

미류나무 성숙 절간조직으로부터 식물체 증식

강호덕*, 양희선¹⁾

동국대학교 생명자원과학대학 산림자원학과, ¹⁾환경부 국립환경연구원 환경연수부

Shoot Regeneration of Mature Nodal Segments in Poplar (*Populus deltoides*)

Hoduck Kang* and Hee-Sun Yang¹⁾

Forest Biotechnology Lab., Department of Forest Resources, Dongguk University, Seoul 100-715,
Republic of Korea

¹⁾Education Department, National Environment Research Institute, Ministry of Environment, Seo-gu,
Incheon 404-170, Republic of Korea

ABSTRACT

Mature nodal segments of 2-year-old greenhouse stock plant were cultured on Murashige and Skoog basal medium supplemented with the different kinds and various concentrations of cytokinins to produce multiple shoots in *in vitro* condition. The most adventitious shoots were produced from excised ends of nodal segments. The highest average number (24.6 ± 4.6) of shoots was produced with the combination of BA 1.0_{mg}/L and TDZ 0.1_{mg}/L in MS medium. In addition, several shoots were formed from lenticels of bark cambium with the same treatment. These concentrations promoted high shooting capability upto 94.6% and NAA was the best cytokinin among five different PGR sources.

Key words : adventitious shoot formation, lenticel, mature nodal segment, *Populus deltoides*.

서언

임목의 형질을 개량하기 위해 생물공학적인 방법을 널리 적용하고 있다. 하지만 임목은 단년생 식물과는 달리 성숙목으로부터의 재분화율이 매우 낮기 때문에 기내에서 조직배양을 위한 기초 연구가 필요하다. 일반적으로 식물체의 재생은 액아 또는 부정아를 통한 기관형성과정으로부터 발생한다. 기내에서 액아를 유도하기 위해서는

식물시료로서 정아 또는 절간조직을 사용하여 식물체를 형성시킨다. 하지만 대부분의 임목이 단단한 목질층으로 구성되어 있어서 조직배양시 유행화가 어렵고 외부로부터 오염물질을 제거하는데 어려움이 많다.

포플러속은 임목의 생물공학 적용에 가장 널리 이용되고 있는 수종으로 액아배양(Coleman and Ernst, 1990), 절간줄기(Douglas, 1984), 뿌리(Son and Hall, 1990a), 캘러스

*교신저자 : E-mail : HDK0225@dongguk.edur

(Son and Hall, 1990b) 시료를 이용하여 식물체를 재생시킨 바 있다. 일반적으로 포플러류는 기내조직배양이 용이하지만, 수종마다 반응이 다양하기 때문에 대량증식 및 유전자 형질전환을 통한 신품종 육성을 위해서는 기내에서의 기초연구가 필수적이다.

최근 들어와서 임목의 기내대량증식을 위해 cytokinin류의 식물생장조절물질인 thidiazuron을 널리 활용하고 있다. 특히, 이 물질은 성숙 임목을 대상으로 기내번식율의 효율성을 높이는데 널리 활용하고 있다(Mok *et al.*, 1987). 임목을 대상으로 thidiaduron을 이용하여 식물체 재생과 관련된 연구를 살펴보면, *Acer saccharinum*(Preece *et al.*, 1991), *Fraxinus americana*(Navarrete *et al.*, 1989), *Robinia pseudoacacia*(Chalupa, 1987), *Vitis vinifera*(Gribaudo and Fronda, 1991) 등의 임목을 대상으로 기내대량증식 체계가 확립된 바 있다. 하지만 이 식물생장조절물질을 포플러에 적용하여 식물체를 재생시킨 연구는 미미한 실정이다(Kang *et al.*, 2004).

포플러는 속성수로서 조림후 5-7년이면 수확이 가능한 수종으로 북미, 유럽, 중국 등에서 널리 식재되고 있다. 특히 포플러는 종다양성이 풍부하여 체세포변이체 유도를 통한 환경수종 개발에 널리 활용되고 있는 수종이기도 하다. 본 연구에서 이용한 미류나무류는 포플러중에서 가장 빨리 자라는 속성수인 동시에 재질이 우수하고, 병충해에 저항성이 뛰어나 교잡육종에 널리 활용하고 있는 수종이다. 하지만 포플러 교잡종은 기내 조직배양시 식물체 형성이 용이하지만 미류나무류는 기내로 도입하기가 매우 까다롭고 식물체 재생이 매우 어려운 수종이어서 식물체 증식을 위한 새로운 연구개발이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 기내 식물체 증식방법으로 기내에서 유령화된 식물체가 아닌 온실에서 목화된 줄기에서 대량의 식물체를 유도하는 방법을 구명하였다. 본 연구결과는 향후 포플러 순계 유도 및 장기 클론보존 및 유전자 형질전환 연구에 기초 자료를 제공할 것으로 판단된다.

재료 및 방법

온실에서 생육중인 2년생 미류나무 줄기를 절단하여 기내조직배양 시료로 활용하였다. 온실내의 stock 식물은 25℃ 명상태에서 16시간, 암상태에서 8시간 유지시키고, 하루에 2번 수분을 공급하였고, 일주일 단위로 복합비료(20N : 10P : 20K, Peters Fertilizer Products, W. R. Grace and Co., Allentown, PA)를 투여하여 생장을 촉진시켰다. 채취된 측지에서 잎을 제거하고 절간마디를 70% 에탄올에 1분간, 1% 차아염소산나트륨(sodium hypochlorite)에 40분 동안 표면 살균하고 멸균증류수로 4-5번 세척한 후 조직배양 시료로 이용하였다.

조직배양시 측아를 포함시키지 않은 생육이 왕성된 절간 마디만을 선별하여 시료를 식물조직배양용 Petri-dish(87×20mm)에 치상하였다. 본 실험에서 사용한 배지는 MS(Murashige and Skoog, 1962)를 기본으로 3% sucrose, 0.3% gelrite를 첨가하여 121℃에서 20분간 고온 멸균한 후 시료를 치상하였다.

절간조직으로부터 다경줄기를 유도하기 위해 MS 배지에 cytokinin류의 식물생장조절물질인 BA, zeatin, thidiazuron을 단독 또는 혼용처리하여 대량증식배지로 사용하였다. 식물체 유도시 절간마디에는 정아우세 현상을 방지하기 위하여 측아가 없는 줄기를 사용했으며, 절간 마디를 2-3 cm로 절단하여 시료가 배지에 접촉하도록 치상하였다. 시료는 5개의 Petri-dish(87×20mm)에 5개씩 치상하였고 6개의 반복시험을 실시하였다. 배양조건은 23℃의 식물배양기에서 16시간 광조건(40 μ m²s⁻¹), 8시간 암조건에서 6주간 배양한 후 유도된 부정아울을 조사하였다.

절간조직의 부정아에서 6주동안 증식된 유식물체는 auxin류인 NAA, IBA, IAA 0.02 mg/L, 또는 cytokinin류인 kinetin, 2-iP 1.0 mg/L가 함유된 1/2 MS배지에서 4주동안 뿌리가 유도되었다. 줄기 신장이 이루어진 유식물체는 multi-cap 및 cell-tray로 이식하여 식물체

경화를 유도하였다. 조사된 data는 GLM (General Linear Model) 프로그램을 이용하여 통계처리하여 분석하였다.

결과 및 고찰

기내 대량증식

다양한 cytokinin을 처리하여 배양후 2주후에 줄기의 유도과정을 관찰할 수 있었다. 본 실험에서 사용한 시료인 절간줄기의 형성층 조직과 피목간의 식물체 형성과정 양상이 다르게 나타났다. 대량증식을 위해 이용한 줄기와 피목간에 ($P < 0.05$), PGR 농도에 있어서 식물체 형성에 영향을 미쳤다($P < 0.01$). 줄기 절간조직에서는 BA 1.0 ± TDZ 0.1 mg/L가 혼합으로 투여된 MS배지에서 24.6 ± 4.6개의 식물체를 형성시

켰다(Fig. 1 A, D). PGR 단일처리에서는 BA와 zeatin간에는 식물체 형성에 큰 차이가 나타나지 않았으나, TDZ를 처리했을 경우 TDZ 0.1-0.2 mg/L 저농도에서 두배정도의 식물체가 형성되었다(Table 1).

식물체 형성과정을 관찰한 결과 피목에서는 BA 1.0 ± TDZ 0.1 mg/L가 함유된 MS배지에서 가장 많은 식물체를 형성시켰다(6.4 ± 1.4, Fig. 1 B, C). 뿐만 아니라 대부분의 식물체는 시료의 형성층과 피목부분에서 주로 형성되었으나, 몇몇 식물체는 배지와 접해있는 형성층에서 형성되어 과수화(hyperhydration) 형태를 보였다(Fig. 1 E). 식물시료에서 증식율을 조사한 결과 형성층의 경우 zeatin 보다는 BA, TDZ의 단일 처리에서 높게 나타났다. 피목의 경우에는 cytokinin의 단일처리보다는 BA와 TDZ를 혼용처리한 배지에서 높은 증식율

Table 1. Effect of plant growth regulators on shoot formation from mature stem explant of *Populus deltoides* after 1 month of culture

Plant Growth Regulators (mg/L)	Cambial surface		Lenticel area	
	% of shooting	No. of shoot	% of shooting	No. of shoot
Control	8.0	0.5 ± 0.2	-	-
BA 0.2	82.4	5.8 ± 1.2	26.2	2.2 ± 1.0
1.0	96.2	8.4 ± 2.6	42.6	2.0 ± 0.8
2.0	100.0	8.6 ± 2.2	42.6	1.8 ± 0.8
Zea 1.0	64.8	3.2 ± 1.0	22.0	0.4 ± 0.2
2.0	75.6	3.0 ± 0.8	24.6	0.8 ± 0.2
5.0	82.4	6.8 ± 2.0	44.8	0.8 ± 1.0
TDZ 0.1	92.6	10.2 ± 1.8	42.0	4.6 ± 0.6
0.2	92.6	10.6 ± 1.6	42.0	4.6 ± 1.2
0.5	100.0	6.6 ± 0.8	12.8	2.2 ± 1.0
BA 0.2 + TDZ 0.01	96.2	16.2 ± 2.2	68.8	3.6 ± 0.6
BA 1.0 + TDZ 0.1	94.6	24.6 ± 4.6	82.2	6.4 ± 1.4
BA 2.0 + TDZ 0.2	84.6	18.4 ± 3.4	86.6	3.3 ± 1.0
Zea 2.0 + TDZ 0.05	75.2	13.4 ± 2.8	44.6	1.2 ± 0.4
Zea 2.0 + TDZ 0.2	82.4	11.6 ± 2.4	48.8	2.8 ± 0.2
Zea 2.0 + TDZ 0.5	60.8	8.2 ± 0.6	21.6	0.4 ± 0.2

을 나타냈다(Table 1).

지금까지 보고된 포플러 기내조직배양을 살펴보면 aspen, *Populus deltoides* x *P. nigra* 를 대상으로 BA가 첨가된 MS배지에서 줄기배양을 시도한 바 있으나, 교잡종이 아닌 미류나무류(*Populus deltoides*)의 경우 기내 재분화에 어려움이 있다(Whitehead and Giles, 1977; Douglas, 1984; Nadel *et al.*, 1992; Kang and Hall, 1996). 미류나무 종의 몇몇 클론을 이용하여 절간줄기를 대량증식 시킨 결과, 클론간에 대량증식율에 있어 큰 차이를 보였다(Coleman and Ernst, 1990). 앞의 연구에서는 기내 조직배양시 유령화된 식물체를 증식 시료로 이용하고 cytokinin류로서 BA를 첨가하여 식물체를 재생시켰으나, 본 연구에서는 온실에서 생육중인 성숙목을 직접 시료로 사용하여 증식절차를 간편화시키고, 최근 들어와 널리 이용하고 있는 TDZ를 기타 PGR과 혼용처리하여 식물체 유도율을 향상시켰다.

임목을 대상으로 한 기내배양은 초본식물과는 달리 탈분화가 어려워 재분화율이 매우 낮은편이다. 특히, 임목의 기내배양은 배지 및 식물성장 조절물질 등의 배양조건에 영향을 받고 있어 이들에 대한 기초 연구가 필수적이다. 따라서 본 연구에서 최근에 널리 활용하고 있는 식물성장 조절물질인 TDZ를 첨가하여 식물체를 기내에서 증식시켰다. 위 연구에서 대량증식에 사용된 시료인 절간마디에서 대부분의 식물체가 형성층을 중심으로 유도되었으나, 피목에서도 몇몇 신초가 유기되었다. 임목조직배양시 대부분의 식물체는 액아(axillary bud)를 중심으로 유기되지만, 본 실험에서 이용한 시료는 측아가 없는 절간조직이어서 정아우세 현상이 억제되어 대량의 신초가 형성층 또는 피목에서 유도된 것으로 판단된다.

지금까지 보고된 임목조직배양에 TDZ 활용한 연구는 *Acanthopanax*(Preece *et al.*, 1991), *Fraxinus*(Navarrete *et al.*, 1989), *Robinia*(Chalupa, 1987) 등의 수종

으로 제한되어 있을 뿐만 아니라, 성숙한 줄기를 사용하여 대량증식에 성공한 연구는 *Robinia*(Han *et al.*, 1993) 등에 한정되어 있다. 성숙시료를 이용한 연구에서는 23-26년생 아까시나무 임목에서 가지를 제거하여 조직배양 시료로 사용하여 callus 재분화 과정을 통하여 식물체를 유기시킨 바 있다.

기내 발근유도

6주간 증식배지에서 유지된 줄기(2-3 cm)는 발근유도를 위해 1/2 MS배지로 이식하여 줄기를 신장시켰다. 본 실험에서는 MS배지를 기본으로 발근촉진을 위해 auxin류인 NAA, IBA, IAA 0.02 mg/L, 또는 cytokinin류인 kinetin, 2-iP 1.0mg/L를 투여하여 처리한 후 기내에서 4주간 줄기를 신장시켰다. 줄기신장에는 다양한 처리중 NAA와 IBA에서 90% 이상의 발근이 촉진되었다(Fig. 1 F). 반면에 cytokinin류를 처리한 시료에서는 50% 이하의 낮은 발근율을 나타냈다.

식물체 경화

4주간 신장된 유식물체는 multi-cap에 이식하여 식물체 경화를 유도하였다. 본과정은 식물체의 건조를 막기 위해 피음 상태의 mist-bay에서 2주간 진행되었다(Fig. 1 G). 줄기신장이 이루어진 식물체를 곧 바로 온실에 이식할 경우 습도유지가 어려워 multi-cap과 같은 수분유지 시설이 필요하다. 식물체의 경화과정이 끝나고 식물체 육성의 마지막 단계로서 식물체를 cell-tray로 이식하여 8주간 온실에서 성장시켰다(Fig. 1 H). Cell-tray에는 peatmoss : vermiculite : perlite를 1 : 1 : 1로 혼합하여 인공토양으로 활용하였다. 8주간 온실에서 생육 후 생존율을 조사한 결과 98% 이상의 생육상황을 나타냈다.

본 연구결과, 일반적으로 임목조직배양시 목화된 식물체를 유령화 과정을 기내에서 거친 시료를 이용하여 대량증식에 이용하지만, 본 연구

에서는 온실에서 삼목묘로 육성된 2년생 줄기를 직접 사용하여 대량증식과정을 단순화시켰다. 뿐만 아니라 조직배양묘 경화시 multi-cap을 이용하여 생존율을 향상시킬 수 있었다.

적요

미류나무 절간조직(2년생)을 이용하여 식물생장조절물질이 함유된 MS배지에서 대량의 식물체를 증식시켰다. 대부분의 식물체는 BA 1.0 +

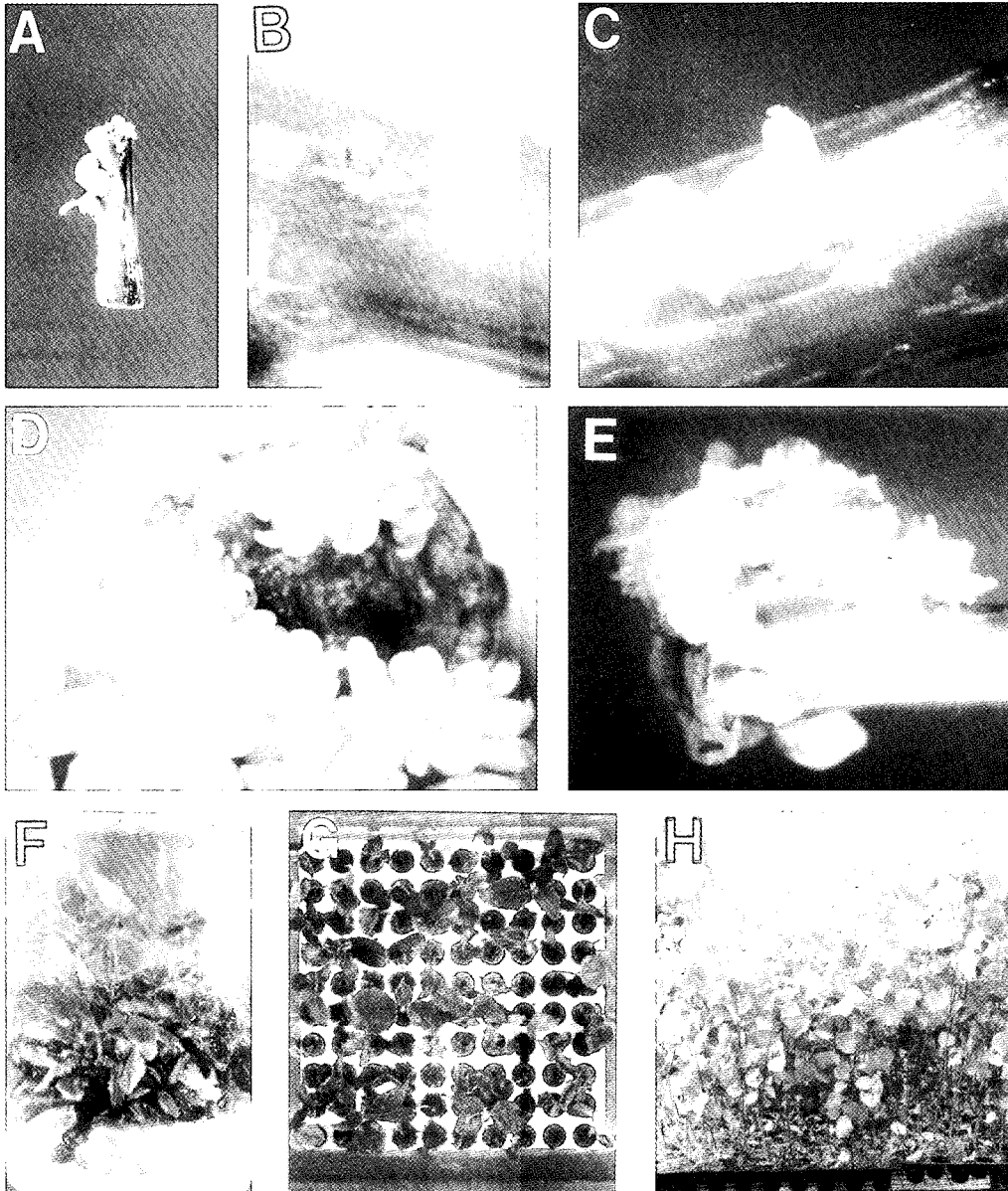


Fig. 1. Shoot proliferation from nodal segments in *Populus deltoides*. (A) shoot initiation from cambial surface, (B) shoot initiation from lenticel tissue, (C) shoot elongation of tiny shoots in lenticel, (D) shoot formation from bark cambium, (E) adventitious bud formation in basal stem of explant, (F) shoot elongation in MS medium supplemented with NAA 0.02 mg/L, (G) hardening plantlets in mini-cap, (H) plant growth in greenhouse

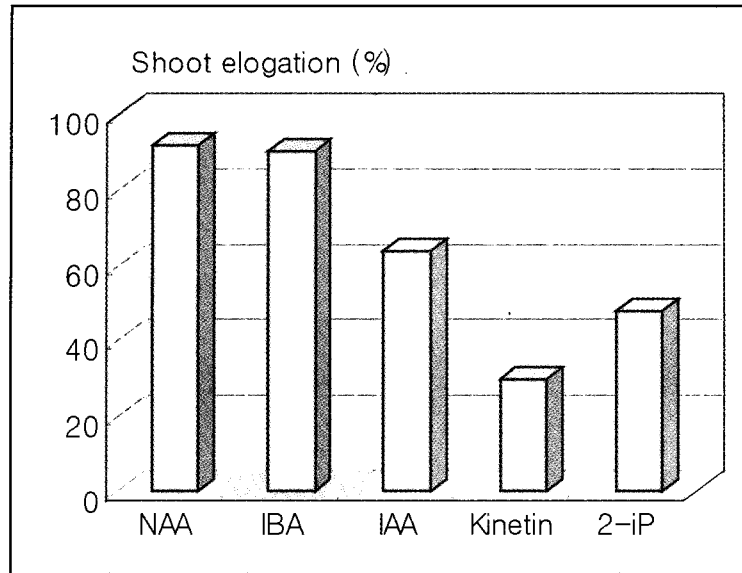


Fig. 2. Elongation of multiple shoots induced from nodal segments in *Populus deltoides*. NAA, IBA, and IAA 0.02 mg/L, kinetin and 2-iP 1.0 mg/L.

TDZ 0.1 mg/L가 함유한 배지에서 줄기의 형성층 부분에서 절편당 24.6 ± 4.6개의 줄기가 유도되었으며, 몇몇 줄기는 피복 부분의 조직에서 유도되었다. 신장된 줄기는 NAA 0.01 mg/L가 포함된 배지에서 94.6%의 발근이 이루어졌다. 신장된 줄기의 발근은 식물생장조절물질에 따라 차이를 보여 NAA와 IBA에서 90% 이상의 발근이 촉진되었으나, cytokinin류를 처리한 시료에서는 50% 이하의 낮은 발근율을 나타냈다. 발근된 유식물체는 cell-tray의 인공상토 (peatmoss : vermiculite : perlite = 1 : 1 : 1)에 이식하여 8주간 생육후 98%의 높은 생존율을 나타냈다. 본 연구결과, 2년생 미루나무류의 줄기에서 직접 대량의 줄기를 유도하여 대량증식과정을 단순화 시켰을 뿐만 아니라 조직배양묘 경화시 multi-cap을 이용하여 생존율을 향상시킬 수 있었다.

사사

본 연구는 환경부 환경기술진흥원 차세대핵심

환경기술개발사업(2002. 6. 1 - 2005. 5. 31) 연구비 지원에 의해 수행되었음을 알립니다.

인용문헌

- Chalupa, S.C.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, G.D. and S.G. Ernst. 1990. Axillary shoot proliferation and growth of *Populus deltoides* shoot culture. Plant Cell Rep. 9:165-167.
- Douglas, G.C. 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.
- Gribaudo I. and A. Fronda. 1991. Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated *in vitro*. Hort. Science 26:1083.
- Han, K.H., D.E. Keathley and M.P. Gordon. 1993. Cambial tissue culture and subsequent shoot

- regeneration from mature black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). Plant Cell Rep. 12:185-188.
- Kang, H. and R.B. Hall. 1996. Shoot proliferation from *in vitro* nodal cultures of cottonwood hybrid (*Populus deltoides* X *P. nigra*). Kor. J. Plant Tiss. Cult. 23:39-44.
- Kang, H., H.K. Moon and M.S. Lee. 2004. Effect of TDZ (Thidiazuron) on shoot proliferation of Peace poplar. Kor. J. Plant Biotechnol. 31:49-53.
- Mok, M.C., D.W.S. Mok, J.E. Turner, and C.V. Mujer. 1987. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. Hort. Sci. 22:1194-1196.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15:473-497.
- Nadel, B.L., G. Hazanm, R. David, A. Hutterman and A. Altman. 1992. *In vitro* propagation of *Populus* spp. Plan. Sci. 77:111-118.
- Navarrete, N.E., J.W. Van Sambeck, J.E. Preece and G.R. Gaffney. 1989. Improved micropropagation of white ash (*Fraxinus americana* L.). Proc. 7th Central Hardwood Forest Conference, Carbondale, IL. pp 146-149.
- Preece, J.E., C.A. Huettelman, W.C. Ashby and P.L. Roth. 1991. Micro- and cutting propagation of silver maple. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116:142-148.
- Son, S.H. and R.B. Hall. 1990a. Multiple shoot regeneration from root organ culture of *Populus alba* x *P. grandidentata*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 20:53-57.
- Son, S.H. and R.B. Hall. 1990b. Plant regeneration capacity of callus derived from leaf, stem, and root segment of hybrid poplar (*Populus alba* X *P. grandidentata* Michx.). Plant Cell Rep. 9:344-347.
- Whitehead, H.C.M. and K.L. Giles. 1977. Rapid propagation of poplars by tissue culture methods. N.Z.J. For. Sci. 7:40-43.

(접수일 2005. 3. 20)

(수락일 2005. 4. 25)