

편백의 다신초 유도 및 발근을 통한 식물체 재분화

김지아 · 이나뎀 · 김용욱

In vitro plantlets regeneration by multi-shoots induction and rooting in *Chamaecyparis obtusa*

Ji Ah Kim · Na-Nyum Lee · Yong Wook Kim

Received: 11 November 2019 / Revised: 26 November 2019 / Accepted: 26 November 2019
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract A protocol for the *in vitro* propagation of *Chamaecyparis obtusa* was established in the present study. Multi-shoots were initiated from apical shoot explants from germinants after 10 weeks of culture on Litvay medium (LM) supplemented with different concentrations of cytokinin. The effects of pre-treatment with high concentrations of cytokinin and varying concentrations (0.2 to 5.0 mg/L) of zeatin on *in vitro* shoot elongation and shoot multiplication were investigated. Optimal shoot growth was achieved on LM medium, with over 10-mm shoots after 10 weeks of culture. In the anti-browning tests, ethanesulfonic acid triggered the least browning in the shoot tips. The highest multi-shoot induction was observed in the 0.5-mg/L zeatin treatments, which yielded 80% induction of shoots after 10 weeks of culture, and maximum shoot elongation was observed in the LM basal medium without the hormone. The highest rooting rates were 65% under 0.2 mg/L indole-3-butyric acid.

Keywords Anti-browning, *Chamaecyparis obtusa*, Multi-shoot induction

서 언

측백나무과(Cupressaceae)에 속하는 편백(*Chamaecyparis obtusa*)은 중국, 일본, 한국 등에 분포하는 상록교목으로, 수고는 40 m, 흉고직경 2 m 이상 생장하며 가지가 수평으로 퍼져 원

추형의 수관을 형성한다. 우리나라에는 주로 해발 300~1,700 m사이의 능선에서 자라며, 제주 및 남부지역에 주로 분포하여 난대수종에 속하는데 이 수종은 주로 용재수로 사용되며, 목재강도와 보존성이 좋아 내장재, 건축재, 조각재 및 선박재 등으로 널리 쓰인다. 또한 진녹색의 상록수 잎이나 있어 공원수나 조경수로도 널리 이용되며 방풍림의 용도로도 많이 식재하고 있다.

편백나무 잎 추출물에는 다양한 생물학적 활성이 있어 항균, 항염 및 항알레르기활성 등의 유용성분이 최근 보고되고 있고, 특히, 잎으로부터 추출한 flavonoids와 bioflavonoids 등은 다양한 종류의 생물학적 유용 활성물질로 밝혀져 그 활용가치가 매우 높다(Kim et al. 2018).

편백은 산림청에서 지정한 「경제림조성 중점 조림수종」으로 우리나라 주요 조림수종 중 하나이며, 2019년 우리나라 전체 조림면적 중 편백을 26.6% 조림할 계획을 가지고 있다(산림청 2019). 그러나 조림용 묘목생산을 위한 편백 종자의 평균 발아율은 12% 이하로 매우 낮으며(Lee et al. 2011), 따라서 종자생산량은 계획 조림면적의 67%만이 조림이 가능한 묘목을 생산하기에는 턱없이 부족한 상황이다. 따라서 이러한 문제를 해결하기 위해 조직배양 기법으로 클론묘목을 생산함으로써 조림용 묘목의 일부 공급이 가능한 기술개발이 필요한 상황이다.

편백의 기내식물체재분화 연구는 그리 많지 않은데 그 중 Ishii (1986)는 BA와 NAA를 첨가한 배지에서 부정줄기를 유도 후 IBA를 첨가한 배지에서 66.7% 이상의 발근율을 보고하고 있고, Sasamoto et al. (1992)은 자엽절편에서 캘러스를 재분화한 결과를 보고하고 있다. 특히 Ishii et al. (2003), Taniguchi et al. (2004) 및 Maruyama et al. (2003)은 기내줄기 및 미숙종자배로 부터 배발생조직을 유도하여 체세포배에서 식물체까지 유도한 체세포배발생 연구결과가 보고된 바 있다. 또한 측백나무과에 속하는 사이프러스(*Cupressus sempervirens*)

†These authors contributed equally to this work.

J.-A. Kim · N. N. Lee[†] · Y. W. Kim (✉)
국립산림과학원 산림생명공학연구과
(Division of Forest Biotechnology, National Institute of Forest Science, Korea)
e-mail: bravekim@korea.kr

virens var. *horizontalis*)의 기내증식을 위해 BA와 IBA를 처리하여 다신초치로부터 줄기증식을 연구한 연구가 최근 보고되었다(Khamushi et al. 2019). 본 연구에서는 편백의 다신초치 유도를 위한 적정 사이토키닌류의 종류 및 농도 확인, 또한 식물체의 기내 생육을 저해하는 갈변화 현상을 해결하기 위한 몇 가지 항갈변화제 처리효과 연구를 함께 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

편백 기내배양을 위한 재료는 수원시 권선구 주민거주시설 내에 생육하고 있는 35년생 편백에서 5월초 종자를 채취하여 사용하였다. 종자는 흐르는 물에 1시간 동안 침지 처리 후, 70% EtOH에서 1분, 2% NaClO로 20분간 소독 후 멸균수로 3회 세척하여 물기를 제거 후 발아배지에 치상하였다. 발아배지는 1/2 LM (Litvay et al. 1985)배지에 2% sucrose 및 0.3% gelrite를 첨가하였고, 페트리디쉬 당 각 5개의 종자를 파종하여 발아를 유도하였다. 모든 배양조건은 1일 16시간 광주명(40 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 백색 형광등), 25 \pm 2°C로 유지되는 배양실에서 실시하였다.

식물생장조절물질 종류 및 농도에 따른 다신초 유도 효과

종자는 발아배지에 접종 10일 이후부터 발아되기 시작하였고 발아된 소식물체는 다신초 유도를 위한 재료로 사용하였다. 배양을 위한 절편체는 정아가 포함된 1 cm의 길이로 조제하여 배지에 치상하였다. 다신초 유도배지는 1/2LM배지에 6-benzylamino purine (BAP), Zeatin, Kinetin, N⁶-(2-Isopentenyl) adenine(2-iP), Thidiazuron (TDZ) 등 5종류의 사이토키닌류 호르몬의 0.1, 0.2 및 0.5 mg/L의 농도로 각각 첨가하였고, 탄소원으로 3% sucrose와 경화제로는 0.3% gelrite를 각각 첨가하였다. 유리배양병 당 5개씩의 절편체를 배양하였고 5반복 실험을 수행하였으며, 배양 6주 후 식물생장조절물질 종류 및 첨가농도에 따른 다신초 유도율, 유도수 및 신초길이를 조사하였다.

식물생장조절물질의 고농도 → 저농도 순차적 처리에 따른 다신초 유도 효과

다신초 유도율을 향상시키기 위해 사이토키닌 종류별로 고농도로 첨가된 배지에서 3주 배양 후 저농도 첨가 배지로 옮겨 총 7주간 다신초를 유도하였다. 자세히는 배지는 1/2LM 기본배지를 사용하였고, BAP, Zeatin, Kinetin, 2-iP 및 TDZ를 각각 1.0, 2.0, 및 5.0 mg/L의 농도로 첨가하여 고농도 조건에서 3주간, 그리고 같은 호르몬 농도를 1/10로 줄인 농도로 각

각 0.1, 0.2 및 0.5 mg/L가 첨가된 배지에서 8주간 배양하였다. 탄소원으로 3% sucrose와 경화제 0.3% gelrite를 첨가하였고, 유리배양용기에 80 ml의 배지를 첨가 후 5개씩 절편체를 배양하였다. 배양 10주 후 사이토키닌 종류 및 농도에 따른 다신초 유도율, 유도수를 조사하였다.

배지종류 및 염류농도에 따른 줄기 성장 효과

완전한 줄기신장을 위한 배지는 LM (Litvay et al. 1985), 1/2LM, P6(Teasdale et al. 1986), 1/2P6 등 4종류를 사용하였고, 2% sucrose와 0.3% gelrite를 첨가하였으며 배양 5주 후 줄기길이 성장 효과를 조사하였다.

신초갈변화 억제를 위한 항산화제(anti-oxidation) 처리 효과

기내에서 생육 중인 편백 식물체의 정단부에서 갈변되는 현상이 관찰되는데, 정단부에서 시작되어 점차 식물체 전체로 확대되어 식물체가 고사되는 경향을 보였다. 따라서 이러한 현상을 방지 하기 위해 항산화물질을 배지에 첨가하여 그 억제 여부를 확인 하였다. 기본배지는 LM배지를 사용하였으며, 0.5 mg/L zeatin과 2% sucrose, 0.3% gelrite가 기본적으로 첨가된 배지에 5종류의 항산화물질 1) 2.0% Polyvinylpyrrolidone (PVP), 2) 2.0% Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), 3) 0.5% 1,4-Dithiothreitol (DTT), 4) 0.5% 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid (MES) 그리고 5) 1.0% dithioerythritol (DTE)를 첨가하였다. 절편체는 정아가 포함된 신초를 1 cm의 크기로 조제하여 유리배양병에 5개씩 배양하였고, 배양 5주 후 갈변화율 및 줄기길이를 조사하였다.

발근유도 및 식물체 포지이식

발근을 위한 배지는 1/2LM기본배지에 1.0% sucrose와 0.4% gelrite가 첨가된 배지에 0.2, 0.5 및 2.0 mg/L IBA 단독처리 혹은 0.5 mg/L IBA + 1.0 mg/L phloroglucinol (PG), 2.0 mg/L IBA + 1.0 mg/L PG가 첨가된 배지를 각각 사용하였다. 배양 10주 후 발근율, 절편체당 뿌리수 및 뿌리길이를 조사하였고, 발근이 이루어진 식물체는 peat-plug (Flexi-plug, QUICKPLUG, USA)로 이식하여 5주간 순화과정을 후 20 cm 이상 생육한 묘목을 시험포지에 식재하였다.

결과 및 고찰

식물생장조절물질 종류 및 농도에 따른 다신초 유도 효과

정아절편체로부터 다신초 유도를 위해 5종류 사이토키닌류를 농도 별로 배양한 결과 0.5 mg/L zeatin이 첨가된 배지에

Table 1 Effect of plant growth regulator (PGR) on multi-shoot formation from axillary buds in *C. obtuse*

PGR (mg/L)	Multi-shoot (%)	Mean no. of multi-shoot	Length of shoot(cm)
0	20	2.0 ± 0.0	2.1 ± 0.4
BA	0.1	33	2.8 ± 1.3
	0.2	60	3.7 ± 1.9
	0.5	60	4.3 ± 1.7
Zeatin	0.1	40	3.5 ± 1.6
	0.2	73	3.9 ± 2.0
	0.5	80	2.8 ± 1.5
Kinetin	0.1	0	0
	0.2	7	3.0 ± 0.0
	0.5	7	3.0 ± 0.0
2iP	0.1	33	2.0 ± 0.0
	0.2	53	3.5 ± 2.2
	0.5	73	3.1 ± 2.1
TDZ	0.01	7	2.0 ± 0.0
	0.02	47	2.1 ± 0.4
	0.05	33	2.2 ± 0.4

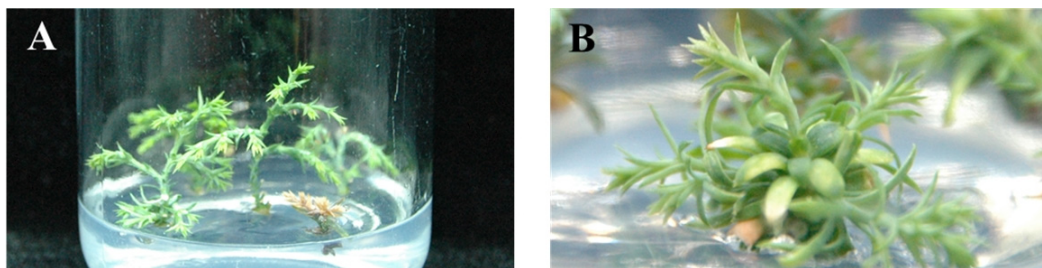


Fig. 1 Effect of PGR on multi-shoot formation from axillary bud culture in *C. obtuse*
 A: No PGR, B: 0.5 mg/L zeatin

서 80%의 다신초가 유도되어 가장 높은 유도율 결과를 얻었으며(Table 1, Fig. 1), 0.2 mg/L zeatin과 0.5 mg/L 2iP에서도 73%의 높은 유도율을 각각 보였다(Table 1). 그 외 0.2와 0.5 mg/L BA에서도 다신초 유도율이 60%로 각각 나타나 비교적 효과가 있었다(Table 1). 그러나 TDZ처리의 경우 모든 농도에서 47% 이하의 저조한 유도율을 보였고, Kinetin의 모든 농도에서 또한 7% 이하의 유도율을 보여 편백의 다신초지 유도에는 적합하지 않은 것으로 나타났다(Table 1). 절편체당 유도된 다신초의 갯수비교에서는 0.5 mg/L BA에서 평균 4.3개로 가장 많이 유도되었으며, 0.2 mg/L zeatin, BA 및 2iP 처리구에서 각각 3.9, 3.7 및 3.5개가 유도되어 다소 효과가 있었다. Kinetin 및 TDZ처리구의 경우 2~3개 이하의 신초가 유도되어 BA 혹은 zeatin처리구와 비교하여 다신초 유도를 위한 그 효과가 낮았다(Table 1). 줄기길이는 무첨가구의 2.1 cm 및 0.2 mg/L 2iP처리에서 2.0 cm로 효과가 있었으나, Kinetin 전체 농도에서는 줄기길이 평균 1.3 cm로 다신초지 유도율, 절

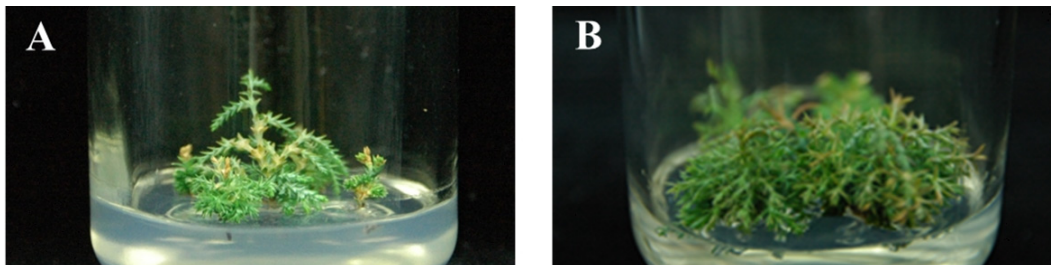
편당 평균 다신초지 개수 그리고 줄기길이 모두 저조한 결과를 보였다. Ishii (1986, 2003)는 편백의 부정아 유도 시 CD배지에 2.25 mg/L BA 첨가로 최대의 부정아를 유도하였고, Min 등(2010)은 2.0 mg/L BA처리에서 높은 부정신초지가 유도되었다고 보고하고 있으나 본 연구의 경우 zeatin처리에서 다신초지 유도율 및 유도개수가 높게 나타나 기존 최적의 사이토키닌 종류 및 그에 따른 농도와는 차이를 보였다.

다신초 유도를 위한 식물생장조절물질의 고농도 → 저농도 순차적 처리효과

Table 1의 결과를 바탕으로 보다 효과적인 다신초 유도를 위해 고농도 사이토키닌류에서 3주간 배양 후 저농도 배지에서 다시 7주간 배양하여 다신초를 유도하였다. 그 결과 다신초 유도율은 zeatin처리구 모든 농도에서 100%의 유도율을 보였으며, 또한 5.0 → 0.5 mg/L BA, 2.0 → 0.2 mg/L Kinetin 및

Table 2 Effect of sequential PGR treatment from high concentration for 3 weeks to low one for 10 weeks on multi-shoot formation in *C. obtuse*

	PGR (mg/L)		Multi-shoot (%)	Mean no. of multi-shoot
	1st.	2nd.		
Control	0	0	87	2.1 ± 0.6
BA	1.0	→ 0.1	87	6.3 ± 4.5
	2.0	→ 0.2	93	5.4 ± 2.5
	5.0	→ 0.5	100	7.9 ± 3.8
Zeatin	1.0	→ 0.1	100	6.6 ± 3.4
	2.0	→ 0.2	100	7.9 ± 3.0
	5.0	→ 0.5	100	17.1 ± 9.2
Kinetin	1.0	→ 0.1	67	3.5 ± 2.4
	2.0	→ 0.2	100	4.5 ± 2.3
	5.0	→ 0.5	73	5.3 ± 3.3
2iP	1.0	→ 0.1	93	4.8 ± 1.9
	2.0	→ 0.2	87	7.7 ± 4.7
	5.0	→ 0.5	100	11.6 ± 4.8
TDZ	1.0	→ 0.1	73	3.9 ± 2.5
	2.0	→ 0.2	87	3.3 ± 1.6
	5.0	→ 0.5	60	2.9 ± 3.3

**Fig. 2** Effect of sequential PGR treatment from high concentration for 3 weeks to low one for 10 weeks on multi-shoot formation in *C. obtuse*

A: No PGR, B: 5.0 mg/L zeatin (3 weeks) → 0.5 mg/L (7 weeks)

5.0 → 0.5 mg/L 2iP처리에서도 100%의 유도율을 나타냈다 (Table 2, Fig. 2). 반면 최저 유도율은 5.0 → 0.5 mg/L TDZ 순차처리에서 60%로 가장 낮은 유도율을 보였다(Table 2). 절편체당 유도된 신초지갯수 비교에서 5.0 → 0.5 mg/L zeatin 순차처리에서 평균 17.1개로 가장 높았으며, 그외 5.0 → 0.5 mg/L 2iP처리의 경우 평균 11.6개의 신초가 유도되어 다소 효과를 보였다. 그러나 Kinetin과 TDZ처리구에서는 평균 2.9~4.5개의 신초만이 유도되어 그 효과는 매우 저조하였다(Table 2). Katy et al. (1993)은 서양측백(white cedar)의 기내재분화를 위한 다신초지 유도를 위해 2.0 mg/L zeatin을 3주간 처리 후 zeatin 무처리 배지에서 8주간 배양한 결과 14개 이상의 많은 다신초를 유도하였다고 보고하고 있어 본 연구결과와 다소 유사하였다. 또한 독일가문비(*Picea abies*)의 경우 측지로부터 부정신초의 유도에는 50 mg/L BA가 첨가된 액체배지에

침지 후 8주간 배양으로 30개 이상의 부정신초를 얻었다고 보고하고 있어(Arnold and Tillberg 1987) 다양한 식물생장조절물질 처리방법이 적용됨을 알 수 있다. Joseph et al. (2018)은 사이토키닌류는 액아분열조직(axillary bud meristem)의 세포증식을 촉진하는 역할을 하며, 고농도처리는 식물체에는 스트레스로 작용한다고 보고하고 있는데 본 연구결과에서도 고농도→저농도 식물생장조절물질을 1/10로 줄여 배양한 결과 Table 1에서 언급한 결과와 비교하여 6배 이상 다신초 유도갯수가 증가하여 그 결과와 다소 부합되는 경향을 보였다. 이러한 결과는 위에서 언급한 것과 같이 고농도의 식물생장조절물질이 스트레스 요인으로 작용하여 줄기절편의 액아(잠아) 및 정아분열조직의 세포증식 및 발달을 촉진하여 더 많은 다경신초를 유도했기 때문인 것으로 생각된다.

배지종류 및 염류농도에 따른 줄기 성장 효과

유도된 다신초지의 길이 신장을 위해 LM배지와 P6배지의 염류농도를 달리한 배지에 각각 배양한 결과 최대 줄기 길이 신장은 LM배지에서 2.62 cm였으며, 1/2 P6배지에서 1.78 cm로 최저의 줄기신장을 보였다(Table 3). Ishii (1986)는 CD (Campbell and Durzan)배지에 0.005 mg/L NAA를 첨가한 배지에서 줄기의 길이신장이 가장 우수하다는 결과를 보고하여 그 효과는 매우 다양하게 나타났다. 또한 Ishii (1986)는 CD배지에서의 줄기길이 또한 2.0cm 이상 신장되었다고 보고하고 있어 본 연구에서 사용된 LM배지의 경우도 2.6cm의 줄기 성장을 보여 효과가 좋았다.

신초 정단부 갈변화 억제제 처리 효과

부정아로부터 유도된 신초는 줄기신장 배지에서 배양되는 동안 정단부가 갈변화 되면서 고사하는 현상이 나타났는데, 이것은 정단부에서 시작되어 점차 줄기전체로 확대되어 결국 식물체를 고사시켰다. 따라서 이러한 갈변화 방지를 위한 5종류의 항산화제를 처리한 결과 MES처리구에서 갈변화율 37.5%로 가장 낮아 비처리구(81.3%)와 비교하여 2배 이상의 갈변화 억제효과가 가장 높았으며(Table 4) 그 다음으로는 PVPP와 DTT처리에서는 62.5%, 60.7%로 비처리구에 비해 갈변화가 다소 억제됨을 확인할 수 있었다(Table 4). 줄기의 길이증식 비교에서 MES처리 시 1.3 cm로 가장 높았고, DTE처리구에서는 1.2 cm로 MES와 유사하였으나 DTT 및 PVPP는 무처리구보다 낮은 신초증식율을 보였다(Table 4). 항산화제 기능은 특정 환경에서 전자공여체(electron donor), 즉, 다른 분자나 이온에 전자를 용이하게 전달해주는 역할로 작용하여 산화 과정을 억제시킬 수 있다고 알려져 있는데 (Benson et al. 1995, Benson 2000) 조직배양연구에서 항산화제를 사용하는 이유는 배양절편체의 절단면 조직이 공기와 직접 접촉하여 생기는 세포의 산화에 의한 갈변화 및 괴사 등 식물체 발달을 방해하는 요소를 제거함으로써 식물재분화 생존율을 높이기 위한 것이다(Malabadi et al. 2005). 본 연구 결과에서는 MES처리에서 갈변화 억제율이 가장 높게 나타났는데, MES는 pH를 유지하기 위한 버퍼로 사용된다고 알

Table 3 Effect of kind or salt strength of culture medium for shoot elongation in *C. obtuse*

Medium	Shoot length (cm)
1/2 LM	1.97 ± 0.53
LM	2.62 ± 0.61
1/2 P6	1.78 ± 0.40
P6	2.12 ± 0.42

Table 4 Effect of anti-oxidation compound for inhibiting shoot browning or elongation in *C. obtuse*

Treatment (%)	Shoot browning (%)	Shoot elongation (cm)
Control	81.25	0.8 ± 0.3
2.0 PVP	50	0.6 ± 0.3
2.0 PVPP	62.5	0.5 ± 0.2
0.5 DTT	60.7	1.0 ± 0.5
1.0 DTE	54.2	1.2 ± 0.5
0.5 MES	37.5	1.3 ± 0.8

려져 있고 최근에는 활성산소를 억제하는 기능을 한다는 것이 보고되었다(Kagenishi et al. 2016). 본 연구에서 나타난 신초의 정아부 갈변화 혹은 괴사의 원인은 주로 절편체 조제 시 상처 스트레스 등에 의해 발생한 ROS(활성산소)등의 요인으로 세포막 등이 손상을 입어 발생된 결과라고 추정된다.

발근유도 및 식물체 포자 식재

2 cm 정도의 신초 줄기로부터 발근을 유도하기 위해 옥신 단독 혹은 Phloroglucinol (PG)과 혼용 처리한 결과, 0.2 mg/L와 0.5 mg/L IBA처리구에서 65%의 최대 발근율을 보였다(Table 5). 반면 0.5 mg/L IBA+ 1.0 mg/L PG처리구에서는 50%의 다소 낮은 발근율을 보였으나 2.0 mg/L IBA와 0.5 mg/L IBA + 1.0 mg/L PG처리구에서는 전혀 발근이 되지 않았다. 최대 뿌리 발생갯수는 2.0 mg/L IBA+ 1.0 mg/L PG처리구에서 6.6개로 가장 효과적이었으나 0.5 mg/L IBA처리구에서는 평균 4.1개, 0.2 mg/L IBA에서는 평균 3.9개로 다소 낮았다. 뿌리길이 비교에서는 IBA 무처리구에서 2.3 cm로 최대였으며 그

Table 5 Effect of IBA and phloroglucinol (PG) treatment for root induction in *C. obtuse*

PGR (mg/L)	Rooting (%)	No. of root	Root length (cm)
0	35	2.3 ± 0.9	2.3 ± 2.3
IBA 0.2	65	3.9 ± 1.3	0.8 ± 0.3
IBA 0.5	65	4.1 ± 0.8	0.4 ± 0.4
IBA 2.0	0	-	-
IBA 0.5 + PG 1.0	0	-	-
IBA 2.0 + PG 1.0	50	6.6 ± 2.8	0.6 ± 0.2

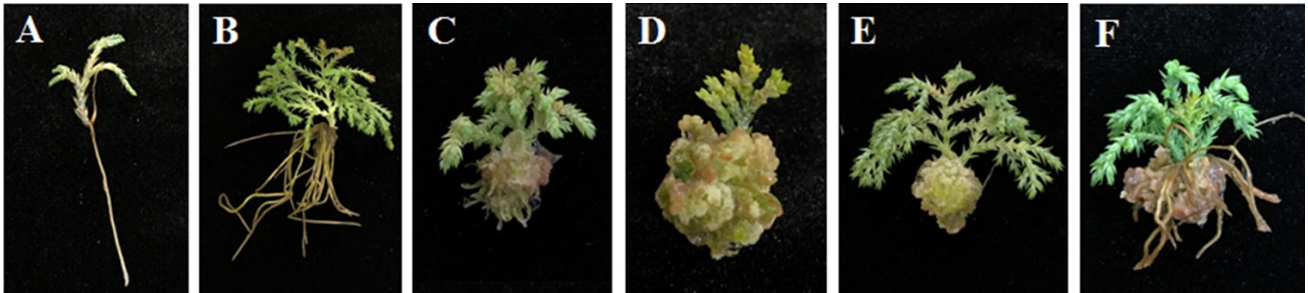


Fig. 3 Effect of IBA and PG on rooting in *C. obtuse*

A: Control, B: 0.2 mg/L IBA, C: 0.5 mg/L IBA, D: 2.0 mg/L IBA, E: 0.5 mg/L IBA + 1.0 mg/L PG, F: 2.0 mg/L IBA + 1.0 mg/L PG.



Fig. 4 Potted plants after acclimation (left) and transplanted to nursing bed for further growth (right) in *C. obtuse*

의 0.4~0.8 cm로 대체로 낮은 뿌리길이 신장을 보였다(Table 5). Ishii (1986) 등은 3.0 mg/L IBA, 0.1 mg/L NAA 및 1.0 mg/L riboflavin을 첨가하여 66.7%의 발근율을 얻었다고 보고하여 0.2~0.5 mg/L IBA의 단독처리구에서 보인 65% 발근율과 비교하면 IBA 고농도 첨가 시 높은 발근율을 보고하고 있다. Phloroglucinol (PG)는 리그닌의 생합성 경로에서 phloridzin 및 전구체의 분해 산물에서 형성된 페놀화합물로 다양한 식물체발근에 유리한 화합물로만 알려져 있다(Teixeira da Silva et al. 2013). 그러나 본 연구에서는 2.0 mg/L IBA와 1.0 mg/L PG를 동시에 첨가 시 높은 발근율과 발근수를 보였으나 뿌리 주위로 캘러스가 형성되어 이는 차후 완전한 발근 식물체로 획득하는 데는 다소 불리한 것으로 보여 IBA를 단독 처리하는 것이 보다 효과적일 것으로 생각된다. 이렇게 유도된 식물체는 순화과정을 거쳐 포트묘로 이식하여 더욱 성장시킨 후, 포지에 이식하였고, 포지에서의 순화식물체 생존율은 100%를 보였고 현재 묘고 30 cm 이상으로 길이 성장하며 건전하게 생육 중에 있다.

본 연구에서는 한 개의 신초에 다양한 사이토키닌류를 처리하여 그로부터 다신초를 유도하고 발근과정을 거친 후 완전한 식물체재분화가 가능하였고 이 식물체는 순화과정을 거쳐 생육포지로 이식하여 더욱 성장을 이루는 결과를 도출하였다. 따라서 이렇게 개발된 편백의 식물체재분화 조직배양기술은 종자발아율이 저조하여 묘목보급에 어려움을 겪

고 있는 조림용 묘목공급을 위한 일부 보완기술로 활용이 가능하며, 더 나아가 남부지방에서만 편백의 국한된 식재지를 점차 그 범위를 넓혀 북쪽지방에서도 가능한 내한성 수종 개발 등의 다양한 임목육종연구에 활용이 가능할 것으로 기대된다.

적 요

본 연구에서는 편백의 다신초 유도를 통한 기내 식물체 재분화기술을 개발하고자 본 연구를 수행하였다. 이를 위해 먼저 다신초 유도를 위한 적정 사이토키닌의 종류 및 농도별 처리에서 1/2LM배지에 0.2 mg/L zeatin의 처리구에서 가장 높은 73%였으며, 절편체 당 평균 3.9개 다신초가 유도되었다. 그리고 사이토키닌의 고농도→저농도의 순차적 처리의 경우 5.0 mg/L→0.5 mg/L zeatin 처리구에서 100%의 신초 유도율과 절편체 당 17.1개의 가장 많은 다신초가 유도되어 다신초 유도를 위한 최적 조건으로 확인되었다. 신초의 길이신장을 위한 배지는 LM배지에서 배양할 경우 2.62 cm로 가장 좋은 길이생장의 결과를 얻었다. 신초정단부의 갈변화 현상을 억제하기 위해 항산화제 처리 결과 0.5% MES 처리구에서 37.5%의 갈변화증상만이 보여 무처리구에 비해 2.5배 이상 갈변화 억제 효과가 있었으며, 그에 따른 줄기 길이 신장

또한 1.3 cm로 가장 좋게 나타났다. 신초의 발근은 0.2 mg/L IBA처리구에서 65% 발근율과 3.9개 뿌리가 유도되어 가장 효과적인 처리구였으며, 이렇게 재분화된 기내식물체는 순화를 거쳐 현재 생육포지에서 활발히 생육 중에 있다.

Reference

- Arnold SV, Tillberg E (1987) The influence of cytokinin pulse treatments on adventitious bud formation on vegetative buds of *Picea abies*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 9:253-261
- Benson EE (2000) Do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance? *In Vitro Cell Dev. Biol-Plant* 36:163-170
- Benson EE, Lynch PT and Jones J (1995) The use of the iron chelating agent desferrioxamine in rice cell cryopreservation: a novel approach for improving recovery. *Plant Sci* 110:249-258
- Forest Resource Division, Forest Industry & Policy Bureau, Korea Forest Service (2019) 2019 Forest Resource Section Business Plan. p7
- Ishii K (1986) In vitro plantlet formation from adventitious buds on juvenile seedlings of Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*). *Plant Cell Tiss Org Cult* 7:247-255
- Ishii K, Maruyama E and Hosoi Y (2003) Plant regeneration by somatic embryogenesis from in vitro-cultured shoots of hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc.). *Propa Orna Plants* 3:19-22
- Joseph J Kieber and Eric Schaller G (2018) Cytokinin signaling in plant. *Dev* 145: dev149344. doi:10.1242/dev.149344
- Khamushi M, Dehestani-Ardakani M, Zarei A, Kamali Aliabad K. (2019) An efficient protocol for micropropagation of old cypress of Abarkuh (*Cupressus sempervirens* var. *horizontalis* [Mill.]) under in vitro condition. *Plant Cell Tiss Org Cult* 138:597-601
- Kim JH, Lee SO, Do KB, Ji WD, Kim SG, Back YD and Kim KJ (2018) Analysis of the Component and Immunological Efficacy of *Chamaecyparis obtusa* Leaf Extract. *Kor J Clin Lab Sci* 50(1):37-43
- Kagenishi T, Yokawa K and Baluška F (2016) MES buffer affects *Arabidopsis* root apex zonation and root growth by suppressing superoxide generation in root apex. *Frontiers in Plant Sci* 7:79
- Katy A. Nour and Trevor A. Thorpe (1993) In vitro shoot multiplication of eastern white cedar (*Thuja occidentals*). *In Vitro Cell Dev-Plant* 29:65-71
- Lee SW, Cho MS, Kim WG, Kim JW, Chu NH (2011) Containerized seedling production system of *Chamaecyparis obtusa*. *NIFoS* 413:30
- Litvay JD, Verma DC and Johnson MA (1985) Influence of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Rep* 4:325-328
- Malabadi RB, Van Staden J (2005) Role of antioxidants and amino acids on somatic embryogenesis of *Pinus patula*. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 41:181-186
- Maruyama E, Hosoi Y and Ishii K (2003) Somatic embryo culture for propagation, artificial seed production, and conservation of sawaracypress (*Chamaecyparis pisifera* Sieb. et Zucc.) *J For Res* 8:1-8
- Min JY, Park DJ, Jeong MJ, Song HJ, Kim YD, Kang YM, Karigar CS, and Choi MS (2010) In vitro propagation of *Chamaecyparis obtusa* sieb. et Zucc. *Propa Orna Plants* 10:117-121
- Okamura M, Senda M and Kondo T (1994) Rooting from the encapsulated adventitious buds of Hinoki, *Chamaecyparis obtusa*. *Jpn For Soc* 76:601-603
- Sasamoto H, Kondo A, Hosoi Y, Maki H and Odani K (1992) Callus regeneration from cotyledon protoplasts of *Chamaecyparis obtusa* (Hinoki cypress). *In Vitro Cell Dev Bio-Plant* 28(3):132-136
- Taniguchi T, KUrta M, Itahana N and Kondo T (2004) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc.) *Plant Cell Rep* 23:26-31
- Teasdale RD, Dawson PA, Woolhouse HW (1986) Mineral nutrient requirements of a loblolly pine (*Pinus taeda*) cell suspension culture. *Plant Physiol* 82:942-945
- Teixeira da Silva JA, Dobránszki J and Ross S (2013) Phloroglucinol in plant tissue culture. *In Vitro Cell Dev-Plant* 49:1-16