

## 생온(*Paraserianthes falcataria* (L.) Nielsen)의 기내 부정줄기 유도 및 식물체 재분화

김지아 · 문흥규 · 김용욱 · 배은경

### In vitro introduction adventitious shoots and plant regeneration of sengon (*Paraserianthes falcataria* (L.) Nielsen)

Ji Ah Kim · Heung Kyu Moon · Yong Wook Kim · Eun Kyung Bae

Received: 2 September 2015 / Revised: 23 September 2015 / Accepted: 23 September 2015

© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** Adventitious buds were obtained from isolated cotyledons cultured on MS medium with various concentrations of 6-benzylamino purine (BA) and thidiazuron (TDZ). The highest numbers of adventitious buds were obtained on MS medium supplemented with 0.2 mg/L BA. Experimental culturing with half the petiole portion and half with the terminal segments were grown on MS medium contained with 0.2 mg/L BA. Frequency of the adventitious bud induction was variable accordingly to the type of cultured explants. Explants with the half petiole showed the highest adventitious bud induction rate (80%) compared to explants of half with terminal segment (20%). An elongated shoot from the buds and growth of advent roots were both possible on the 1/2 MS medium without a plant growth regulator. These results offer an effective way in which clonal propagation can be accomplished.

**Keywords** Adventitious bud, Regeneration, Clonal propagation

### 서론

생온(*Paraserianthes falcataria* (L.) Nielsen)나무는 바타이(batay)라고도 알려져 있으며 동남아시아에 자생하고 있고 인도네시아에서는 주로 다용도 속성수 중의 하나이다. 또한 생온은 토양의 질소고정을 위해 조림되며, 필리핀에서는 토양비옥도 증진을 위해 광범위한 지역에 조림이 이루어지고 있다. 이 수종의 수고는 40 m 이상, 흉고 직경 100 cm 정도까지 성장하며, 다양한 종류의 토양에서 적응력이 뛰어나 광범위한 지역에 생육이 가능하고 성장 시에는 그리 많은 양분은 필요치 않다. 목재의 재질은 경량재로 베니어판(veneer)과 합판(plywood)용으로 널리 사용되며 그 외에도 펄프, 제지공업 및 가구재로도 많이 사용된다(Sasmitamihardja et al. 2010)

인도네시아에서는 1990년대 정부의 조림권장 수종의 하나였으며, 그 후 수마트라(Sumatra), 자바(Java) 및 발리(Bali) 등의 지역에서 지속적으로 조림이 이루어져 왔다. 그러나 이 수종은 녹병균(rust fungus)의 일종인 *Uromycladium tepperianum*의 감염으로 가지, 줄기 및 잎 등 모든 부위에서 혹(gall)모양의 덩어리들이 발생되어 매년 많은 수량의 생온이 고사되고 있는 실정이다. 따라서 이러한 곰팡이균으로 인해 우수형질의 용재수 생산에 있어 매우 큰 걸림돌이 되고 있으며, 이 문제를 해결하기 위해 조직배양 방법을 이용한 내병성 개체의 재분화 및 형질전환을 통한 신품종 개발 연구가 시도되고 있다.

생온의 조직배양연구는 액아절편으로 부터 다경지를 유도한 연구(Bon et al. 1998; Sasmitamihardja et al. 2010)가 보고되었고, Kumar와 Mallick (1993)은 종자유래 자엽절편체부터 부정아를 유도하였으며, Ghosh et al. (2010)은 자엽절편으로 부터 식물체를 재분화한 연구를 보고하고

J. A. Kim (✉) · H. K. Moon · Y. W. Kim  
국립산림과학원 산림생명공학과  
(Division of Forest Biotechnology, Korea Forest Research Institute, Suwon 16631, Korea)  
e-mail: jiahkim@korea.kr

E. K. Bae  
국립산림과학원 임목육종과  
(Division of Tree Improvement, Korea Forest Research Institute, Suwon 16631, Korea)

있다.

본 연구에서는 녹병균 저항성 개체를 선발하여 기내배양을 통한 식물체의 재분화체계를 확립하고 향후 내병성 개체의 대량증식과 이와 관련한 형질전환연구의 수행을 위한 기반기술을 마련코자 수행되었다

## 재료 및 방법

### 식물재료

생온의 종자유래 발아체를 부정아 유도를 위한 재료로 사용하였다. 종자는 흐르는 물에 1시간 침지 처리하였으며, 그후 70% EtOH 1분 및 2% NaClO로 20분간 소독한 다음 멸균수로 3회 세척하여 발아배지에 치상하였다. 발아배지는 1/2MS (Murashige and Skoog, 1962)배지에 2% sucrose 및 0.3% gelrite를 첨가하였고, 페트리디쉬 당 각 10개의 종자를 파종하여 발아를 유도하였다. 배양조건은 1일 16시간 광조명( $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  백색 형광등),  $25\pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지되는 배양실에서 이루어졌다.

### 식물생장조절물질 종류, 농도 및 절편체 종류에 따른 부정아 유도 효과

종자발아는 발아배지에 접종 4일 이후부터 시작되었고, 자엽이 발생된 발아체는 자엽, 본엽, 배축 및 유근을 부정아 유도의 재료로 사용하였다. 자엽과 본엽절편체는 엽의 뒷면이 배지에 접촉되도록 치상하였고, 그외 배축과 유근 절편은 0.3 cm의 크기로 절단하여 수평으로 유도배지에 치상하였다. 부정아 유도배지는 MS배지에 6-benzylamino purine (BAP), meta-topolin (mT), thidiazuron (TDZ)을 각각 2.0과 4.0 mg/L 의 단독 처리한 것과 0.5 mg/L BA와 1.0 mg/L TDZ 혼용한 조합이며, 3% sucrose 및 0.3% gelrite를 첨가하였다. 각 절편체는 페트리디쉬 당 10개씩 치상하여 3반복으로 수행하였으며,  $25\pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지되는 배양실에서 부정아 유도 시 까지 암배양 하였다. 배양 5주 후, 식물생장 조절물질 처리 및 농도에 따른 부정아 유도율, 부정아수 및 부정줄기 길이를 조사하였다(Fig. 1).

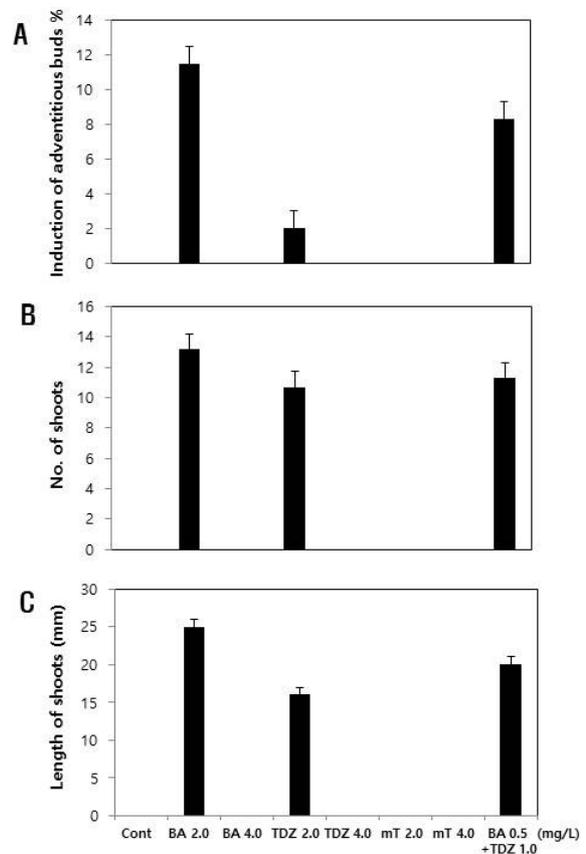
### 절편체 채취 위치에 따른 부정아 유도 효과

선행연구결과에서 자엽절편체에서 만 부정아가 유도되었고, 특히 엽병이 붙은 절편체에서 부정아 유도율이 가장 좋은 것이 나타났다(Fig. 1). 따라서 자엽의 절편 위치에 따른 부정아유도 차이를 구명하기 위해 자엽의 중간부분을 횡으로 잘라 엽의 끝이 포함된 절편과 엽병이 포함된 절편으로 나누어 부정아 유도를 시도하였다. 유도

배지는 부정아 유도율이 가장 높았던 2.0 mg/L BA가 첨가된 배지에 3% sucrose와 0.3% gelrite를 첨가하여 사용하였다. 절편체는 페트리디쉬 당 8개씩 치상하여 5반복으로 수행하였고, 배양조건은  $25\pm 2^\circ\text{C}$ 에서 암배양 하였다. 배양 5주 후, 자엽절편체 채취 위치에 따른 절편체 당 신초유도율과 부정줄기유도율을 각각 조사하였다.

### 배지종류 및 염류농도에 따른 줄기생장 및 뿌리 유도 효과

완전한 기내식물체의 재분화를 위해 배지종류 및 염류농도에 따른 부정아로 유도된 줄기길이 및 뿌리유도를 수행하였다. 줄기신장 및 뿌리유도를 위한 배지는 MS, 1/2MS, WPM (Lloyd and McCown, 1981), 1/2 WPM배지 등 4종류를 사용하였고, 2% sucrose 및 0.3% gelrite를 사용하였다. 배양 2주 후 1~3 cm의 길이로 성장한 부정줄기는 각각한 개씩 분리하여 동일 배지에 치상 후 뿌리를 유도하였다. 배양조건은 1일 16시간 조명( $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  백색 형광등),  $25\pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지되는 배양실에서 실시하였고, 배양 5주 후 줄기길이와 발근율을 조사하였다.



**Fig. 1** Effects of various kinds of culturing on plant growth regulation and shoot bud induction from cotyledon explants in of *Paraserianthes falcataria* (L.) Nielsen. mT: meta-topolin

**결과 및 고찰**

배지 종류 및 절편체의 채취시기에 따른 부정아 유도 효과

Figure 1은 생온의 발아체 자엽을 싸이토키닌 종류 및 농도를 달리한 처리구에 배양 후 부정아 유도율 등의 효과에 대한 결과이다. 최대 부정아 유도율은 2.0 mg/L BA를 첨가한 처리구에서 11.5%로 나타났으며, 다음으로는 2.0 mg/L BA+2.0 mg/L TDZ 처리구에서 8.3%로 나타나 다소 부정아유도에 효과를 보였다. 최저 부정아유도는 2.0 mg/L TDZ 단독처리구에서 2.2%로 나타났는데 BA와의 혼합처리구보다 그 효과가 낮았다(Fig. 1A). 그러나 위의 3가지 싸이토키닌류 조합외에는 전혀 부정아가 유도되지 않아 싸이토키닌류의 종류 및 농도에 따라 다소 그 효과 차이가 크게 나타났다. 절편체당 평균 줄기 유도수는 2.0 mg/L BA 처리구에서 13.2개로 가장 높았으며, 다음으로는 2.0 mg/L BA+2.0 mg/L TDZ 처리구에서 10.7개, 그리고 최저는 2.0 mg/L TDZ 처리구(11.3개)에서 나타났다(Fig. 1B). 유도된 부정아로부터 신장된 줄기길이 비교에서 또한 2.0 mg/L BA 처리구에서 25mm, BA+TDZ 혼합처리구에서는 20mm, 그리고 2.0 mg/L TDZ 처리구에서 가장 낮은 15.6mm로 나타났다(Fig. 1C). 따라서 생온의 발아체 자엽 절편체로부터 부정아 유도율, 유도된 줄기 수 및 길이 등은 모두 2.0 mg/L BA 처리구가 가장 효과적인 것으로 나타났다(Fig. 1). Ghosh et al. (2010)은 생온의 자엽절편체 배양 시 4.0 mg/L BA 처리구에서 캘러스 형성 및 부정아 유도가 가장 좋은 것으로 보고하였고, Sinha and Mallick (1993)은 2.0 mg/L BA 처리구에서 부정아 유도율이 가장 높았다고 보고하고 있어 본 실험의 결과와 유사하였다. 부정아 유도배지에 배양 3주 후 뿌리절편체를 제외한 모든 절편체의 절단면에서 캘러스형성이 시작되었으며, 그 캘러스는 노란색을 띠며 수분이 많이 함유된 형태로 주로 유도되었고 일부 절편체에서는 흰색의 부드러운 솜과 같은 캘러스가 형성 또한 관찰되었다. 배양 5주 후에는 부정아 형성이 되었으며, 발생된 부정아 모두는 자엽절편체에서만 이루어졌다.

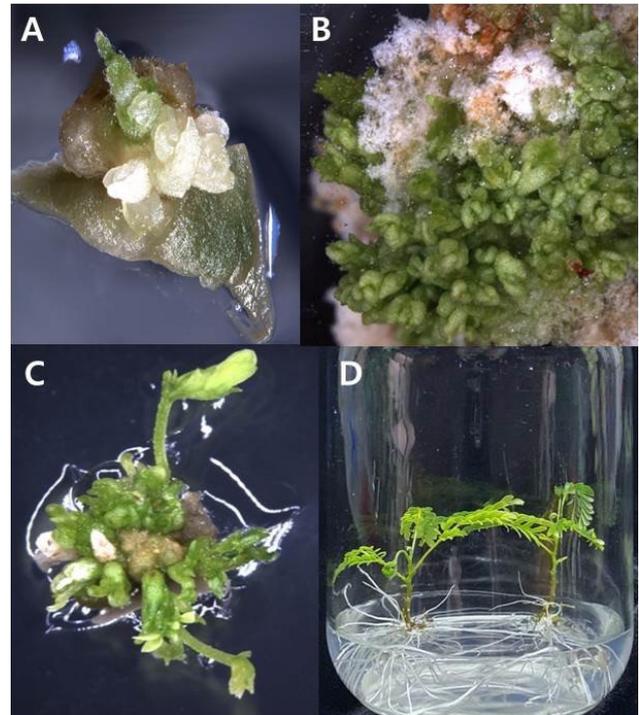
절편체 채취 위치에 따른 부정아 유도 효과

자엽절편체를 엽병 근처 자엽과 자엽 끝부분의 두 종류 절편체 부위를 나누어 부정아 유도효율을 비교하였다(Table 1). 그 결과 절편체의 종류에 따라 부정아 유도율의 큰 차이를 보였는데 엽병 근처 자엽으로부터 80%의 유도율을 보인 반면, 자엽 끝부분의 절편체로부터는 20%의 부정아 유도율을 보여 그 자엽절편체 채취부위에 따라 큰 차이를 보였다(Table 1). 절편체 당 유도된 부정아 수 비교에서는 엽병근처 자엽의 경우 10.6개, 자엽 끝부분 절편에

**Table 1** Effect of type of cotyledon explants for induction of adventitious shoots in *P. falcataria* (L.) Nielsen

| Explant                 | No. of advent bud/explant | % of adventitious shoot induction |
|-------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| Half with petiole part  | 10.66±1.86*               | 80                                |
| Half with terminal part | 9.3±2.08                  | 20                                |

\*Each treatment contained 3 replicates with 24 explants per replication. Values are means±SD.



**Fig. 2** Induction of adventitious shoot and plantlet regeneration in *P. falcataria* (L.) Nielsen. A: Induction of adventitious buds from half of the petiole part, B: More adventitious shoots were produced when cultured on MS medium with 2.0 mg/L BA after 6 weeks of culture, C: Some shoots were induced from adventitious buds after 8 weeks of culture, D: Some in vitro plantlets regenerated on 1/2MS medium (hormone-free) after 5 weeks

서는 9.3개를 보여 채취된 시료의 부위에 따른 부정아 유도율 효과는 그리 크지 않은 것으로 나타났다(Table 1). 엽병근처 자엽절편에서는 절단면과(Fig. 2A) 엽병 부위에서 주로 부정아가 나타났다. 자엽절편체의 종류에 따른 부정아 유도율 차이는 엽의 구조적인 특성과 밀접한 관련이 있으며, 특히 엽의 분화 시 엽병의 교차점에 증식지역(proliferation zone)이 존재하며, 성엽이 될 때까지 위쪽으로는 본엽의 기관분화를, 아래쪽으로 엽병 기관분화에 관여하기 때문이라고 보고하고 있다(Ichihashi et al. 2011). 따라서 이러한 엽과 엽병의 연결부위는 다른 부위에 비해 조직의 유사성이 높고 세포분열 또한 활발하여 다른 부위의 조직보다 식물체 재분화 효율이 높은 것으로 생각된다.

**Table 2** Effect of shoot growth and induction of root from adventitious buds in *P. falcataria* (L.) Nielsen

| Media | Length of shoots (cm) | % of rooting |
|-------|-----------------------|--------------|
| MS    | 1.8±0.2               | 54.2         |
| WPM   | 1.4±0.3               | 26.7         |
| ½ MS  | 3.2±0.4               | 71.4         |
| ½ WPM | 2.5±0.5               | 19.0         |

\*Each treatment contained 3 replicates with 20 explants per replication. Values are means±SD.

### 줄기 및 뿌리 유도

Table 2는 배지종류에 따른 유도된 신초의 길이 및 발근율을 조사한 결과로서 신초길이 비교의 경우 1/2MS배지에서 3.2 cm로 가장 높았고, WPM배지의 경우 1.8 cm로 가장 저조한 결과를 보였다(Fig. 2C). 그러나 1/2WPM 배지에서는 다소 높은 2.5 cm의 신초신장을 보여 염류를 반으로 줄이는 게 다소 효과적인 것으로 나타났는데 MS배지와 WPM배지 모두 염류의 양을 반으로 줄인 것이 줄기 신장이 좋았다. 발근율 비교의 경우 최대 발근율은 71.4%를 보인 1/2MS에서였고 최저 발근율은 1/2WPM배지에서 19%로 가장 낮았다(Table 2). 1/2MS배지의 경우 줄기신장과 마찬가지로 MS배지 보다는 1/2MS배지에서 1.3배 발근율이 더 높았지만 WPM배지의 경우 MS배지 경우와는 정반대로 나타났다(Table 2). 줄기와 뿌리가 유도된 식물체를 다시 1/2MS배지로 옮겨 배양 5주 후 완전한 식물체를 얻을 수 있었다(Fig. 2D).

본 연구에서는 열대 속성수인 생온의 부정아유도 기술을 이용하여 식물체 재분화 까지 기내배양 체계 확립을 위해 적정 식물생장조절물질 종류, 농도, 배지종류 및 절편체 종류에 따른 부정아 유도 효율 및 발근율 등을 조사하였다. 이렇게 확립된 식물체 재분화기술은 현재 심각한 문제로 대두되고 있는 생온의 곰팡이병의 내병성개체를 선발하여 이러한 재분화 기술을 적용시켜 대량증식 및 형질전환을 통한 수종의 품종개량의 수단으로 이용할 수 있을 것이다.

### 적 요

최대의 부정아유도수는 MS배지에 0.2 mg/L BA가 첨가된 배지에서 유도되었다. 엽병근처 자엽 절편과 자엽 끝 절

편을 MS배지에 0.2 mg/L BA가 첨가된 배지에 배양하였다. 부정아 유도 빈도는 절편형태에 따라 차이를 보였다. 엽병근처 자엽 절편은 자엽 끝 절편 보다 부정아 유도가 높았다. 호르몬 무처리 1/2MS배지에서 줄기의 신장과 뿌리가 유도되었다. 이 결과는 클론번식을 가능하게 할 효과적인 방법을 제공한다.

### References

- Bon MC, Bonal D, Goh DK, Monteuis O (1998) Influence of different macronutrient solutions and growth regulators on micropropagation of juvenile shape *Acacia mangium* and shape *Paraserianthes falcataria* explants. *Plant Cell Tiss Org Cult* 53:171-177
- Ghosh N, Smith DW, Das AB, Chatterjee A (2010) Rapid *in vitro* regeneration and clonal propagation of the fastest growing leguminous tree *Albizia falcataria* (L.) Fosberg using leaflet explant. *Plant Tissue Cult and Biotech* 20:63-72
- Ichihashi Y, Kawade K, Usami T, Horiguchi G, Takahashi T, Tsukaya H (2011) Key proliferative activity in the junction between the leaf blade and leaf petiole of Arabidopsis. *Plant Physiol* 157:1151-1162
- Kumar RS, Mallick R (1993) Regeneration and multiplication of shoot in *Albizia falcataria*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 32:259-261
- Kumar S, Sarkar AK, Kunhikannan C (1998) Regeneration of plants from leaflet explants of tissue culture raised safed siris (*Albizia procera*). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 54:137-143
- Lloyd G and B McCown (1981) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Comb Proc Intl Plant Prop Soc* 30:421-427
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Sasmitamihardja D, Hadisutanto Johannes S. and Widiyanto Sri N (2010) *In Vitro* Regeneration of *Paraserianthes falcataria* (L.) Nielsen. Proc. of the II International Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species Taiwan. Taipei. pp167-170
- Sinha RK, Majumdar K, Sinha S (2000) *In vitro* differentiation and plant regeneration of *Albizia chinensis* (Os.) Merr. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 36:370-373
- Varis E (2011) Stand growth and management scenarios for *Paraserianthes falcataria* smallholder plantations in Indonesia. University of Helsinki. M. Sc. Degree. pp3-17