

## 액아배양에 의한 유묘 및 성숙 히어리나무의 기내번식

문흥규\* · 노은운 · 하유미<sup>1</sup> · 심경구<sup>1</sup>  
임업연구원 생물공학과, 성균관대학교 조경학과

### Micropropagation of Juvenile and Mature Tree of *Corylopsis coreana* by Axillary Bud Culture

MOON, Heung Kyu\* · NOH, Eun Woon · HA, Yoo Mi · SHIM, Kyung Ku

Division of Biotechnology, Forestry Research Institute (KFRI), Suwon, Omokdong 44-3, Gyonggido, 441-350, Korea

<sup>2</sup>Department of Landscape Architecture, Sung Kyun Kwan University, Suwon, Gyonggido, 440-746, Korea

**ABSTRACT** We have developed an *in vitro* micropropagation system via shoot formation from axillary buds using nodal segments of *Corylopsis coreana*. Explants from both juvenile tree (one-year-old greenhouse stock seedlings) and mature tree (ten-years-old tree in nursery) were compared with regard to propagation efficiency. Combined treatment of both BA and zeatin were effective on shoot proliferation since the best result was obtained on MS medium supplemented with 0.5~3.0 mg/L zeatin and 0.2 mg/L BA. Generally, juvenile explants were better in both shoot proliferation and growth than mature explants. However, as the duration of *in vitro* culture was proceeded to 6 months, explants from mature tree also produced three shoots per explant. Distinctive differences in rooting and adaptability to soil of shoots obtained from mother trees. Whereas shoots originated from juvenile explants rooted as high as 97%, those from adult explants showed 62% rooting. Similar result was also observed in soil acclimatization. The plantlets derived from juvenile plants survived 67%, while only 48% of those from adult trees survived. The results showed a possibility of the micropropagation of *Corylopsis coreana* through shoot formation from axillary buds. In addition, the advance of the research still remain to enhance the frequency of acclimatization of plantlets from mature trees for practical application.

**Key words :** Acclimatization, mature tree, seedlings, shoot proliferation

## 서 론

히어리나무가 속한 조록나무과는 전세계적으로 27속 140종이 있으며 주로 동아시아에 분포하고 드물게는 북아메리카, 중앙아메리카에도 분포한다. 히어리속은 29종으로 구성되며 동아시아의 특산으로 중국에 20종, 일본에 5종, 인도에 3종이 있고, 우리나라에는 1종이 자생한다 (Kim 1999). 한국 특산 히어리나무는 이른 봄에 개화하는 밀원식물로서 환경오염에도 강한 것으로 알려져 있으며 앞으로 생태적인 식재 개념에 적

극적인 도입이 기대되는 수종이다. 새로운 조경수의 육종 목표 중 하나는 도시 적응성이 높은 자생수목을 개발하는 것이며, 잎의 형태, 꽃 등이 특징적인 감상가치가 높은 신품종을 개발해야 한다. 그러나 현재 우리나라의 조경수 신수종 개발 기술수준은 초보단계로 산지에서 기본종을 수집하여 증식시키는 단계에서 지역 개체 변이종에 대해 수집하여 기본적인 방법에 의해 번식시켜 보급전 단계에 머무르고 있어서 체계적인 유망종 국내의 선발과 이용성 증대를 위하여 조직배양을 이용한 대량증식 방법의 구명이 필요하다 (Shim and Seo 1996).

히어리나무는 주로 종자로 번식되어 왔으나 품종의 고정 어렵고, 종자의 배휴면성 및 종피 불투수성으로 인해 발아에 2

\*Corresponding author Tel 031-290-1163

E-mail jesusmhk@hanmail.net

년간의 노천매장이 필요하다. 삼목은 유령목을 재료로 녹지삼목이 가능한 것으로 보고되지만 성숙개체의 증식은 어려운 것으로 알려져 있다.

목본류의 조직배양 기법 중 액아배양은 활엽수종 기내번식의 가장 보편적인 방법이 되어왔으며 (Bonga 1987; Thorpe et al. 1991), 포플러류 (Lubrano 1992), 자작나무류 (Meier-Dinkel 1992), 유칼리류 (Gupta and Mascarenhas 1987) 등에서 대량증식을 통한 실용화에 이용되어 왔다. 그러나 히어리나무에 대한 조직배양 연구는 아직 시도된 바 없다. 본 연구는 히어리나무 선발개체의 효율적인 기내 번식법 개발을 목적으로 1년생 및 10년생 히어리나무의 액아배양을 통한 묘목생산이 가능하였기에 보고한다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

1년생 히어리나무는 실험묘로 육성된 것으로 온실에서 15~20 cm로 자란줄기를 사용하였고, 10년생은 입엽연구원의 희귀식물 보존포에서 재료를 채취하였다. 1년생은 당년생 정아 및 액아를 절편으로, 10년생은 5월 중순경에 신초의 줄기가 10~15 cm로 자란 줄기 액아를 절편으로 사용하였다.

### 표면살균

표면살균은 활엽수종의 아배양 (bud culture)시에 일반적으로 사용하는 방법을 사용하였다. 절편은 줄기의 액아가 2~3개씩 붙도록 절단하여 250 mL 후라스크에 약 30개씩 넣고 tween 20 액을 몇 방울 넣어 수돗물로 수회 씻어내었다. 무균상에서 70% 에탄올에 1분, 2% 차아염소산 나트륨 (2% NaClO)에 10분씩 각각 표면 살균한 다음 멸균된 증류수로 4회 씻어 내었다. 표면살균 후 30분 정도 멸균수에 침지한 다음 절편을 조제하여 치상하였다.

### 줄기유도 및 발근

절편은 액아 마디 하나씩을 1.9~2.5 cm 크기로 절단하여 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에 zeatin 1.0 mg/L 및 BA 0.2 mg/L 처리하여 치상하였다. 초대배양 후 4주간의 계대배양 주기로 6개월 간 배양한 다음 증식에 미치는 사이토키닌의 효과를 조사하였다. MS 배지에 zeatin 0.2, 0.5, 1.0 및 3.0 mg/L 단독처리 혹은 zeatin 농도별 처리에 BA 0.2 mg/L를 공히 처리하여 증식에 미치는 효과를 조사하였다 (Table 1). 탄소원으로는 3% sucrose, 배지의 경화는 0.3% gelrite로 하였다. 산도는 5.7로 맞춘 다음 6×11 cm의 배양병에 4개씩 치상하였다. 처리당 5반복으로 처리 당 20점 치상하였다. 발근유

**Table 1.** Effect of cytokinins on shoot proliferation of *Corylopsis coreana* of different ages.<sup>z</sup>

Medium (mg/L)	No. of shoots/explant <sup>y</sup>	
	1-year-old	10-years-old
MS+zeatin 0.2	2.5±1.4	2.1±0.5
+zeatin 0.5	2.8±0.9	2.0±0.8
+zeatin 1.0	2.5±1.5	2.3±0.8
+zeatin 3.0	3.0±0.9	2.8±0.9
MS+zeatin 0.2, BA 0.2	3.2±0.8	2.6±1.0
+zeatin 0.5, BA 0.2	3.9±1.6	3.0±1.0
+zeatin 1.0, BA 0.2	4.1±1.3	2.8±0.8
+zeatin 3.0, BA 0.2	3.9±1.3	3.3±0.8

<sup>z</sup> This experiment was conducted after six months of culture initiation.

<sup>y</sup> Mean number of shoot ± standard deviation.

**Table 2.** Ageing effect of mother tree on *in vitro* rooting of shoots on rooting medium.<sup>z</sup>

Explant source	Rooting rate (%)	No. of roots/explant
1-year-old	97.5	6.5
10-years-old	61.7	2.3

<sup>z</sup> 1/2 MS medium containing 0.5 mg/L NAA.

도는 증식된 줄기를 재료로 1/2 MS + NAA 0.5 mg/L 배지에서 모수령에 따른 발근시험을 수행하였다 (Table 2). 이 발근 배지는 예비시험결과 히어리나무 기내줄기의 발근에서 가장 좋은 결과를 얻은 배지이다.

### 토양이식

기내 발근된 식물체는 온실의 인공상토 (vermiculrite : TKS2 원예용 상토, 3 : 1 v/v)에 이식하여 충분히 관수한 다음 매일 1~2 회씩 간헐적으로 관수하며 온실에서 순화하였다.

## 결과 및 고찰

치상 후 5일부터 액아의 생장이 관찰되었다. 절편의 오염률은 약 10%로 크게 문제되지 않았다 (결과 생략). 절편의 기부에서는 페놀물질로 추정되는 물질의 분비로 배지가 검게 변색되었다 (Figure 1A). 배양 2주 후에는 오염이 안된 절편에서 모두 줄기가 성장되었다. 4주 후 1년생은 액아 당 평균 2개 정도의 줄기가 유도되었으나 10년생은 액아에서 하나만의 줄기가 성장하여 다경유도는 되지 않았고, 성장도 1년생보다 저조하였다 (결과 생략).

초대배양 후 유도된 줄기는 동일한 배지 (MS + zeatin 1.0, BA 0.2 mg/L)에서 4주간의 계대배양으로 6개월간 유지한 다음 증식에 미치는 사이토키닌의 효과를 시험하였다 (Table 1). 줄기증식은 처리호르몬에 따라 효과가 뚜렷하지 않았으나 모

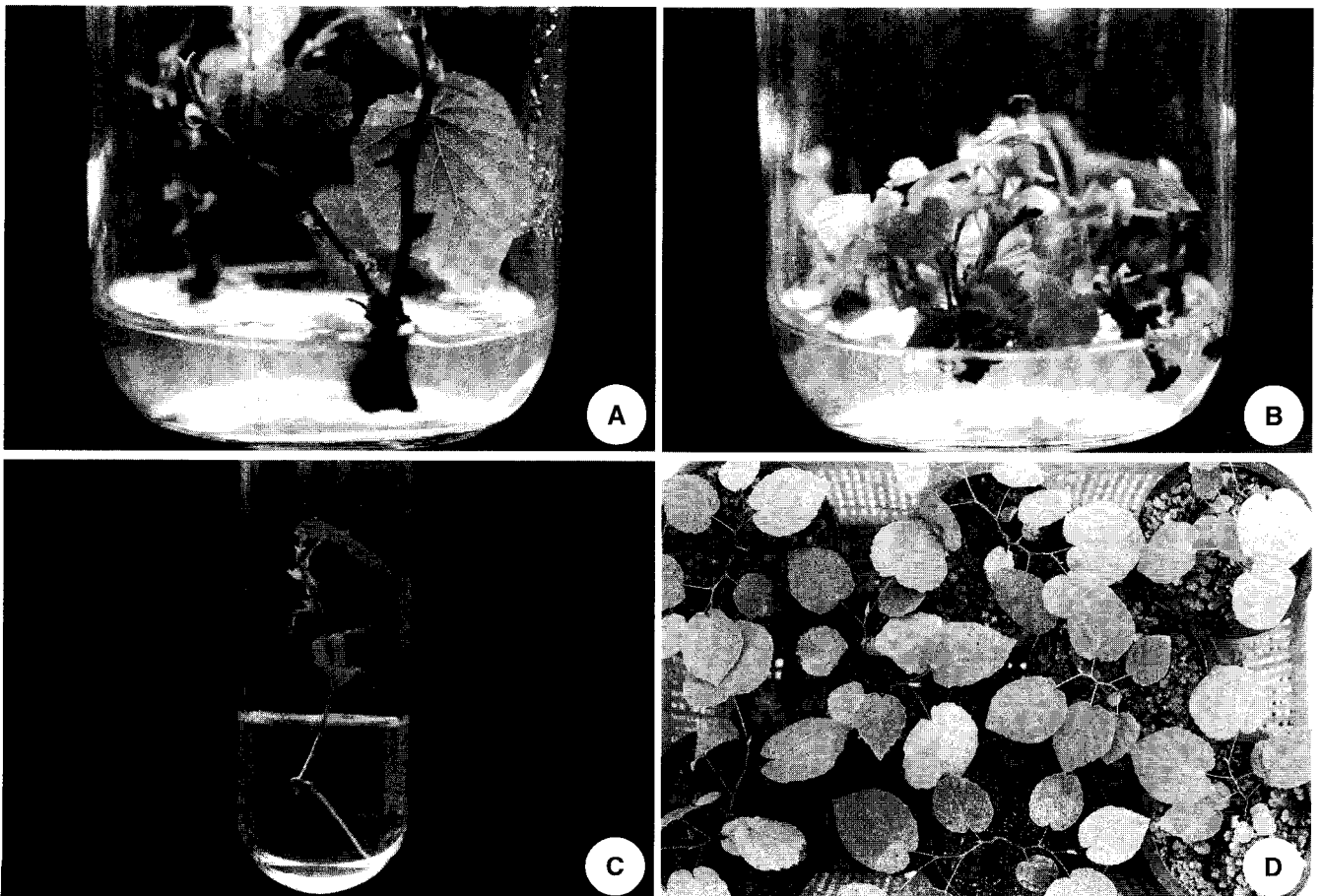
수령에 따라서 다소 차이를 나타냈으며, zeatin 단독처리보다는 zeatin과 BA의 공조처리가 다소 효과적인 것으로 나타났다 (Table 1). 다경 줄기는 주로 절편하부의 액아로부터 형성되었고, 절편기부에서는 직경 5 mm 정도의 캘러스가 형성되었다 (Figure 1B). Zeatin과 BA의 공조처리로 증식에 효과를 보인 것은 두 가지 싸이토키닌의 상승효과 (synergistic effect)가 있었기 때문으로 추정된다. 이같은 결과는 *C. wightii* 선발목의 기내배양에서 kinetin과 BA의 공조처리가 다경유도에 효과가 크고, 발근에는 세 가지 옥신 가운데 IAA와 IBA의 공조처리가 발근에 주효하였다는 Barve와 Mehta (1993)의 결과와 유사하였다.

한편 줄기의 증식과정에서 1년생은 잎의 색깔이 녹색, 적색을 띠는 녹색 혹은 노란색을 띠는 녹색 등 다양하게 나타났다. 이러한 차이는 절편의 재료를 여러 개체의 실생묘에서 채취하였기 때문에 화분 모수의 차이로 인한 특성에 기인하는 것으로 생각된다. 실제로 히어리나무는 잎의 색깔이 녹색, 적색 혹은 노란색 계통으로 다양하게 나타나는 것으로 알려져 있다.

계대배양 후에도 절편기부에서 페놀성 물질로 보이는 검은색의 분비물이 절편에 따라 심하게 나타나 줄기와 잎의 발달

을 저해하였다. 목본식물의 조직배양 특히 참나무류나 밤나무류의 기내배양시 이러한 물질이 많이 형성되는데, 이러한 갈변화 혹은 흑색화의 물질은 주로 산화 폴리페놀 (oxidized polyphenols)과 탄닌 (tannins) 성분으로 구성되며, 줄기의 증식을 억제시키고 심한 경우 절편을 고사시킨다 (Thorpe et al. 1991). 이러한 물질의 제거 혹은 완화시키는 방법으로 ascorbic acid, PVP, activated charcoal의 사용, 새로운 배지로의 계대배양 등이 보고되고 있으나 그 효과는 수종에 따라 다르다. 히어리나무는 증식된 줄기나 캘러스를 절단하여 계대배양할 경우 예외 없이 이러한 현상이 나타나 증식을 위해서는 새로운 배지로 계대배양이 필요하였다. 여러 화학물질의 처리에 의한 페놀성분의 억제는 차후 시험을 요한다. 한편 3~5 cm로 자란 줄기에서는 잎이 고사되거나 괴저가 관찰되었고, 배지에 접촉된 잎에서는 과수화 (hyperhydration) 현상이 나타났으나 증식에는 큰 영향을 미치지 않았다.

증식된 줄기를 NAA 0.5 mg/L가 첨가된 1/2 MS 배지에서 배양하였을 때 발근되었다 (Figure 1C). 그러나 이들은 모수령에 따른 차이가 심하게 나타났다 (Table 2). 모수령의 증가에 따른 발근력 저하는 목본수종에서 보편적인 현상으로 보고되고 있다 (Greenwood 1987; Hackett 1985; Hackett 1987). 본 시



**Figure 1.** Micropropagation of *Corylopsis coreana* by axillary bud culture. A, Elongated shoots from primary explants; B, Proliferated shoots after six months of culture initiation; C, A rooted shoot on 1/2MS medium containing 0.5 mg/L NAA; D, Acclimatized plantlets in the greenhouse.

험에서 6개월간 증식된 줄기를 재료로 시험했음에도 불구하고 10년생에서 발근력이 저조한 것은 아직 기내 줄기가 모수령의 영향을 받고 있음을 간접적으로 나타낸다. 여러 수종의 조직배양에서 반복적인 계대배양은 줄기의 재유령화를 촉진하는 것으로 알려져 있으나 (Arnaud et al. 1993; Arrillaga et al. 1992; Bonga 1987; Greenwood 1987; Hackett 1987), 히어리나무는 성숙목 (10년생)의 액아를 절편으로 6개월의 기내배양으로는 1년생의 발근 효율에는 도달하지 못했다 (Table 2). 그러나 초대배양시 다경유도가 안되던 줄기가 6개월 후에는 절편당 3개 정도의 다경유도가 가능하고 발근율은 60% 이상 이루어져 계대배양을 통한 기내 재유령화가 진행되고 있음을 암시한다. 앞으로 1년생에 상응하는 발근력을 얻기 위해서 어느 정도의 계대배양이 필요한지는 차후 시험을 요한다. 성숙목의 기내배양에서 발근력의 향상은 재유령화 정도를 나타내는 지표가 되는데 이러한 재유령화는 배지에 처리된 싸이토키닌의 영향을 받는 것으로 알려져 있다. Arnaud 등 (1993)은 80년생의 *Sequoia sempervirens*의 기내배양에서 이같은 사실을 확인한 바 있다.

기내배양된 줄기의 효율적인 발근 및 순화는 실용화의 측면에서 매우 중요한 수단이 된다. 그러나 히어리나무의 기내 발근묘는 토양생존율이 비교적 낮게 나타났다. 생존율은 모수령에 따라 차이를 나타내 1년생은 67%, 10년생은 48%만 생존되었다 (Table 3). 이와 유사한 연구를 보면 *Sorbus domestica*의 기내배양 (Arrillaga et al. 1991)에서 유시목은 75~85% 발근되나 성숙목은 30%만 발근되었고, 포지에서의 생존율은 모수령에 관계없이 70%를 나타냈다고 하였으며, *Fraxinus ornus*에서는 유시재료의 발근율은 71%, 성숙목은 50% 이고, 토양에서의 생존율은 70%를 나타내었다고 하였다 (Arrillaga et al. 1992). 이같은 결과는 수종에 따라 발근력 및 순화율의 차이가 있음을 보여주는 것으로 히어리나무의 기내 배양 실용화를 위해서는 토양 생존율을 좀더 향상시킬 필요가 있다.

한편 활착된 묘목은 대부분 사립생장 (plagiotrophic growth) 하는 특징을 보였으며 (Figure 1D), 10년생에서 그 정도가 더 심하였다. 이러한 사실은 모수령 및 절편의 채취 부위에 따른 위치효과가 작용하고 있는 것으로 추정된다. 조직배양묘의 사립생장에 대한 연구로서 Timmis 등 (1992)은 Douglas-fir의 기내배양에서 배양묘의 사립생장은 뿌리의 비정상적 발달과 연관이 있다고 하였으며, 오리나무류와 자작나무류 성숙목의

기내배양묘에서는 이러한 사립생장이 나타나지 않았다고 하여 수종에 따른 차이를 보여주었다 (Perinet et al. 1988; Meier-Dinkel 1992).

1년생의 히어리나무 배양묘에서 사립생장을 보인 것은 절편의 위치효과나 모수령의 효과가 작용한 것으로는 보이지 않으나, 이러한 사립생장의 원인이 Timmis 등 (1992)이 제시한 뿌리의 비정상적 발달에 기인하는 것인지는 차후 시험이 요구된다. 이상의 결과로 히어리나무의 기내배양은 유묘 및 10년생 모수의 액아배양으로 대량증식이 가능하다고 생각되지만 성숙목의 선발개체를 증식하기 위해서는 배양조건의 적정화 특히 재유령화를 촉진시키는 기술과 발근 및 순화율을 좀더 증진시켜야 할 것으로 생각된다.

## 적 요

히어리나무 1년생 및 10년생을 재료로 액아배양을 통한 기내번식을 시험하였다. 줄기의 증식은 zeatin과 BA의 공조처리가 효과적이었으며 MS배지에 zeatin 0.5~3.0 mg/L, 0.2 mg/L BA 처리시 주효하였다. 1년생이 10년생보다 전반적으로 증식 및 생장이 양호하였으며, 배양 6개월 후에는 10년생에서도 매월 절편 당 3개의 줄기유도가 가능하였다. 기내 줄기의 발근은 1년생은 97%, 10년생은 62%를 나타내었고, 토양이식시 1년생 유래 배양묘는 67%, 10년생은 48% 생존되어 모수령에 따른 차이를 나타냈다. 본 실험결과 히어리나무의 액아배양으로 유시, 성숙목의 대량번식이 가능함을 보여주었으나 선발개체의 효율적인 기내번식을 위해서는 재유령화의 기술개발과 토양순화율을 증진시켜야 하는 것으로 나타났다.

사사-본 연구는 농림부 농림기술관리센터에서 지원된 농특첨 단과제 (1999~2002)의 연구비의 일부로 수행되었다.

## 인용문헌

- Arnaud Y, A Francllet, H Tranvan, M Jacques (1993) Micropropagation and rejuvenation of *Sequoia sempervirens* (Lamb) Endl: a review. *Ann Sci For* 50:273-295
- Arrillaga I, T Marzo, J Segura (1991) Micropropagation of juvenile and adult *Sorbus domestica* L. *Plant Cell Tiss Org Cult* 27:341-348
- Arrillaga I, V Lerma, J Segura (1992) Micropropagation of juvenile and adult flowering ash. *J Amer Soc Hort Sci* 117:346-350
- Barve DM, AR Mehta (1993) Clonal propagation of mature elite trees of *Commiphora wightii*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 35:237-244
- Bonga JM (1987) Clonal propagation of mature trees: problems and

**Table 3.** Survival rate of rooted plantlets after transplanting onto artificial soil mixture (vermiculite:TK S2, 3:1 v/v) after one month of cultivation.

Explant source	No. of plantlets transplanted	No. of plantlets survived (%)
1-year-old	1,366	908 (66.5)
10-years-old	250	120 (48.0)

- possible solutions. In : JM Bonga and Don J Durzan (eds.), Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol 1. Martinus Nijhoff Pub, pp 249-271
- Greenwood MS** (1987) Rejuvenation of forest trees. Plant Growth Regul **6**:1-12
- Gupta PK, AF Mascarenhas** (1987) *Eucalyptus*. In : JM Bonga and Don J Durzan (eds.), Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol 1. Martinus Nijhoff Pub, pp 385-399
- Hackett WP** (1985) Juvenility, maturation, and rejuvenation in woody plants. Horticult Rev **7**:109-155
- Hackett WP** (1987) Juvenility and maturity. In : JM Bonga and Don J Durzan (eds.), Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol 1, Martinus Nijhoff Pub, pp 216-231
- Kim TW** (1999) The woody plants of Korea in color. Kyohak Pub. Co., Seoul, Korea, pp 158-159
- Lubrano L** (1992) Micropropagation of poplars (*Populus* spp.). In : YPS Bajaz (ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry 18, Springer-Verlag Press, pp 151-178
- Meier-Dinkel A** (1992) Micropropagation of birches (*Betula* spp.). In : YPS Bajaz (ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry 18. Springer-Verlag Press. pp 40-81
- Murashige T, F Skoog** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant **15**:473-497
- Perinet P, G Vallee, FM Trembley** (1988) *In vitro* propagation of mature trees of *Alnus incana* (L.) Moench. Plant Cell Tiss Org Cult **15**:85-89
- Shim, K. K, B. K. Seo** (1996) Korean Native Shrubs and Vines in North America Landscape. J Kor Flower Res Soc **4**:37-62
- Thorpe TA, IS Harry, PP Kumar** (1991) Application of micropropagation to forestry. In : PC Debergh and RH Zimmerman (eds.), Micropropagation, Kluwer Academic Pub, pp 311-336
- Timmis R, GA Ritchie, GS Pullman** (1992) Age and position-of-origin and rootstock effects in Douglas-fir plantlet growth and plagiotropism. Plant Cell Tiss Org Cult **29**:179-186

(접수일자 2002년 3월 14일)