

희귀 및 멸종위기 식물 미선나무(*Abeliophyllum distichum* Nakai)의 절편위치 및 치상방법에 따른 기내증식 및 미세삽목

이나념 · 김지아 · 김용욱 · 최용의 · 문흥규

Effect of explant's position and culture method on shoot proliferation and micro-cuttings for a rare and endangered species, *Abeliophyllum distichum* Nakai

Na Nyum Lee · Ji-Ah Kim · Yong-Wook Kim · Yong Eui Choi · Heung Kyu Moon

Received: 10 August 2015 / Revised: 5 September 2015 / Accepted: 23 September 2015
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Using either the apical or axillary bud of the endangered species *Abeliophyllum distichum* Nakai, we tested the effect of bud position and culture method on shoot proliferation and rooting. In shoot proliferation, the axillary bud explant was more effective than the apical bud and the effect was fostered by BA treatment, whereas no differences were observed in shoot elongation by the explant position. Spontaneous rooting was observed in the MS basal medium and resulted in conspicuous differences in the explant position : more than 80% in apical bud explant and 28% in axillary bud explant was achieved, respectively. The positional effects were also observed in BA pre-treatments: generally vertical culture method appeared to be better in shoot proliferation, growth, and rooting than that of the horizontal culture method regardless of the BA pre-treatment duration.

The highest shoot multiplication was achieved through the vertical culture method with axillary bud explant, whereas the best shoot elongation and rooting was obtained using the vertical culture method with the apical bud explant. Apical bud explant was superior to axillary bud explant in *ex vitro* micro-cuttings and revealed a significant difference in shoot growth and root development. The above results suggest that explant position and culture method influence the efficiency of micropropagation for a rare and endangered plant *Abeliophyllum distichum*.

Keywords *Abeliophyllum distichum* Nakai, Apical or axillary bud explants, Cultural method, Micropropagation

서론

미선나무는 물푸레나무과에 속하며 충북의 진천과 괴산에서 자라는 낙엽 활엽 관목으로 높이가 1.5 m에 달한다. 세계적으로 1속 1종밖에 없는 식물로 천연기념물 제 147, 220, 221호로 지정, 보호되고 있을 정도로 극히 제한된 지역에서만 생육하는 대표적인 희귀 수종 중 하나이다(Lee 1976; 1990).

조직배양은 희귀식물의 번식에 있어 전통적인 무성번식법의 대안이 될 수 있으며(Chen et al. 2006), 유전자원의 증식 및 보존의 유용한 수단이 되어 왔다(Sanjaya et al. 2006; Faisal et al. 2007). 배양방법은 액아(axillary bud), 혹은 정아(apical bud)를 이용한 미세번식(micropropagation) 기술이 가장 보편적인 방법으로 국외에서는 *Ceropegia*

N. N. Lee
국립산림과학원 산림생명공학과
(Division of Biotechnology, Korea Forest Research Institute,
Suwon 441-350, Korea)
강원대학교 산림자원학과
(Depart. of Forestry, Kangwon Nat'l University, Chuncheon
200-701, Korea)

J.-A. Kim · Y.-W. Kim · H. K. Moon (✉)
국립산림과학원 산림생명공학과
(Division of Biotechnology, Korea Forest Research Institute,
Suwon 441-350, Korea)
email: hkmoon@forest.go.kr

Y. E. Choi
강원대학교 산림자원학과
(Depart. of Forestry, Kangwon Nat'l University, Chuncheon
200-701, Korea)

candelabrum 등 다수의 희귀 및 약용 식물에서 사용되었고(Negash 2002; Gomes et al. 2003; Chen et al. 2006; Faisal et al. 2007), 국내에서도 망개나무(Youn et al. 1992), 산개나리(Moon et al. 1997), 미선나무(Moon et al. 1999), 왕자귀나무(Park et al. 2003) 등 여러 희귀식물의 기내증식 기술이 보고되었다.

조직배양은 대상식물이나 유전자형, 클론에 따른 차이, 배양부위에 따른 위치효과는 물론 기본배지의 조성, 식물생장조절제의 종류나 농도에 따라 매우 상이한 반응 차이를 보인다(Paek 1998). 따라서 배양 목적에 따른 배양 조건의 적정화에는 여러 시행착오를 통한 반복된 실험이 요구된다.

절편의 위치에 따른 효과로 상수리나무의 아배양에서는 줄기절편의 위치에 따른 증식 및 발근에 차이가 있었고(Kim et al. 1986), *Maytenus ilicifolia*에서는 정아의 위치에 따른 증식을 차이로 보였으며(Pereira et al. 1995), *Citrus aurantium* L.에서는 액아의 줄기 신장에 미치는 정아의 위치 효과가 관찰되었다(El-Morsy et al. 1996). 또한 *Alstroemeria*의 줄기 재생 능력은 절편의 위치와 밀접한 관련이 있어 줄기 정단에 가까운 어린 절편이 재생 빈도가 높았고(Hsueh-Shin et al. 1998), *Hevea brasiliensis*에서는 정아의 부위와 절편의 위치가 기내배양의 성패요인으로 나타났다(Lardet et al. 1990; Viemont 1984). *Ponerorchis graminifolia* Rehb.f의 아(bud) 배양에서는 정단 부위가 가장 좋은 절편으로 나타났다(Mitsukuri et al. 2009), *P. graminifolia*와 *Doritaenopsis*에서는 화기의 정단 배양이 정아의 형성과 생존율을 높인다고 하였다(Vendrame et al. 2007).

이밖에도 기내배양에 미치는 절편의 위치효과는 여러 식물에서 다양하게 발표되고 있다. Azamal et al. (2007)은 티크(*Tectona grandis* Linn. f.)의 발근에 미치는 절편효과를, Duong et al. (2001)은 *Lilium longiflorum*의 식물체 재생에 미치는 절편 효과를, Duong et al. (2007)은 *Gerbera jamesonii*의 화탁 박편배양(tTCL : transverse thin cell layer)에서 절편의 위치에 따른 정아의 발생 차이를 보고하였다. 이와 같은 선행연구는 기내배양의 적정화에 있어 절편의 위치 및 치상 방법의 중요성을 시사하는 것이다.

미선나무의 조직배양은 우리의 실험실에서 액아배양의 연구(Moon et al. 1999)와 증식에 미치는 LED 조명 효과(Lee et al. 2014)가 수행되었으나, 증식 및 발근에 미치는 절편의 위치효과 연구는 아직까지 수행되지 못했다. 본 연구는 미선나무 기내 식물을 재료로 정아와 액아 절편을 구분하여 줄기의 증식, 성장 및 발근에 미치는 위치 효과와, 절편의 치상 방법 그리고 미세삽목에 의한 효율적인 묘목 생산 방법을 구명하고자 수행되었다.

재료 및 방법

식물재료

선행연구(Moon et al. 1999)의 방법으로 얻은 미선나무 기내 배양체를 약 1개월의 배양주기로 MS 기본 배지(Murashige and Skoog 1962)에서 유지하면서 실험재료로 사용하였다. 절편체는 정아가 있는 줄기와 정아가 없는 줄기로 나누어 마디는 2~3개, 잎은 3~4개가 붙도록 2.5 cm 길이로 절단하였다.

절편체에 따른 증식

줄기 증식 및 기내 발근을 위하여 잎의 발달이 양호한 건전한 줄기를 재료로 정아 및 액아 절편으로 나누어 시험하였다. 배지는 MS 배지에 BA 1.0 mg/L 처리하였고 탄소원으로는 3% (w/v) sucrose, 배지의 경화는 0.3% (w/v) gelrite로 하였다. 산도(pH)를 5.7로 맞추었고 121°C, 1.5 kgf/cm²에서 20분간 고압멸균하여 250 mL 유리 배양병(64 x 110 mm)당 30 mL씩 분주하였다. 절편은 정아 절편 및 액아 절편으로 나누어 배양병 당 5개씩 치상하여 5반복을 두었다. 배양 환경은 냉백색 형광등(FL 40D, 40W, OSRAM)으로 1일 16시간 조명(40 um m⁻² s⁻¹), 25±2°C로 유지하였다. 배양 4주 후 다경유도 및 길이를 측정하고, 발근율, 뿌리 수 및 길이를 측정하였다.

절편, 치상방법 및 BA 전처리 효과

정아 절편 및 액아 절편을 구분하여 BA 전처리, 치상 방법(수직치상과 수평치상)에 따른 증식 및 발근 효과를 시험하였다. 전처리는 MS 액체배지에 1.0 mg/L BA, 3% (w/v) sucrose를 처리하여 약 2.5 cm로 절단한 정아 및 액아 절편을 구분하여 상온에서 침지 처리하였다. 전처리 시간은 0, 1, 3, 6 및 24 시간 침지시킨 다음 MS 기본배지에 치상하였다. 치상 방법은 절편이 배지 위에 접촉되도록 수평으로 올려놓은 방법과 정상적으로 배지에 수직으로 치상하는 방법으로 나누어 실시하였다. 처리 별 반복 점수, 배양 환경 및 성장조사는 상기의 방법과 동일하게 실시하였다.

미세삽목 (micro-cuttings)

미세삽목은 건전한 줄기의 정아와 액아 절편으로 시험하였다. 줄기 길이 8~10 cm로 자란 기내묘를 약 3~4 cm 길이로 정아와 액아절편으로 나누어 절단하여 절단 기부에 1% IBA/Talc를 처리한 다음 인공 혼합상토(peatmoss : perlite : vermiculite=1:1:1, v/v/v)에 삽목하였다. 삽목 후 충

분히 관수하고 1일 16시간 조명($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지되는 순화실에서 8주간 공중습도를 80%로 높게 유지하며 생육시켰다. 배양 4주 및 8주 후에 각각의 생존율, 발근율 및 생육상태를 조사하였다.

본 실험의 모든 데이터는 통계프로그램 SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)을 이용하여 산출하였다. 각 처리간 유의성 검정을 위해서는 one-way ANOVA를 실시하였고, 유의성이 있는 경우 Duncan's multiple range test로 차후검정을 실시하였다. 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 로 설정하여 분석하였다.

결과 및 고찰

절편체에 따른 줄기증식

액아 위치에 따른 줄기 증식 및 발근 효과는 Table 1과 같다. 치상 후 1주 후부터 줄기 생장이 시작되었고, 배양 2주 후에는 뿌리 발생이 관찰되었다. 다경줄기는 주로 절편체 기부의 액아에서 유래하여 1~2개의 우세줄기로 자랐고 그 다음 절편의 기부에서 또 다른 줄기가 발생하였다. 줄기유도 과정에서 다경줄기가 없는 것은 하나의 우세줄기뿐만 아니라 다경줄기 형성에는 액아절편이 정아절편보다 다소 효과적이었고, BA 처리 시 절편 당 2.4개가 유도되어 그 효과가 뚜렷하였다. 전반적으로 다경줄기 유도에는 BA 뿐만 아니라 절편체에 따른 차이가 영향을 주는 것으로 나타났으나 줄기의 신장은 절편체에 따른 차이가 크지 않았고, 기본배지 조건에서 평균 3.1 cm로 BA 처리 시 2.6 cm보다 다소 양호하였다(Fig. 1). 유사한 결과로 *Maytenus ilicifolia*의 기내 증식에서는 BA 농도와 정아의 위치가 다경줄기 형성에 영향을 미치며, 정아에서 멀리 떨어진 액아 절편이 다경유도에 좋다고 하였고(Pereira et al. 1995), Moon et al. (1999)은 미선나무의 액아배양 선행연구에서 줄기의 생장은 동일한 배양조건에서도 절편에 따라 차이가 많이 나타남을 관찰하였다.

한편 발근은 BA 처리 시에는 전혀 이루어지지 않았지만 기본배지에서 자발적인 발근이 이루어졌다(Table 1, Fig. 1). 이러한 발근 형태는 특히 정아 절편에서 80% 이

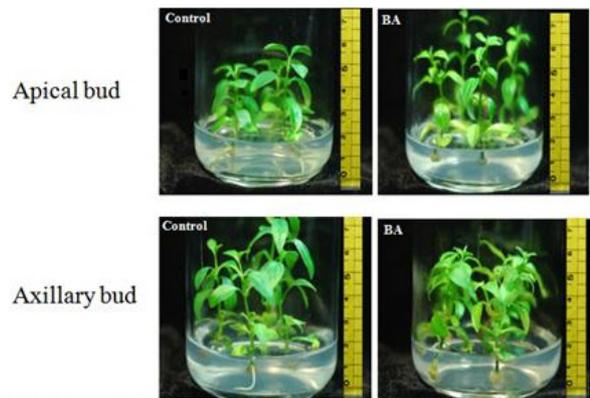


Fig. 1 Comparison of shoot multiplication by different explant type [Cont : MS control, BA : MS + BA 1.0 mg/L]

상 발근되어 액아 절편의 28%와 뚜렷하게 대비되었다. 뿌리 형태는 세근의 발달이 없고 대부분 1차근으로 길게 자랐다. 어느 절편에서나 줄기의 생장과 함께 줄기의 기부에서 캘러스가 형성되었는데, 캘러스의 형성은 BA 처리 시에 무 처리보다 3배 이상 크게 형성되었다. 이와 같은 결과는 상수리의 아배양에서도 관찰된 바 있다(Kim et al. 1986).

절편체, 치상 방법 및 BA 전처리 효과

정아 및 액아의 두 가지의 절편으로 치상 방법 및 BA 전처리에 따른 증식 및 발근 시험 결과는 Table 2와 같다. 치상 1주 후부터 액아에서 줄기 생장이 시작되었고, 전반적으로 절편의 수직치상이 수평치상보다 액아의 신장이 양호하게 나타났다. 다경줄기는 BA 처리시간 보다는 치상방법에 따른 유의적인 차이를 보였으며 액아절편의 수직치상 시 다경줄기 유도에 가장 효과적이어서 절편 당 평균 2.1개의 줄기가 유도되었다.

줄기의 생장과 발근에 있어서도 BA의 효과보다는 절편체의 치상 방법에 따른 차이가 뚜렷하게 나타나 정아의 수직치상 시 가장 양호한 결과를 나타내었다. 이는 *Zamioculcas zamiifolia* Engl.의 기내 배양에서 엽병과 중륜(midrib)이 있는 하부 절편의 수직치상이 수평치상보다 기관형성 능력이 우수하다는 보고와 유사한 결과이다

Table 1 Effect of explant position on shoot multiplication and elongation for *Abeliophyllum distichum* Nakai

Explants	Treatment (mg/L)	No. of shoots per explant	Shoot length (cm)	Rooting (%)	No. of roots
Apical bud	Cont.	1.0 ± 0.00 c ^x	3.1 ± 0.67 a	80.0 ± 0.84	2.1 ± 1.00
	BA 1.0	1.8 ± 0.91 b	2.4 ± 0.90 b	-	-
Axillary bud	Cont.	1.5 ± 0.52 b	3.0 ± 0.84 a	28.6 ± 0.82	2.0 ± 0.82
	BA 1.0	2.4 ± 0.66 a	2.9 ± 0.72 a	-	-

^xMeans followed by the same letters are not significantly different at $p < 0.05$ according to Students' *t*-test.

Table 2 Effect of explant position and culture method after BA pre-treatment on shoot growth and rooting for *Abeliophyllum distichum* Nakai. after 4 weeks of culture

Explant types	Culture method	Pre-treatment (hr) ^X	No. of shoots/explant	Shoot length (cm)	Rooting (%)	No. of roots/explant
Apical bud	Vertical	0	1.1 ± 0.4 def ^Y	4.7 ± 1.6 ab	100.0	3.6 ± 1.3 bcd
		1	1.6 ± 1.0 cde	5.2 ± 1.7 a	100.0	3.8 ± 2.3 bcd
		3	1.7 ± 0.9 cd	4.2 ± 1.6 bcde	96.0	4.0 ± 1.8 ab
		6	1.2 ± 0.6 def	5.1 ± 2.1 a	100.0	3.2 ± 1.6 bcdef
		24	1.5 ± 0.7 cdef	4.8 ± 1.4 ab	82.6	4.4 ± 3.1 a
	Horizontal	0	1.2 ± 0.6 def	3.2 ± 1.5 fg	88.0	3.0 ± 1.8 bcde
		1	1.1 ± 0.4 ef	3.8 ± 1.9 cdef	95.8	2.9 ± 1.4 cdef
		3	1.0 ± 0.0 f	3.1 ± 1.4 fg	80.0	2.7 ± 1.7 bcde
		6	1.3 ± 0.7 def	3.4 ± 1.4 efg	77.8	2.0 ± 1.5 def
		24	1.1 ± 0.3 ef	3.3 ± 1.4 fg	91.7	3.1 ± 1.9 bcde
Axillary bud	Vertical	0	2.2 ± 1.1 ab	3.6 ± 1.4 def	96.0	3.9 ± 2.1 bc
		1	2.0 ± 0.9 abc	4.5 ± 1.4 abc	100.0	4.3 ± 1.7 ab
		3	2.0 ± 1.0 abc	3.7 ± 1.3 def	96.0	3.2 ± 2.4 bcde
		6	2.5 ± 1.3 a	4.1 ± 1.2 bcde	96.0	2.7 ± 1.7 def
		24	1.9 ± 0.8 bc	4.3 ± 1.3 bcd	80.0	3.0 ± 2.2 bcd
	Horizontal	0	1.6 ± 0.8 cde	2.8 ± 1.2 gh	88.0	2.6 ± 1.8 def
		1	1.9 ± 0.9 bc	3.2 ± 1.7 fg	88.0	3.2 ± 2.2 bcdef
		3	1.5 ± 0.6 cde	2.3 ± 0.9 h	82.6	2.0 ± 1.5 f
		6	1.7 ± 0.7 cd	3.2 ± 1.2 fg	88.0	2.6 ± 1.9 adef
		24	2.0 ± 0.9 bc	3.2 ± 1.2 fg	88.0	2.3 ± 1.9 ef

^XBA 1.0 mg/L pre-treatment.

^YMean followed by the same letters are not significantly different at p < 0.05 according to Duncan's multiple range test. The data were arcsine transformed.

(Maria et al. 2009).

줄기의 신장은 정아의 수직치상에서 평균 4.8 cm, 액아의 수평치상 평균 2.9 cm였고, 발근율은 정아의 수직치상에서 평균 95.7%, 정아 및 액아의 수평치상에서 약 86%를 보였다. 뿌리 수는 정아의 수직치상에서 절편 당 3.8 개, 액아의 수평치상에서 절편 당 2.5개로 나타났다. 발근 형태는 수직치상에서는 대체로 뿌리가 배지 속으로 내렸고 1차근과 함께 측근의 형성도 양호하였으며, 수평치상에서는 공중뿌리(air root) 형태로 줄기에서 형성된 뿌리가 직접 배지 속으로 들어가는 것이 관찰되었다(Fig. 2). 본 실험에서 미선나무의 기내증식은 BA의 전처리보다는

절편체의 선택과 적절한 치상방법을 통해 효과적인 증식이 가능한 것으로 나타났다. 그러나 Minal et al. (1985)은 액체배지 전처리가 절편체에 생리적 활성을 주기 때문에 식물체 형성에 유리하다고 하여 본 결과와는 상이하였다.

BA의 전처리에서 관찰되는 특이점은 언제나 절편의 기부에 캘러스가 형성되는 것이었는데, 캘러스는 전처리 시간이 길어질수록 크게 형성되고, 발근율이 다소 감소되는 경향을 보였다. 이는 싸이토키닌의 영향으로 보인다. 이렇게 캘러스와 더불어 발근된 개체는 차후 토양 순환에서 고사되는 것이 많았는데, Moon et al. (2008)은 개느삼의 액아배양에서 이와 유사한 결과를 관찰한 바 있다. 한편 줄기의 생장에서 BA에 장시간 전처리된 경우 정아에서 정단괴저(apical necrosis)가 관찰되었고, 일부 절편에서는 잎이 황화되고 낙엽이 되었다(Fig. 3). 이러한 괴저현상은 음나무의 BA 처리 액아배양에서 관찰되었고(Moon et al. 2002), 미선나무의 선행 연구에서도 일부 관찰되었다(Moon et al. 1999). 정단괴저의 원인으로는 칼슘의 결핍, 정아로의 칼슘 분배 부족, 과습으로 인한 통기성 불량 등이 원인으로 보고된 바 있다(Debergh 1988). 그러나 본 실험에서 관찰된 정단괴저는 그 빈도가 5% 미만

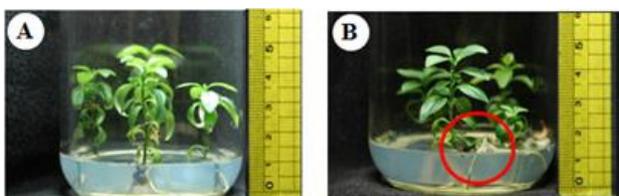


Fig. 2 Comparison of shoot growth and rooting by the explants culture methods [A - Vertical culture; B - Horizontal culture]. Red circle shows air root

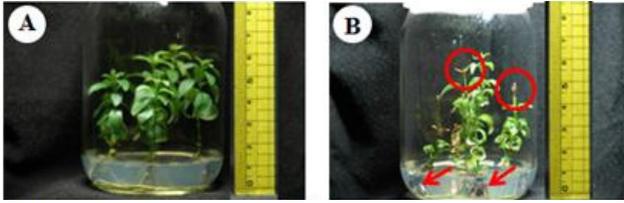


Fig. 3 Comparison of shoot growth and rooting by the explants culture methods [A - Vertical culture; B - Horizontal culture]. Red circles and red arrows show apical bud necrosis and adventitious roots with callus

이었고 계대배양 시 괴저된 부분과 캘러스를 제거하면 차후의 증식에는 큰 문제가 없는 것으로 나타났다.

이상의 결과로 볼 때 미선나무의 줄기유도는 액아를 절편으로 수직으로 치상하는 것이 효과적이며, 줄기의 생장 및 발근은 정아절편으로 수직치상 방법이 다소 양호한 결과를 나타냈다. 따라서 배양목적에 따라 절편의 선택과 배양방법을 고려할 필요가 있으며, BA 처리시간에 따른 증식효과는 크지 않은 것으로 나타났다.

미세삽목(Micro-cuttings)

정아와 액아절편으로 나누어 절편에 따른 기외 미세삽목을 실시한 결과는 Table 3과 같다. 배양 4주 차에 줄기의 신장은 정아절편이 액아절편에 비해 2배 이상 길게 자랐고, 배양 8주 후까지도 이어졌다. 잎의 발달도 정아절편이 액아절편보다 다소 양호하게 자랐다. 다만 다경줄기의 유도는 액아 절편이 다소 양호하게 나타났다. 이와 유사한 결과로 티크(*Tectona grandis*)의 삽목에서는 정아가 있는 상부 가지 삽수에서 뿌리수와 길이가 최대를 나타냈고, 발근율은 정아가 없는 줄기의 중간부위의 삽목에서 가장 좋은 결과를 보였으며(Azamal et al. 2007), *Ulmus villosa*의 삽목에서는 줄기의 절편 위치에 따라 발근율 차이를(Bhardwaj et al. 2005), *Alstroemeria*의 기내증식에서는 정아에서 가까운 어린 절편의 줄기형성율이 높았음을 보고하였다(Hsueh-Shih et al. 1998).

본 실험에서 배양 4주 차 발근율은 정아절편에서 100%, 액아절편에서 96%, 8주 후에는 각각 100%와 83%를 보여 정아절편의 발근율이 현저히 좋게 나타났다. 그러나 왕

벚나무 녹지삽목에서는 정아가 없는 하단부의 발근율이 높게 나타났고(Kim et al. 2012), *Ulmus villosa*의 삽목에서도 정아가 제거된 삽수의 하단부가 상단부보다 발근율이 높게 나타나 본 결과와는 다른 결과를 보였다(Bhardwaj et al. 2005). 한편, *Milicia exelsa* (Ofori et al. 1997), *T. scleroxylon* (Leakey 1983), *Nauclea diderrichii* (Matin 1989)의 삽목에서는 정아가 있는 삽수가 더 좋은 발근율을 보여 본 실험결과와 유사한 결과를 보고하였다. Husen (2004)은 수종 및 삽수부위에 따라 발근력의 차이를 보이는 것은 대목과 삽수 절편 조직의 생리적인 상태, 동화(assimilates)와 생장조절물질의 수준 및 리그닌 정도 등의 차이에 기인하는 것으로 추정하였다.

8주 후 발근묘의 뿌리발달에서는 정아지의 삽목묘가 액아지의 것보다 뿌리가 굵고 세근의 발달이 더 좋은 것으로 나타났다. 또한 기내발근과는 다르게 기부에 캘러스 형성 없이 직접 뿌리가 형성되었다. 뿌리의 생장에 있어서도 정아지 삽목묘에서 4주 후에 평균 6.2 cm에서, 8주 후에는 12.1 cm로 액아지보다 2배 정도 더 양호하게 나타났고, 뿌리 수에 있어서는 평균 6.2개로 액아절편보다 양호하게 나타났다.

토양 이식 후 생존율은 정아지에서 100%로 액아절편의 83%보다 다소 양호하게 나타났다. *Acacia mangium*은 정아에 가까운 절편이 발근율이 좋다고 한 반면(Poupard et al. 1994), *Ulmus villosa*의 기내배양에서는 액아절편에서 발근율과 뿌리수가 훨씬 좋다고 하여 수종에 따른 차이를 보여주었다(Bhardwaj et al. 2005).

기내발근이 어려운 수종에 있어 미세삽목(micro-cutting)은 여러 수종에서 발근율 향상을 가져오는 것으로 보고되고 있으며(Sanjaya et al. 2006), 음나무의 액아배양(Moon et al. 2002)과 기내 발근율이 낮은 시로미의 발근 유도에서도 이 방법이 효과적인 것으로 관찰하였다(Han et al. 2010). 미선나무의 미세삽목은 정아지를 절편으로 높은 발근율, 줄기생장 및 뿌리발달이 좋으며 차후 토양에서의 생존율과 생장이 좋은 것으로 관찰되었다(Table 3, Fig. 4). 기내 배양된 식물의 효율적인 발근 및 순화는 실용화의 측면에서 특히 생산비 절감에 매우 중요하다. 결론적으로 미선나무는 액아를 절편으로 수직 치상의 방법으로 효과적인 증식이 가능하며 증식된 삽수는 미세삽목을 통

Table 3 Micro-cuttings and rooting using two types of explants from *Abeliophyllum distichum* Nakai

Culture period	Explants	Shoot length (cm)	No. of shoots/explant	Rooting rate (%)	Root length (cm)	No. of roots/explant
4 weeks	Apical bud	15.0 ± 0.7 a ^x	1.0 ± 0.0 b	100.0	6.2 ± 0.8 a	3.8 ± 0.8 a
	Axillary bud	7.4 ± 0.9 b	1.8 ± 0.4 a	96.9	5.8 ± 1.4 a	2.2 ± 0.4 a
8 weeks	Apical bud	27.4 ± 2.3 a	1.0 ± 0.0 b	100.0	12.1 ± 0.7 a	6.2 ± 0.8 a
	Axillary bud	14.4 ± 1.0 b	1.4 ± 0.5 a	83.3	7.7 ± 0.7 b	4.0 ± 0.0 b

^xMean followed by the same letters are not significantly different at $p < 0.05$ according to Students' *t*-test



Fig. 4 Comparison of soil acclimatization and growth for the two types (apical bud or axillary bud) origin plants

해 효율적인 묘목생산이 가능할 것으로 기대되었다.

적 요

본 실험은 희귀 및 멸종위기 식물인 미선나무의 효과적인 증식을 위하여 줄기 증식, 생장 및 발근에 미치는 절편의 위치 효과 및 치상 방법의 효과를 구명하기 위해 실시되었다. 줄기유도는 BA를 처리한 액아절편 배양이 효과적이었으며 절편 당 2.4개의 줄기가 유도되었다. 정아 및 액아절편을 BA 1.0 mg/L를 전처리하여 수평과 수직으로 치상하였을 때 줄기유도는 액아 절편의 수직치상으로 절편 당 2.5개로 가장 좋았다. 반면 줄기의 생장, 발근 및 뿌리 발달은 정아절편의 수직치상에서 양호하였고 BA의 전처리 시간이 길어질수록 발근이 억제되는 경향을 보였다. 기내증식된 줄기의 정아 및 액아를 절편으로 기외에서 미세삽목(micro-cutting)을 실시하여정아절편에서 100% 발근되었고, 뿌리수는 개체 당 평균 6.2개로 가장 양호하였다. 미세삽목묘는 온실에서 95% 이상 순화되었다. 이상의 결과로 볼 때 미선나무의 기내 증식은 액아를 절편으로 BA 처리 후 수직 치상하는 방법이 효과적이며, 줄기의 생장 및 발근은 정아를 절편으로 수직치상 하는 것이 효과적으로 나타났다. 또한 정아를 절편으로 미세삽목을 통해 효과적인 발근 유도 및 순화가 가능하여 미선나무의 실용적인 묘목생산이 가능함을 보여주었다.

References

Azamal H, Mohinder P (2007) Effect of branch position and auxin treatment on clonal propagation of *Tectona grandis* Linn. f. *New Forest* 34:223-233
 Bhardwaj DR, Mishra VK (2005) Vegetative propagation of

Ulmus villosa: Effects of plant growth regulators, collection time, type of donor and position of shoot on adventitious root formation in stem cuttings. *New Forest* 29:105-116
 Chen UC, 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
 Debergh PC (1988) Micropropagation of woody species-state of the art on *in vitro* aspects. *Acta Hort* 227:287-295
 Duong Tan Nhut, Bui Van Le, Seiichi Fukai, Michio Tanaka, K. Tran Thanh Van (2001) Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture. *Plant Growth Regul* 33:59-65
 Duong Tan Nhut, Truong Thi Thuy An, Nguyen Thi Dieu Huong, Nguyen Trinh Don, Nguyen Thanh Hai, Nguyen Quoc Thien, Nguyen Hong Vu (2007) Effect of genotype, explant size, position, and culture medium on shoot generation of *Gerbera jamesonii* by receptacle transverse thin cell layer culture. *Sci Hort*-Amaterdam 111:146-151
 El-Morsy AA, Millet B (1996) Rhythmic growth and optimization of micropropagation: The effect of excision time and position of axillary buds on *in vitro* culture of *Citrus aurantium* L. *Ann Bot-London* 78:197-202
 Faisal M, Ahmad N, Anis M (2007) An efficient micropropagation system for *Tylophora indica*. an endangered, medicinally important plant. *Plant Biotech Rep* 1:155-161
 Gomes GAC, Paiva R, Paiva PDO, Santiago EJAD (2003) Plant regeneration from callus cultures of *Machlura tinctoria*, an endangered woody species. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 39:293-295
 Han MS, Park SY, Moon HK, Kang YJ (2010) Micropropagation of a rare tree species, *Empetrum nigrum* var. *japonicum* K. Koch via axillary bud culture. *J Kor Forest Soci* 99(4): 568-572
 Hsueh-Shih Lin, Marjo J, De Jeu, Evert Jacobsen (1998) Formation of shoots from leaf axils of *Alstroemeria*: The effect of the position on the stem. *Plant Cell Tiss Org* 52:165-169
 Husen A (2004) Clonal propagation of *Dalbergia sissoo* Roxb. By softwood nodal cuttings: Effects of genotypes, application of IBA and position of cuttings on shoots. *Silvae Genet* 53:50-55
 Kim CS, Kim ZS (2012) Effects of cutting time, auxin treatment and cutting position on rooting of the green-wood cuttings and growth characteristics of transplanted cuttings in the adult *Prunus yedoensis*. *Kor J Horticult Sci Tech* 30(2):129-136
 Lardet, Enjalric F, Carron MP (1990) *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.) apex cultures. Influence of the morphogenetical stage and explant age. *Comptes Rendus de l'AcadeUmie des Sciences Serie III-Sciences de la Vie* 310(5):195-202
 Leakey RRB (1983) Stock Plant factors affecting root initiation in cuttings of *Triplochiton Scleroxylon* K. Schum an indigenous hardwood of West Africa. *J Horticult Sci Biotech* 58:227-290
 Lee NN, Choi YE, Moon HK (2014) Effect of LEDs on shoot multiplication and rooting of rare plant *Abeliophyllum distichum*

- Nakai. J Plant Biotechnol 41:94-99
- Lee TB (1976) Illustrated flora of Korea. Hyangmun Press
- Lee TB (1990) Conservation of threatened plants in Korea. Bull Kwanak Arboretum. 3:190-196
- Maria Papafotiou, Aekaterini N, Martini (2009) Effect of position and orientation of leaflet explants with respect to plant growth regulators on micropropagation of *Zamioculcas zamiifolia* Engl. (ZZ). Sci Hortic-Amsterdam 120:115-120
- Matin MA (1989) Carbon economy during rooting of cuttings of *Nauclea diderrichii* (De. Wild and Th. Dus.) Merrill. M. Phil thesis, University of Edinburgh, United Kingdom
- Minal Mhatre, Bapat VA, Rao PS (1985) Regeneration of plants from the culture of leaves and axillary buds in mulberry (*Morus indica* L.). Plant Cell Rep 4:78-80
- Mitsukuri K, Mori G, Johkan M, Shimada Y, Mishiba K-I, Morikawa T, Masayuki Oda (2009) Effects of explant position and dark treatment on bud formation in floret culture of *Ponerorchis graminifolia* Rchb.f. Sci Hortic-Amsterdam 121:243-247
- Moon HK, Kim YW (2008) In vitro propagation of a rare and endangered species, *Echinosophora koreensis* Nakai, by axillary bud culture. J Plant Biotechnol 35(3):229-234
- Moon HK, Noh EW, Ha YM, Shim KK (2002) Micropropagation of Juvenile and mature tree of *Corylolopsis coreana* by axillary bud culture. J Plant Biotechnol 29(2):117-121
- Moon HK, Suk GY, Kim SC (1997) Micropropagation of a rare species, *Forsythia saxatilis* N. through tissue culture. J Kor Forest Soci 86(4):430-434
- Moon HK, Suk GY, Kwon YJ, Son SH (1999) Micropropagation of a rare species, *Abeliophyllum distichum* Nakai, via axillary bud culture. Kor J plant tiss culture 26(2):133-136
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. J Plant Physiol 15:473-497
- Negash L (2002) Successful vegetative propagation techniques for the threatened African pencil cedar (*Juniperus procera* Hochst. Ex Endl.). Forest Ecol Manag 161:53-64
- Ofori D, Newton AC, Leakey RRB, Grace J (1997) Vegetative propagation of *Milicia excelsa* by leafy stem cuttings: Effects of maturation, coppicing, cutting length and position on rooting ability. J Tropical Forest Sci 10(1):115-129
- Paek KY (1998) Commercial aspects and problems in micropropagation. The 12th Symposium on Plant Biotechnology. Korea-Japan Joint Symposium. Frontier Researches in Plant Biotechnol 3:152-156
- Park SY, Ahn JK, Lee WY (2003) High frequency shoot induction from root segments of *Albizzia coreana*. J Kor Forest Soci 92:626-631
- Pereira AMS, Moro JR, Cerdeira RMM, Franca SC (1995) Effect of phytohormones and physiological characteristics of the explants on micropropagation of *Maytenus ilicifolia*. Plant Cell Tiss Org 42:295-297
- Poupard C, Chauviere M, Monteuis O (1994) Rooting Acacia mangium cuttings: Effects of age, within-shoot position and auxin treatment. Silvae Genet 43(4):226-231
- Sanjaya, Muthan B, Rathore TS, Rai VR (2006) Micropropagation of an endangered Indian sandalwood (*Santalum album* L.). J Forest Res 11:203-209
- 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
- Vendrame WA, Maguire I, Carvalho VS (2007) In vitro propagation and plantlet regeneration from *Doritaenopsis* purple gem 'Ching Hua' flower explants. HortScience 42: 1256-1258
- Viemont J-D (1984) Les bruyeres in vitro. IV. Influence de la croissance rythmique sur l'evolution des bourgeons axillaires de l'*Erica x darleyensis*. Annales des Sciences Naturelles. Botanique. Paris 6:237-244