한편, DKW에서는 엽의 길이가 1~1.5 cm이고, 거치는 WPM과 유사하였으며, 진녹색이고 callus 형성은 보통이었다. DKW 배지에서 줄기생장이 좋은

Table 1. Effect of various media supplemented with 1.0 mg/L BAP and 0.05 mg/L IBA on the shoot proliferation and growth in axillary bud cultures of *Betula davurica*.

Media	No. of explants cultured	No. of shoots induced per explants	Shoot length (cm)	Callus formation
DKW	30	3.0 ± 0.6 ^a	3.3 ± 0.1 ^a	++ ^b
1/2MS	30	1.0 ± 0.2	0.5 ± 0.1	+++
WPM	30	2.0 ± 0.6	1.6 ± 1.2	+

^a Values are mean ± standard deviation of 2 replications per treatment.

^b +, poor; ++, moderate; +++, large callus, respectively.

것은 질소원의 농도가 상대적으로 높은 DKW 배지가 신초 형성에 유리하게 작용했기 때문으로 Hardy and Thorpe (1981)가 담배에서 얻은 결과와 일치한다.

정아배양에 의한 기내번식

액아배양과 동일하게 실시한 정아배양 결과는 table 2와 같다. 액아배양과는 달리 정아 유래 신초는 다소 빠르게 생장이 시작되었으나 4 주 배양 후에는 액아 유래 신초보다 양호하지 못했다. 액아배양에서 처럼 신초 형성과 생장은 DKW 배지에 BAP 1.0 mg/L + IBA 0.05 mg/L 처리 조건에서 양호했으며, WPM에서는 오히려 1/2 MS 배지보다 저조한 결과를 나타냈다. 이러한 차이는 치상시 절편에 따른 차이로 추정되며, DKW 배지에서 양호한 결과는 액아배양의 결과와 같은 경향이였다. 한편 절편체 기부에서는 예외 없이 callus가 형성되어 1/2 MS 배지에서 가장 크게 형성되었고, WPM에서는 저조하였다.

이상의 결과로 볼 때 물박달나무의 액아 및 정아배양은 DKW 배지를 이용함이 적당하다고 판단되며, 절편은 액아가 더 좋다고 생각된다. 그러나, 증식율의 향상을 위해서는 다양한 생장조절 물질별, 농도별의 시험이 요구된다. 동일한 자작나무속의 수종이라 하더라도 기내배양은 수종이나 사용하는 절편, 혹은 위치효과에 따라 적정배지와 생장호르몬의 요구도가 매우 다름이 여러 연구에서 발표되고 있다. Moon 등 (1991)은 자작나무 성숙목 근주 맹아의 증식에서 WPM 배지에 BAP 0.5 혹은 1.0 mg/L 첨가시 가장 양호한 결과를 얻었으며, 물박달나무 유목의 증식에서는 (Lee et al. 1986) WPM 배지에 BAP 2.0 mg/L, NAA 0.01 mg/L 처리로 많은 신초 유도도가 가장 양호했음을 보고하며, BAP 단독처리보다는 NAA와의 혼용처리가 신초 형성에 중요한 요소임을 시사하였다. 본 실험의 액아배양에서는 DKW 배지에 BAP 1.0 mg/L + IBA 0.05 mg/L를 처리한 경우 많은 신초 형성 및 생장이 가장 양호한 바, 배지는 다르지만 생장조절물질의 처리 농도는 비슷함을 보여주었다. 한편 Kwon 등 (1994)은 *Betula costata*의 아배양에서 정아는 DKW 배지에서, 액아는 WPM

Table 2. Effect of various media supplemented with 1.0 mg/L BAP and 0.05 mg/L IBA on the shoot proliferation and growth in shoot tip cultures of *Betula davurica*.

Media	No. of explants cultured	No. of shoots induced per explants	Shoot length (cm)	Callus formation
DKW	30	2.9 ± 0.2 ^a	2.3 ± 0.2 ^a	++ ^b
1/2MS	30	2.3 ± 0.1	1.9 ± 0.2	+++
WPM	30	1.0 ± 0.2	0.4 ± 0.1	+

^a Values are mean ± standard deviation of 2 replications per treatment.
^b +, poor; ++, moderate; +++, large callus, respectively.

배지에서 양호한 것으로 관찰하였는데, 본 실험에서는 정아와 액아가 모두 DKW 배지에서 양호하여 수종에 따라 증식에 영향을 미치는 배지와 생장호르몬의 요구도에 차이가 있음을 보여주었다.

발근유도

발근배지에 배양 1주 후 절편의 기부가 부풀어오르고 callus가 먼저 형성되었으며 절편에 따라서 뿌리를 내리는 것도 관찰되었다. 발근율은 IBA 보다는 NAA 처리가 훨씬 양호하였다. 옥신을 첨가하지 않은 처리구에서는 절편 기부가 약간 부풀며 반응하였으나 발근되지 못했다. 두 가지 옥신 처리 조건에서 발근율은 고농도일수록 양호했으며, 1.0 mg/L NAA 처리시 가장 양호하였으나 고농도일수록 기부에 callus가 커졌고 IBA 처리시 더욱 현저하였다. 기내 발근시 줄기 기부의 callus화는 토양이식 후 뿌리가 썩는 원인으로 보고되는 바, 토양 이식율을 높이기 위해서는 발근시 callus 형성을 억제시킬 필요가 있었다. 자작나무류의 기내 발근은 수종에 따라 다소간 차이가 있는데, Lee 등 (1986)은 GD (Gresshoff and Doy 1972) 배지에 IBA 0.5 mg/L의 고농도 처리시 발근율이 양호함을, Hong 등 (1986)은 거제수나무에서 IBA 0.5, NAA 0.02 mg/L를 함께 처리하여 90% 이상 발근율을 보고하였으며, Kwon 등 (1992)은 박달나무에서 IBA 0.5 mg/L를 첨가한 GD 배지에서 발근 및 근계발달이 우수했음을 보고하였다. 이상의 결과는 본 실험결과와 다소간 차이가 있는데, 이것은 크게는 수종에 따른 차이로 생각되며, 본 실험의 공시목이 선발 당시 50 년생의 성숙목이었기 때문에 이에 따른 성숙 특성으로 인해 발근율의 차이를 가져온 것으로 추측된다. 대체로 성숙목은 그 나무가 가지는 노령효과 (aging effect)를 가져 발근시 흔히 어려움을 나타낸다 (Greenwood 1987). 그러나 본 실험의 결과에서처럼 수개월간 기내배양을 통해 증식된 줄기는 옥신의 처리로 80%까지 발근되는 것으로 보아

Table 3. Effect of IBA and NAA on root induction of microshoots on 1/2 DKW medium.

Auxin (mg/L)	% of root formation	No. of roots induced per explants	Root length (cm)	Callus formation	
IBA	0.0	0 ^a	none	-	+ ^c
	0.2	10	0.1 ± 0.03 ^b	0.9 ± 0.23 ^b	++
	0.5	20	0.3 ± 0.10	1.5 ± 0.36	++
	1.0	40	1.5 ± 0.71	2.0 ± 0.67	+++
NAA	0.2	60	1.1 ± 0.61	2.3 ± 0.66	+
	0.5	70	1.3 ± 0.29	1.5 ± 0.21	++
	1.0	80	4.2 ± 1.23	1.8 ± 0.31	+++

^a Values are percentage of 20 explants (two replication) per treatment.
^b Mean ± standard deviation.
^c +, poor; ++, moderate; +++, large callus, respectively.

(Table 3), 이미 성숙특성이 사라지고 점차 유묘의 특성으로 바뀌는 재유령화 현상이 나타났음을 알 수 있었다. 발근율의 감소는 노령화와 직접적인 관련을 가지는 것으로 이미 여러 논문에서 보고되었다 (Hackett 1985). 이상의 결과로 볼 때 물박달나무 성숙목은 액아나 정아배양으로 기내증식이 가능하다고 사료되며, 클론에 따른 기내반응의 차이는 차후 구명할 필요가 있다. 기내반응이 좋은 클론이 선발된다면 대량증식을 통한 물박달나무의 개량효과를 크게 할 수 있다고 사료된다

적 요

아배양을 통한 물박달나무 성숙목의 기내증식은 DKW 배지에서 양호하였다. 이 배지는 다른 두 배지보다 줄기증식 및 줄기생장이 양호하여 물박달나무의 적정 배지로 생각되었다. DKW 배지에서 액아배양과 정아배양에는 큰 차이는 없었으나 증식에는 액아배양이, 생장에는 정아배양이 다소 양호하였다. 한편 1/2 MS 배지에서는 절편기부에 callus가 직경 1.0 cm 이상 지나치게 형성되어 줄기신장을 억제하였고, WPM에서는 줄기형태는 정상이나 생장이 저조하여 물박달나무의 아배양 배지로는 부적당하였다. 발근은 NAA 처리가 IBA 보다 효과적이었다. 1/2 DKW 배지에 1.0 mg/L NAA 처리로 80%의 기내발근 되었으며 유도된 뿌리수도 많았다. 얻어진 줄기는 직접 기외삽목도 가능하였는데, 이 같은 결과는 물박달나무 성숙목의 효율적인 기내번식이 가능함을 시사한다.

인용문헌

- Chalupa V (1981) *In vitro* propagation of birch (*Betula verrucosa* E.). Biol Plant 23:472-474
- Driver JA, Kuniyuki AH (1984) *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. Hortsci 19:507-509
- Greenwood MS (1987) Rejuvenation of forest trees. Plant Growth Regul 6:1-12
- Greshoff PM, Doy CH (1972) Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). Plant 107:161-170
- Hackett WP (1985) Juvenility, maturation, and rejuvenation in woody plants. Horticult Rev Vol 7:109-155
- Hannah PR (1988) Vegetative propagation of yellow birch from stem cuttings. Tree Planter's Notes (Spring), pp 37-42
- Hannah PR (1990) Survival and growth of yellow birch rooted cuttings on a forest site in Vermont. NJAF 7:94-95
- Hardy EL, Thorpe TA (1981) Nitrogen metabolism in shoot forming tobacco callus. Plant Physiol Suppl 67:7
- Hong SH, Shim SY, Park HS, Kwon OW, Lee SJ (1986) *In vitro* plantlet regeneration from adventitious buds induced on cuttings of peeled twigs of *Betula costa* T. Res Rep Inst For Gen Kor 22:35-39
- Ide Y (1987) *In vitro* clonal propagation of mature Japanese cherry birch. J Jpn For Soc 69:161-163
- Ide Y, Yamamoto S (1990) *In vitro* plantlet regeneration of mature monarch birch (*Betula maximowicziana*) by winter bud culture. J Jpn For Soc 72: 147-150
- Ide Y, Nishikawa H (1993) *In vitro* propagation of *Betula schmidtii* from germinated seedlings. Bull Tokyo Univ For 89:163-169
- Kwon YJ, Youn Y, Lee SK (1992) Clonal propagation of *Betula schmidtii* plus trees by tissue culture. Res Rep For Gen Res Inst Kor 28:48-57
- Kwon YJ (1993) *In vitro* regeneration of plus trees of *Betula costata* by axillary bud culture. MS thesis, Korea Univ, pp 37
- Lee BC, Kim JH, Park JI, Lee SK (1986) Rapid micropropagation of *Betula* spp. through *in vitro* tissue culture. Res Rep Inst For Gen Kor 22:132-138
- Lee TB (1985) Illustrated flora of Korea. Hyangmun Press, pp 267-268
- Lloyd G, McCown B (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain-laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Proc Int Plant Prop Soc 30:412-427
- Moon HK, Youn Y, Hyun YI, Lee SK (1991) *In vitro* propagation using stool shoots of mature *Betula platyphylla* var. *japonica*. J Kor For Soc 80:416-419
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497
- Perez C, Postigo, P (1989) Micropropagation of *Betula celtiberica*. Ann Bot 64:67-69
- Srivastava PS, Steinhauer A, Glock H (1985) Plantlet differentiation in leaf and root cultures of birch (*Betula pendula* Roth.). Plant Sci 42:209-214

(접수일자 1999년 9월 1일)