한 상 섭 교 수 지 도
농 학 박 사 학 위 논 문

제주산 왕벚나무(*Prunus yedoensis* Matsumura)의 기내배양을 통한 대량증식기술에 관한 연구

A Study on Mass Propagation of *Prunus yedoensis* Matsumura from Cheju Using *In Vitro* Culture Techniques

강 원 대 학 교 대 학 원

임 학 과

정 은 주

목 차

약 어

Media

B_5	Gamborg *et al.*, 1968
GD	Gresshoff and Doy, 1972
MS	Murashige and Skoog, 1962
1/2MS	Half strength of salts of MS medium(full vitamins)
WPM	Lloyd and McCown. 1981

Plant Growth Regulators

BAP	6-benzylaminopurine
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
GA_3	Gibbellic acid
IBA	Indole-3-butyric acid
Kinetin	6-furfurylaminopurine
NAA	α-Naphthaleneacetic acid
Zeatin	6-[4-hydroxy-3-methyl-2-butenylamino]purine

Chemicals for Sterilization

$HgCl_2$	Mercuric Chloride
NaOCl	Sodium Hypochloride

List of Tables

List of Figures

I. 서　　론

장미과의 벚나무속 식물은 낙엽성의 교목 또는 관목으로 약 200여종 이상이 북반구의 아열대 또는 온대지방에 분포하고 있으며(Bailey and Bailey, 1976; Cronquist, 1981; Mabberley, 1987; Hotta *et al.*, 1989), 벚나무속의 식물 중 살구나무(*Prunus armenianca*)와 복사나무(*Prunus persica* (L.) Stokes)는 유실수로서 여러 나라에서 오랫동안 재배되어 왔다. 유럽등에서 가장 많이 재배되고 있으며, 상업성이 높은 스위트체리의 품종들은 *Prunus avium*에서 유래된 것들이며, 이외 다른 종류의 체리 품종을 생산하기 위한 육종연구가 활발하였다. 우리나라에서 벚나무속 식물은 유실수의 목적과 함께 왕벚나무, 올벚나무, 산벚나무 및 벚나무 등이 관상적 가치를 높이 평가받고 있으며, 아울러 이 식물들은 목재로서의 가치가 인정되어 조림에 이용되고 있다. 그 중 가로수로 가장 널리 식재되어 있는 수종은 왕벚나무(*Prunus yedoensis* Matsumura)로 일본에서 도입된 것으로 알려져 있다.

이와 같이 왕벚나무는 경제성이 높고 국내 외에 널리 보급되어 있으나 자생지와 기원에 대한 분류학적 논의가 활발하게 이루어진 분류군으로(Park, 1965), 최근에 한라산에 자생하고 있는 왕벚나무가 다수 발견되었고, 그 유전적 변이가 매우 다양하여 독립종으로 인정되고 있다(김, 1998). 제주에 자생하고 있는 왕벚나무는 가로수로 심겨진 왕벚나무와는 개화형질 및 유전적 변이가 다양하여 새로운 조경수 또는 특성에 따라 목재의 이용도 가능할 것으로 생각된다. 따라서 새로운 품종으로 개발할 가치가 있다. 그러나 한라산에 자생하고 있는 왕벚나무는 분포지와 개체수가 한정되어 있으며 노령목으로 알려져 있다. 왕벚나무는 자연발아에 의한 증식이 어려울뿐만 아니라 삽목이나 접목에 의한

전통적인 방법으로의 영양증식에서도 발근율이 매우 낮아 대량으로 증식하기에는 한계가 있다.

조직배양법은 식물 육종(Chalupa, 1977; Wann *et al.*, 1988)과 목본식물의 우수한 유전형을 대량으로 증식하기 위한 유력한 수단으로 왕벚나무에서와 같은 증식상의 문제점을 극복할 수 있으며(Ahuja, 1987; Lloyd and McCown, 1981; Son and Hall, 1990; Wann and Einspahr, 1986), 보다 다양한 품종을 증식하는데 적절한 방법이다. 목본식물에 대하여 활엽수 중 포플러(Ahuja, 1984; Barocka *et al.*, 1985; Park and Son, 1988; Son and Hall, 1990; Cheong and Yi, 1997), 참나무류(*Quercus* spp.)(Moon *et al.*, 1987) 등과 침엽수의 *Abies*(Bonga, 1977), *Picea*(Campbell and Durzan, 1975); Kim and Park(1987) 등의 조직배양에 관한 연구와 개체수가 적은 희귀종을 인공으로 대량증식하려는 연구가 수행되었다(Lee *et al.*, 1987; Youn *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1995). 그러나 왕벚나무에 대한 조직배양의 연구는 집중적으로 이루어지지 않았으며(Kim *et al.*, 1993), 국내에서는 벚나무속 식물에 대한 대량증식 방법에 대한 연구도 매우 적다.

본 연구는 조직배양방법을 이용하여 한라산에 자생하고 있는 왕벚나무를 기내 증식하는데 미치는 요인과 기내 증식된 식물체의 환경순화에 영향을 미치는 요인들을 구명하고, 조직배양법을 이용하여 증식된 식물체가 환경순화과정에서 형태적 또는 유전적으로 안정되어 있는지 조사하여 체계적인 대량증식법을 확립하고자 하였다.

Ⅱ. 연 구 사

벚나무류의 조직배양은 주로 열매에 생기는 바이러스에 의한 병해를 제거하기 위한 무병주생산을 목적으로 이루어져 왔다. 배양에 이용된 시료는 미숙 또는 성숙한 종자의 배, 정단부와 분열조직, 약배양, 원형질체 배양 등이었으며, 캘러스나 부정아를 유도하는 다양한 방법으로 연구되어 왔다. 조직배양을 통하여 육종한 대부분의 종들은 유럽에 자라고 있는 수종이었으며, 이와 유사한 수종으로서 서양자두나무 등에 대한 연구가 이루어졌으나, 왕벚나무, 올벚나무, 벚나무 등 목재이용 및 조경수로서 가치가 있는 종들에 대한 연구는 이루어진 바가 매우 적다.

벚나무류의 조직배양 초기에는 주로 배를 절편체로하여 이를 인공적으로 발아시켜 유묘를 얻었다. 1933년 Tukey는 처음으로 *P. avium*의 배를 배양하였는데 배양당시 배의 크기에 따라 기관형성에 차이가 있었다고 하였다. 이후에 같은 수종에서 Zdrujkovskaja-Richter(1983)가 미숙배를 배양하였으며, Hurby(1962)는 *P. avium*과 *P. cerasus*의 교잡종의 미발달된 종자를 배양하므로써 유묘를 얻었다. Ivanicka와 Morkra(1982), Yenikev 등(1984) 이 여러 발달단계의 배를 배양하였다. Ramming(1985)은 *Prunus*류의 배를 이용한 배양에서 sucrose의 농도와 온도에 따라 발아에 차이가 있었다고 하였다. Mante 등(1989)은 *P. persica*의 미성숙배와 *P. domestica*, *P. cerasus*의 성숙배를 IBA와 TDZ가 첨가된 MS 배지에서 줄기를 생산하였는데 이때 배축을 제거하여야만 줄기를 얻을 수 있었다고 하였고 IBA가 줄기형성에 필수적인 요소라고 하였다. 국내의 벚나무류에 대한 연구로는 고 등(1997, 1998)이 미성숙 접합자배로부터 체세포배 발생을 통한 식물체 재생을 유도하였다. 그러나

형질이 매우 다양한 자생 왕벚나무를 유전자원으로서 증식하기 위해서는 접합자 배를 이용하면 그 모수의 형질과는 다른 형질이 나타나므로 클론증식을 위해서는 다른 영양조직을 이용한 조직배양법이 개발되어야 할 것이다. 영양조직을 이용한 배양법에 사용되는 절편체들은 주로 성숙목의 동아, 줄기의 정단부, 분열조직(정단분열조직 및 형성층) 및 뿌리와 같은 것들이 있으며, 벚나무속의 체리를 유실수로 이용하기 위하여 연구자들은 다음과 같은 영양조직을 이용한 배양법을 연구하였다.

1. 정단부 및 분열조직의 배양

Boxus(1971), Boxus와 Quoirin(1974; 1977), Quoirin 등(1977)은 여러 종류의 벚나무류의 분열조직을 이용하여 새로운 유전형을 증식하였으며, 무병주를 생산해 냈다. 이 중 Quoirin 등(1977)은 왕벚나무 등 벚나무속 식물의 분열조직을 이용하였다. Rosati 등(1980)은 일본자두나무의 정단부를 MS배지에 BA 1.0, GA_3 0.1, IBA 0.1㎎/ℓ를 첨가하여 배양하였다. 배양 7 8주 후에 정아 및 측아에서 15 20개의 줄기가 형성되었으며, 이들 줄기는 신장배지에 옮긴 후 IBA 1.0㎎/ℓ가 첨가된 배지에서 발근하였다. 또한 Tricoli(1982)는 *P. serotina*의 성숙목의 접수로부터 얻은 측아를 배양하여 BA, GA_3, IBA가 첨가된 MS배지에서 다경줄기를 유도하였고 유도된 줄기를 암상태에서 발근시켰다. 그리고 Tricoli 등(1985)은 *P. serotina*의 동아를 이용한 배양에서 5배의 줄기를 얻는데 성공하였으며, 빛이 있는 조건에서 낮은 발근율을 rutin과 quercetin을 첨가하여 높일 수 있었다. Druart(1985)는 *P. avium*의 분열조직을 배양하여 같은 형질의 식물체를 재생하였으며, Boxus와 Druart(1985), Bjarnason 등(1985)은 0.1 0.3㎜의 분열조직을 배양하였는데 바이러스를 제거하기 위해서는 온도처리가 필요하다고 하였다. Deogratias 등(1986)은 기내

에서 미세접목을 실시하였으며, 분열조직을 배양하므로써 바이러스를 제거하였다. Snir(1982)와 Druart(1985)는 서로 다른 두 종을 배양하였을 때 *P. avium* 보다 sour cherry가 더 높은 효과가 있다고 하였다. 왕벚나무의 기내배양법은 국내에서 김 등(1993)에 의해 연구된 바 있는데 동아를 절편체로하여 개엽 후 BAP와 GA_3가 첨가된 배지에서 평균 3.4개의 줄기를 얻었으며, IBA가 첨가된 배지에서 60%의 발근율을 얻었다고 하였다. *Prunus*에 대한 국내와 국외의 연구는 주요 목적이 상이하다. 국외에서는 주로 열매생산을 위하여 무병주를 생산하기 위한 방법으로 조직배양법이 이용되었으며, 국내에서는 연구된 바가 적으나 목재로서 또는 관상용으로서의 가치를 가진 우수한 자원을 보존 증식한다는 것이었다. 그러나 방법에 있어 분열조직을 가진 조직을 이용하였으며, 품종에 따라 다경줄기 유도 및 발근에 있어 상이한 반응이 나타났다.

2. 캘러스배양

식물체의 캘러스를 통한 배양은 식물의 전형성능을 이용한 것으로 이 배양법을 확립하므로써 세포융합이나 식물체 내로 외래유전자를 도입시키기 위한 재료를 준비하기 위해서 흔히 이용되고 있다. 캘러스배양에 의한 식물체 재생은 포플러류에서 시작하였다(Mathes, 1964; Lee and Kim, 1987, Chang *et al.*, 1989). *Prunus*종에 대한 연구는 Druart(1980)가 *Prunus* 종의 분열조직에서 재생된 식물체의 뿌리에서 캘러스를 유도하고, BA 1.0, GA_3 0.1㎎/ℓ가 첨가된 배지에서 줄기를 재생하였으며, 식물의 뿌리 캘러스에서 체세포배를 유도하였다(Druart, 1981). Druart 와 Boxus(1985)는 뿌리 캘러스에서 줄기를 유도하고 유도된 식물체의 유전적 안정성을 밝혔다.

3. 형질전환

캘러스배양체계가 확립된 종에 대해 여러 가지 유용한 형질을 도입하려는 시도로서 식물에는 *Agrobacterium*을 매개로하여 소나무(Choi *et al*., 1988), 포플러류(Kim *et al*., 1989; Lee *et al*., 1989; Kim *et al*., 1995)등에 새로운 유전자를 도입하는 연구가 이루어져 왔다.

*Prunus*류는 바이러스에 의해 과실의 수확에 어려움이 있어 많은 연구자들이 이에 저항성 유전자로 형질전환시키려는 노력을 하여 왔다. Machado 등(1992)는 *Agrobacterium tumefaciens*를 통하여 GUS marker와 poty pot virus의 저항성 유전자를 *P. armeniaca*의 미성숙배에 도입한 후 41개의 형질전환 식물체를 얻었으며, PPV coat protein 유전자를 PCR로 확인하였다. James 등(1993)도 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 형질전환법을 보고하였으며, Tiziana 등(1995)은 *Agrobacterium tumefaciens*를 통하여 잎조각에 pBinGUSint를 vector로하여 NPT II와 GUS 유전자를 형질전환하였을 때 *P. amygdalus*의 두 품종에 각각 48.6, 27.9%가 성공하였다고 하였다. Scorza 등(1995)은 서양자두나무의 배축절편에 아그로박테리움을 매개로하여 papaya ring spot virus coat protein을 발현하도록 형질전환하였다.

4. 약배양

약배양은 반수체식물을 육성하는 방법으로서 순계를 육성하기 위하여 이용된다. 포플러의 경우 여러 종에서 약배양을 통하여 반수체가 육성되었다(Hyun *et al*., 1986). 그러나 대부분 적응력이 약하여 실제 이용에는 어려움이 있다고 하였다(Kim 등, 1983). *Prunus* 속에 있어서는 1972년 Harn과 Kim이 *Prunus americana*의 약으로부터 캘러스를 유도하였으나 식물체를 얻지는 못했다. Seirlis 등(1979)은 sour cherry의 한 품종의 약으로부터 캘러스를 유도

하고 그로부터 4개월 후에 줄기를 유도하였다. 유도된 식물체의 유전적인 안정성 검정을 위하여 염색체를 조사한 결과 모체와 동일한 것으로 나타났으나 그렇지 않은 개체도 나타났다.

조직배양에 있어 기내에서 성공적인 증식이 가능하다 할지라도 기외 즉 야외환경에 적응하여 정상적으로 생장하는 것이 중요하다. 일반적으로 조직배양을 통하여 증식된 개체는 실생묘나 삽목등에 의해 증식된 개체와는 매우 다른 생리적 특성을 가지는 것으로 보고되어 있다.

Grout and Aston(1977)과 Shutter and Langhans (1979)는 기내에서 배양된 식물체의 잎은 표면에 Wax층이 덜 발달되어 있다고 하였으며, Brainerd 등(1981)과 Fuchigami 등(1981)은 기내배양된 식물체의 엽육세포에 공기층이 많아 기외에 이식한 후에 과다한 증산에 의해 마르고 결국은 죽게 된다고 하였다. Gilly 등(1997)은 Ivy를 기외에서 순화하는 동안 잎의 큐티클층은 기내에서 기외로 옮겨진 후 식물의 큐티클층의 생합성이 일시적으로 감소하여 두께가 얇았으나 기외의 어린 잎에 큐티클에 방사능표지가 잘 된 것은 새로운 환경에 적응하기 위해 급속히 활성이 활발해졌기 때문이라고 하였으며, Wetzstein과 Sommer(1982)는 *Liquidambar styraciflua*의 기내식물체와 순화된 식물체의 잎의 해부학적인 관찰결과 환경순화된 잎의 큐티클층이 발달되어 있다고 하였다. 기내 식물체의 여러 특성은 순화과정 중 식물의 활착에 중요한 영향을 미치는 요인으로 이에 대한 연구가 이루어져 왔다. 조직배양법이 상업적으로 잘 이용되고 있는 포플러의 경우 조직배양묘의 순화시 활착율을 높이는 System이 잘 개발되어 있으며(Zimmerman and Fordham, 1985), 더 높은 활착율을 위해 다양한 순화방법들이 개발되어 왔다(Son and Hall, 1993).

Ⅲ. 재 료 및 방 법

1. 기내배양

제주도 한라산 천연림에 자생하고 있는 왕벚나무중 수악교에서 한 클론을 선정하여 동아를 2월에 채취하여 배양에 착수하였다. 채취한 동아는 화아를 제거하고 정아 및 측아를 1 2cm의 소지를 포함하여 조제하고, 계면활성제를 넣어 흐르는 물에 2시간동안 세척한 후 70% 에틸알콜을 1분간, 2% NaOCl : 0.2% $HgCl_2$ = 2:1(w/w)로 하여 30분간 흔들어 세척을 한 후 멸균수로 3회 세척하고, 소지부분은 에틸알콜로 화염소독하였다. 표면소독된 동아는 소지의 수피를 제거하고, 아린을 제거한 후 0.5 1cm의 소지를 포함하여 배지에 치상하였다.

1〕동아배양

1) 동아채취시기 및 배지내 무기물(NH_4NO_3)의 농도에 따른 동아의 전개

수악교에 자생하고 있는 왕벚나무를 선정하여 10월부터 익년 2월까지 매달 동아를 채취하여 계절에 따른 동아의 전개율을 조사하였다. 배지는 초대배양에 사용하였던 배지조합을 이용하였다. 배지는 WPM(Lloyd and McCown, 1984) 배지의 다량원소와 미량원소 및 비타민을 기본으로 하였고, WPM 배지의 다량원소 중 NH_4NO_3의 농도를 1배(400㎎/ℓ), 2배(800㎎/ℓ), 3배(1,200㎎/ℓ)로 조절하였다. Sucrose는 30g/ℓ를 첨가하였으며, pH는 5.7, Agar 7g/ℓ를 첨가한 후 전자렌지에서 중탕한 후 시험관에 10㎖를 분주하고 알루미늄 호일을 씌워 121℃, 1.5㎏/㎠로 15분간 멸균하였다.

2) 생장조절물질의 종류 및 농도에 따른 동아의 전개

WPM배지에 BAP, IBA 및 GA_3를 1.0, 2.0, 3.0 ㎎/ℓ를 각각 첨가하여 각각의 생장조절물질에 따른 잎의 분화율을 조사하였다. BAP, IBA, GA_3 각각의 조합의 배지에 10점씩 치상하였으며 2반복하였다.

3) 저온처리에 의한 동아의 전개

동아가 형성된 직후인 10월에 동아를 채취하여 젖은 종이에 싸서 3 4℃의 저온저장고에 보관한 후 2주, 3주 및 4주간 저장한 후 저온처리가 개엽분화율에 미치는 영향을 조사하였다. 배지는 WPM 배지를 사용하여 대조구로서 생장조절물질을 첨가하지 않은 것을 사용하였으며, BAP 1.0㎎/ℓ를 첨가한 배지에서 동아가 분화하는 개엽율을 조사하였다.

2〕다경줄기 유도

1) 배지별 식물체의 생장비교

다경줄기 유도를 위한 적정배지를 선정하고자 5 종류의 배지(B_5, GD, 1/2MS, MS, WPM 배지)를 사용하여 식물의 생장량을 조사하였다. 모든 배지는 Sucrose를 전혀 첨가하지 않거나 또는 2%의 Sucrose를 첨가하였으며, 2 3개의 액아를 포함하고 있는 줄기의 중량을 측정한 후 치상하고, 배양 4주 후 생중량을 측정하였다. 각 처리별로 10개의 줄기를 치상하였으며, 3반복 하였다.

2) BAP 처리에 의한 다경줄기 유도

다경줄기 유도를 위하여 WPM 배지에 BAP를 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 및 5.0 ㎎/ℓ를 각각 처리하고 Sucrose 3%, pH 5.7로 조절하여 0.7% Agar를 첨가

하였다. 시험관에 10㎖를 분주하고 알루미늄 호일을 씌워 121℃, 1.5㎏/㎠로 멸균하였다. 배양 조건은 초대배양과 같았으며, 배양 4주 후에 새로 유도된 줄기의 수와 길이를 조사하였다. BAP 처리 후 가장 효과적이었던 농도를 선택한 후 줄기의 길이 신장을 위하여 GA_3를 농도별로 BAP와 혼용처리한 후 유도된 줄기의 수와 길이를 조사하였다. 각 실험은 5점씩 3반복 하였으며, 실험은 2반복하였다. 여러 가지 농도의 BAP를 실험한 결과 다경줄기 유도에 효과적으로 생각되는 농도와 GA_3를 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4,0, 5.0㎎/ℓ의 농도로 조합하여 다경줄기를 유도하였다. 유도된 줄기의 수와 길이를 측정하였으며, SAS system을 이용하여 ANOVA 분석을 실시하였다.

3) 액체배양을 이용한 기내대량증식

고체배지에서 자란 왕벚나무 줄기의 액체진탕배양법을 이용한 대량증식 가능성을 고찰하고자 하였다. WPM + BAP 0.04㎎/ℓ, GA_3 0.4㎎/ℓ의 배지에서 생장하고 있는 줄기를 정단분열조직을 포함한 부분 5mm와 액아를 포함한 절간부분으로 구분하여 BAP와 GA_3를 조합한 액체배지를 100㎖ 삼각플라스크에 20㎖씩 분주하여 각각 15개의 절편체를 치상하였다. 진탕배양기의 속도는 100rpm, 16시간 광주기, 25±2℃의 조건에서 배양하였다. 치상당시 생중량을 측정하였으며, 배양 1주마다 생중량과 발생한 줄기의 수를 측정하였다.

3〕캘러스 유도 및 기관분화

왕벚나무의 대량증식은 식물체의 여러 조직으로부터 부정아를 유도함으로써 이루어질 수도 있다. 잎과 줄기 뿌리 등 그 중 뿌리는 증식 중인 왕벚나무 식물체에서 쉽게 얻을 수 있었으며 기관분화를 유도할 수 있는 절편이었다. WPM + GA_3 0.4㎎/ℓ, BAP 0.04㎎/ℓ가 첨가된 배지에서 유도된 뿌리

를 절단하여 MS + 2,4-D 1.0, 2.0 및 3.0㎎/ℓ + BAP 0.1㎎/ℓ 배지에서 캘러스를 유도하였으며, 유도된 캘러스는 BAP, Zeatin 및 GA_3를 각각 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0㎎/ℓ를 첨가하거나 GA_3 0.4㎎/ℓ + BAP 0.04㎎/ℓ, GA_3 2.0㎎/ℓ + BAP 0.2㎎/ℓ 또는 GA_3 4.0㎎/ℓ + BAP 0.4㎎/ℓ을 첨가한 WPM배지에 치상하여 줄기를 유도하였다. 배지의 조성은 WPM기본배지조성과 같고, pH는 5.7, Gelrite를 0.2% 첨가하였으며, autoclave에서 20분간 멸균소독한 후 Clean bench에서 일회용 Petri-dish에 각각 20㎖를 분주하고, 5점의 캘러스를 치상하였으며, 5반복하였다.

4〕 발근유도

1) 배지선정시험

WPM + GA_3 4.0㎎/ℓ+BAP 0.4㎎/ℓ의 배지에서 자라고 있는 2cm 길이의 건전한 줄기를 이용하여 발근에 적합한 배지를 선택하고자 일반적으로 식물조직배양에 사용되고 있는 B_5, GD, 1/2MS, MS, WPM 각각의 배지에 Sucrose를 첨가하지 않은 상태에서 배지를 이루고 있는 무기물의 영양분이 식물의 생장에 미치는 영향을 배지별로 비교하였다. 대조구로서 증류수에 Agar만 첨가된 고체배지로 비교하였다. 식물의 생장은 치상당시 생중량을 측정하고, 배양 4주후에 생중량을 측정하여 그 차이를 생장량으로 간주하여 배지별로 비교하였다. 각 처리별로 10점씩 치상하였으며, 3반복하였다.

2) Sucrose 농도에 따른 줄기의 생장

배지의 무기영양분과 탄소원으로서 Sucrose가 식물의 생장 및 발근에 미치는 영향을 조사하였다. 다섯 가지 배지에서 가장 성적이 좋았던 MS 배지를 선택하여 Sucrose를 0, 1, 2, 3, 4, 5, 및 10%로 농도별로 처리하였다. 배지

실험과 마찬가지로 배양전, 후의 식물체 생중량을 측정하여 생장량으로 하였으며, 캘러스의 발생, 뿌리의 발생한 절편체 수를 조사하였다. 각 처리별로 10개의 줄기를 치상하였으며 3반복하였다.

3) 오옥신의 종류 및 농도에 따른 발근율의 차이

위에서 사용한 5 종류의 배지에 IBA와 NAA를 각각 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 ㎎/ℓ를 첨가하여 배양 4주 후 줄기의 발근율을 조사하였다. 줄기의 어느부분이든지 뿌리가 발생하거나 근원기가 형성되어 있는 것을 발근된 것으로 간주하였다. 각 처리별로 10개의 줄기를 치상하였으며 3반복하였다.

4) 식물체의 캘러스 유 무 및 배양토에 종류에 따른 기내발근

기내에서 증식된 왕벚나무 줄기 중 생장조절물질이 첨가되지 않은 배지에서 생장한 것을 이용하였다. 이들 줄기는 발근되지 않은 식물체와 발근된 식물체로 구분하였다. 이 중 뿌리가 형성되지 않은 줄기를 삽목시험에 사용하였으며, 발근된 식물체는 일반 온실조건에서 인공배양토에 이식하였다. 뿌리가 형성되지 않은 식물체 중에는 기부에 캘러스가 형성되어 있는 줄기와 그렇지 않은 식물로 구분하여 삽목하였다. 식물체 발근형태는 다음 그림과 같다(Figure 1).

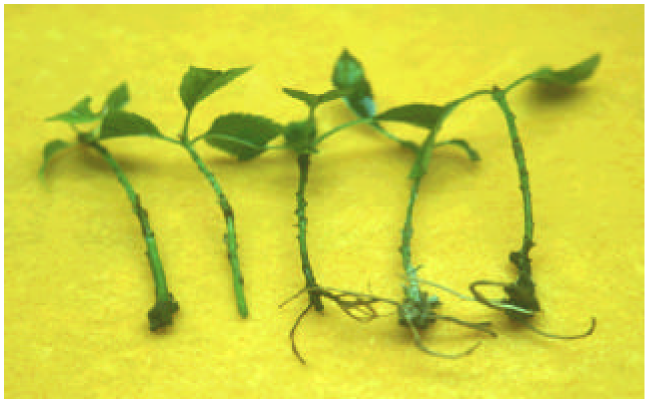

Figure 1. Types of shoots cultured *in vitro* (shoot with callus, shoot without callus, rooted shoot without callus, rooted shoot with callus and rooted shoot with callus from left to right).

Peatmoss, Vermiculite, Perlite, 모래, 송이토 등의 토양을 일정한 비율로 섞어 조제한 4가지의 배양토를 Sigma Co.의 배양용기에 5cm 높이로 넣고, Autoclave에서 한 시간동안 멸균소독하였다. 각 배양토에 배양된 줄기중 발근되지 않은 것을 기부에 캘러스가 있는 것과 그렇지 않은 것으로 구분하여 각각 10본씩 삽목한 후 기내배양과 같은 조건의 환경에서 자라도록 한 4주후에 발근율을 조사하였다. 배양토의 조성성분은 다음과 같다.

Table 1. The contents of soil used for *in vitro* root induction.

Soil	Contents(v/v)
A	Peatmoss : Vermiculite : Perlite = 1 : 1 : 1
B	A : sand = 1 : 1
C	A : scoria = 1 : 1

5) 기내배양토에서 발근처리된 식물의 이식 후 활착율

위의 조건과 같이 기내에서 각 배양토를 이용하여 발근처리한 후 발근된 식물체와 발근되지 않았지만 생존하고 있는 식물체를 3 종류의 배양토에 이식하여 온실에 두고 4주 후 활착율을 조사하였다.

2. 삽목 및 환경순화

1] 삽목 및 이식

1) 삽목시 활착에 미치는 배양토의 영향

식물재료는 Figure 1과 같이 줄기의 기부에 캘러스가 형성되어 있거나 또는 없는 것으로 구분하여 사용하였다. Table 1의 3 종류의 배양토를 40×60×20cm의 컨테이너에 10cm 깊이로 담아 충분히 관수하였다. 각 배양토의 보수력을 측정하기 위하여 관수한 후 1일부터 5일까지 매일 일정량의 토양을 채취하여 함수율을 구하였다.

함수율(%) = (생중량 - 건중량) / 건중량 × 100

각 배양토에 3cm 길이의 줄기를 심었으며 줄기 및 잎의 수분방지를 위해 컨테이너 위에 비닐을 덮어주고, 빛의 세기를 배양실과 같은 조건으로 3000 lux를 유지하도록 70%차광망으로 덮어주었다. 또한 삽목 시 두 가지의 발근촉진체를 분의법으로 줄기기부에 처리하여 4 주후 활착율을 조사하였다. 발근촉진제는 원예용으로 판매되고 있는 ROOTING POWDER(IBA 0.8% 함유)와 ROOTON(NAA 0.4% 함유)을 사용하였다.

2) 삽목 및 발근된 식물의 이식 후 계절에 따른 활착

기내에서 발근되지 않은 줄기와 발근유도배지(한천배지)에서 발근된 줄기를 선별하여 온실에서 Peatmoss : Vermiculite : Perlite = 1 : 1 : 1로 혼합한 배양토에 직접 삽목 및 이식하였다. 삽목 및 이식시기는 6월부터 9월까지 매월 실시하였으며, 이식 4주 후에 활착율을 조사하였다.

2] 활착된 조직배양묘의 생장

이식 및 삽목된 왕벚나무 조직배양묘는 겨울을 거친 후 일반토양으로 이식하였다. 이때 배양토에 따라 발생한 뿌리의 수와 길이를 조사 비교하였다. 이식된 배양묘를 50본을 선정하여 줄기의 길이(전년줄기, 당년줄기), 잎 수, 잎의 엽록소량 및 근원경을 4월부터 9월까지 매월 측정하여 배양묘의 생장을 조사하였다. 엽록소량은 SPAD 502(휴대용 엽록소 측정기, Minolta)로 측정하였다.

3. 환경순화에 따른 식물체의 특성변화

1] 기내배양에서 얻은 식물체의 DNA 변이

한라산에 자생하고 있는 왕벚나무 모수와 조직배양으로 생산된 묘의 잎의 이용하였다. 모수와 조직배양묘의 완전히 성숙되지 않은 어린 잎을 채취하였으며 CTAB법(Taylor and Powell, 1982)에 의하여 총 DNA를 추출하여 실험에 사용하였다. I-SSR PCR을 위해 캐나다 UBC(University of British Columbia)에서 개발한 primer set #9를 사용하였으며, 예비실험을 통하여 2개의 primer(822번 : TCT CTC TCT CTC TCT CA, 823번 : TCT CTC TCT CTC TCT CC)를 선발하였다. 반응액은 튜브당 반응액 20㎕를 기준으로 10× reaction buffer 2㎕, 0.25% BSA 2㎕, 25mM $MgCl_2$ 1.2㎕, 2mM dNTP 2

㎕, primer(40ng) 5㎕, Taq polymerase(5U/㎕)씩 사용하고, MJ Research사의 PTC-200 PCR 기계를 사용하였으며, 94℃에서 5분간 denaturation 시킨 후, 94℃에서 30초, 52℃에서 30초, 72℃에서 60를 40회 반복한 다음 72℃에서 10분간 유지시켰으며, 2% Agarose gel에 전기영동시킨 후 자외선을 통하여 Band를 확인하였다.

2] 식물체의 무기원소의 함량비교

기내에서 생장 증식된 줄기와 온실에서 순화되어 자라는 식물의 특성을 조사하기 위하여 증식배지에서 6주(6-0) 또는 12주(12-0)간 배양된 식물과 기내에서 6주간 배양 후 온실에서 4주간 순화된 식물(6-4)을 선정하였다. 이들 식물의 잎과 줄기의 생중량을 재고 105℃에서 30분간 건조시킨 후 80℃에서 중량변화가 없을 때까지 건조시켜 건중량을 측정하여 생중량에 대한 건중량의 비를 비교하였다. 각 부분의 무기원소의 함량을 측정하기 위하여 건조된 시료를 mixer mill(MM-2000, Retsch사)로 잎 전체를 분쇄하고 분쇄된 0.5㎎의 시료를 microwave digestion system(MLS-1200 Mega, Milstone)의 테프론 용기에 질산(HNO_3) 5㎖를 넣은 후 시료전처리장체에서 가온가압하여 분쇄하였다. 분해가 끝난 용기는 실험실에서 상온까지 식힌 후, No. 5C(Advantec)의 여과지로 100㎖의 volumetric flask에 여과하였다. 여과한 용액을 volumetric flask의 선까지 초순수로 채운다음, vortex(G-560, Scientific Industries)로 3분간 혼합하여 무기원소의 정량분석시료로 사용하였다. 무기원소의 정량분석은 ICP(ICPS-1000Ⅳ, Shimadzu)를 사용하였으며, 분석한 원소는 K^+, Ca^{2+}, Na^+, Mg^{2+} 및 Mn^{2+} 등 5가지 원소이다.

3] 각 단계별 식물체 잎의 해부학적 특성 및 수분 유지 능력

위와 같이 각 생육시기와 환경순화에 따른 잎 조직의 특성을 조사하기 위하여 휴대용 엽록소측정기(SPAD502, Minolta)를 이용하여 엽록소의 양을 측정하였다. 각 생장단계별로 10개의 잎을 측정하였으며, 실험은 3반복하였다. 또한 잎의 형태 해부학적인 특성을 구명하고자 각 생육 단계별로 세 개의 잎의 중앙부분을 절단하여 4℃에 2 4시간 동안 0.05M Soidium cacodylate buffer(pH 7.2)에 2% Paraformaldehyde와 2% glutaraldehyde를 혼합한 Karnovsky의 고정액에 1차고정을 한 후 0.05M soidium cacodylate buffer(pH 7.2)에 4℃에서 10분간 3번 헹군 다음 0.05M soidium cacodylate buffer(pH 7.2)에 1% Osmium tetroxide가 포함된 용액에 4℃에서 2시간 동안 고정시켰다. 상온에서 증류수로 2번 씻어준 후 4℃에서 0.5%의 urany acetate로 30시간 동안 염색한 후 상온에서 각각 30, 50, 70, 80, 90, 100%의 에틸알콜에서 Dehydration시키고, 상온에서 15분간 100% propylene oxide에 2번 Transition한다. Infiltration 과정은 Propylene oxide : Spurr's resin = 1:1에 2시간, 0:1에서 4시간 또는 하루 밤동안 침투시키고, 0:1에서 2시간 동안 두었다. 70℃에서 24시간 동안 중합반응을 시키고 Ultramicrotome(MT-X, RMC, USA)으로 10㎛로 잘랐다. 자른 시료는 광학현미경으로 단면에서 잎의 두께와 표피세포의 두께를 측정하였으며, 각 생장단계별로 5개의 잎을 측정하였다. 또한 기공의 특성을 조사하기 위하여 SEM 및 Confocal 현미경을 이용하여 350배로 확대한 일정면적 내의 기공의 수를 조사하고, 기공의 길이를 측정하였다. 각 생장 단계별 식물체와 순화 후 식물체의 잎을 각각 5개씩 채취하여 어두운 곳에서 물에 담가 포화시킨 후 23℃, 습도 74%의 상온상태에서 최초 생중량을 측정하고 5분, 10분, 15분, 20분, 30분, 45분, 60분, 120분, 150분, 180분까지 중량을 측정하였다.

Ⅳ. 結果 및 考察

1. 기내배양

1] 동아배양

1) 동아채취시기 및 배지내 무기물(NH_4NO_3)의 농도에 따른 동아의 전개

노령화된 왕벚나무에서 조직배양에 이용할 수 있는 시료로서 유시성을 유지하고 있는 부분을 선택하고자 생장점을 포함하고 있는 눈을 이용하는 것이 가장 효과적이라고 판단되었다. 많은 연구자들이 *Prunus*속 식물의 동아를 시료로 이용된 바가 있다(Boxus and Quoirin, 1974; Snir, 1982; Druart, 1985). 왕벚나무의 동아는 클론에 따라 그 크기가 다르며 꽃눈과 더불어 형성되어 겨울을 지나게 된다. 자연상태에서 동아는 개화후에 잎의 전개가 이루어지며 어린나무와는 달리 잎의 전개 후에 신초가 뚜렷이 발달하지 않는 것이 특징이다. 일반적으로 동아는 늦은 겨울에 채취하여 이용하게 된다. 또한 대부분의 *Prunus* spp.의 조직배양에는 MS 배지나 이를 변형하여 이용하여 왔으며, 이 중 가장 많이 변형된 예는 1/2MS로(Hammerschlag and Scorza, 1987) 배지 조성성분 중 농도변화가 가장 큰 것은 NH_4NO_3이다. MS 배지에는 1ℓ당 800㎎의 NH_4NO_3가 포함되어 있으며, 1/2MS에는 400㎎/ℓ가 첨가되어 있는데 이는 WPM 배지에 포함된 양과 같다. 이 NH_4NO_3는 기관형성에 중요한 역할을 하는 성분으로 조직배양의 배지에 대량원소로 존재하게 된다. 따라서 동아의 채취시기 및 NH_4NO_3의 농도를 달리하였을 때 동아로부터 잎의 전개 및 신초재생에 미치는 영향을 조사하였다(Table 2).

Table 2. Differences of bud opening rate of *P. yedoensis* depending on the concentrations of NH_4NO_3 and collection time[1].

Concentration of NH_4NO_3 [2] (㎎/ℓ)	Collection time					
	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.	Mean
400	30	30	30	40	60	38.0
800	30	30	40	40	50	38.0
1,200	40	40	40	50	70	48.0
Mean	33.3	33.3	36.7	43.3	60.0	

[1] Culture period was 3 weeks under 16h photoperiods.

[2] Other nutrients and vitamins were based on WPM medium.

결과적으로 평균에 약간의 차이는 있었지만 통계적으로는 유의성이 없는 것으로 나타나 무기물의 농도에 따라 분화율에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 생각되었다. 배양 초기에 기부에 붙어있는 소지는 검게 변색되었으며 배양기간이 길어져도 캘러스는 형성되지 않았다. 배양 5일 후부터 동아의 외부 인편이 떨어지고, 일주일 후에는 유엽이 발달되며 개엽되기 시작하였다. 모든 배지에서 유엽 중 2 3개가 우세하게 발달하였으며, 신초는 형성되지 않았다. 배양기간이 2주가 지나면서 형성된 잎은 엽병과 엽맥부분부터 노랗게 변색되면서 상태가 불량해지고 잎이 탈락되어 개엽 직후 새로운 또는 생장조절물질을 처리할 필요가 있는 것으로 보인다. 김 등(1993)은 왕벚나무의 동아를 배양하는데 WPM, MS 및 GD 배지에서 생장조절물질을 첨가하지 않아도 개엽율이 높았으나 개엽 이후의 생장상태는 BAP의 농도에 따라 차이가 있다고 하였다.

이상의 결과를 보면 왕벚나무의 동아는 생장조절물질이 첨가되지 않은 배지에서도 잎이 전개될 수 있지만 잎의 전개 후 잎과 줄기가 발달하기에 무기물만으로는 부족한 것으로 생각되었으며, 동아로부터 정상적인 잎과 줄기를 유도하기 위해서는 생장조절물질을 첨가하는 것이 효과적일 것이라 생각된다.

배지의 무기물 농도와는 관계없이 동아를 채취한 시기에 따라서 개엽율에 큰 차이가 나타났다. 10월에서부터 1월까지 차이가 크지 않았으나 2월에 채취한 동아의 개엽율이 현저히 높아지는 경향을 보였다. 이는 눈의 휴면이나 동아의 내적인 생리상태의 변화에 기인한 것으로 추측된다. Rinne 등(1994)은 white birch의 정아는 10월까지 휴면상태에 있다가 점차 휴면이 타파되어 개엽능력은 3월에서 4월에 가장 높아진다고 하였다. 이와 같이 휴면상태에 있었던 왕벚나무의 동아도 점차 휴면상태에서 벗어나 실제로 생장을 시작할 시기인 2월중에 분화율이 가장 높았던 것으로 생각된다.

Hammerschlag(1982)는 초기에 절편체를 얻을 때 눈에 충분한 저온처리가 있어야 한다고 하여 본 연구에서 2월에 채취한 동아에서 분화율이 높았던 것은 겨울동안 저온의 영향이 있었던 것으로 생각된다.

2) 생장조절물질의 종류 및 농도에 따른 동아의 전개

조직의 기관형성에 가장 크게 작용하는 물질은 생장조절물질이다. 무기물의 농도를 고정시키고, 생장조절물질 중 싸이토키닌과 오옥신 및 지베렐린의 농도를 달리하여 잎의 전개율에 미치는 영향을 조사한 결과 Figure 2, 3, 4와 같다.

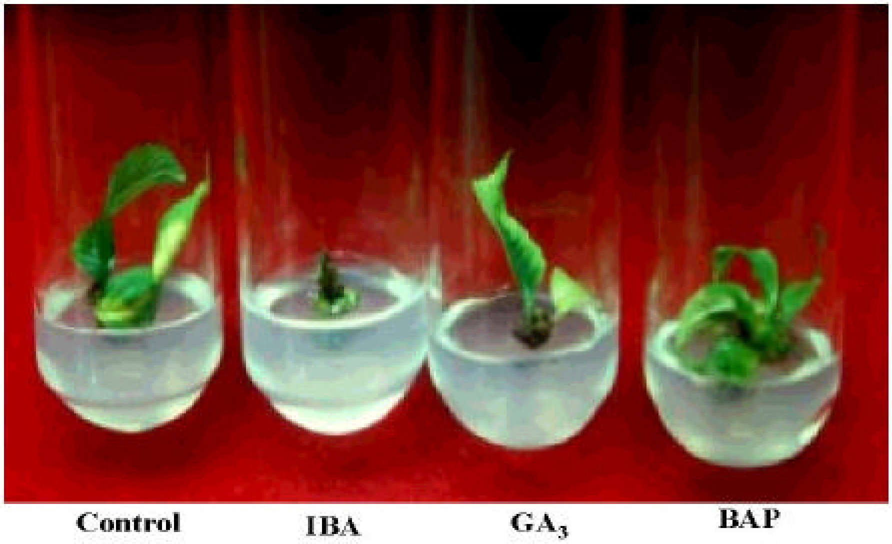

Figure 2. The response of winter buds on the different plant growth regulators.

BAP는 생장조절물질을 첨가하지 않은 배지와 비교할 때 10월에 채취한 동아의 개엽에 효과가 있는 것으로 나타났다. 특히 BAP 3.0㎎/ℓ가 첨가된 처리구에서는 10월중에도 60%로 높게 나타났다. 생장조절물질이 첨가되지 않은 배지와 마찬가지로 계절이 지날수록 개엽율은 높아졌으며, 2월에는 거의 모든 동아가 개엽하는 것으로 나타났다. 반면 GA_3의 처리구에서는 생장조절물질이 첨가되지 않은 배지와 비교할 때 개엽율에 있어 차이가 없는 것으로 나타났다. 두 생장조절물질은 개엽형태에 있어 차이가 있었는데 BAP가 첨가된 배지에서는 기부에 캘러스가 형성되었으며 잎의 크기는 작고 다량으로 발생하고, 신초는 거의 발달하지 않아 다발형의 식물체가 되었다. 다른 벚나무류의 정단부배양에서도 이와 유사한 결과를 보여 초대배양에서 줄기를 얻는데 어려움이 있다고 하였다(Boxus, 1971; Jones and Hopgood, 1979; Snir, 1982; Borkowska, 1983; Ivanicka and Pretova, 1986). GA_3가 첨가된 배지에서는

BAP가 첨가된 배지와 달리 배양 초 형성된 2 3개의 잎이 크게 발달하며 줄기가 형성되는 경우도 있었다. 반면 동아로부터 잎과 줄기를 유도하는데 있어 IBA는 매우 부정적인 영향를 미쳤다. IBA가 첨가된 배지에서는 아린이 갈변하며 소지와 동아의 접한 부분이 분리되는 현상을 보이며 잎이 분화되지 않았고, 기부에 커다란 캘러스가 형성되었다. 이 캘러스는 IBA의 농도가 높아질수록 커지는 경향이 있었다(Figure 2). 2월에 채취한 동아 중 IBA 1.0㎎/ℓ가 첨가된 배지에서 10% 개엽되었지만 잎의 크기도 매우 작고 생장상태가 매우 불량하였다. 酒谷(1989)는 벚나무(*P. serrulata* var. spontanea)와 몇몇 품종의 배양에서 MS 배지에 BAP 1.0㎎/ℓ이 첨가되었을 때 가장 효과적이었다고 보고하였으며, 김 등(1993)도 배지에 따라 차이는 있지만 WPM 배지에서는 BAP의 농도에 관계없이 개엽 및 생장 상태가 매우 양호하였고, Snir(1982)는 sweet cherry 초대배양시 BA 1.0㎎/ℓ를 첨가하였다고 하여 대부분 *Prunus*속 식물의 초대배양에 BAP는 양호한 반응을 보인 것으로 생각된다. 일반적으로 겨울동안 휴면에 들어간 눈에는 GA_3의 함량에 비해 상대적으로 ABA의 농도가 높아지게 된다. 또한 싸이토키닌의 농도가 낮은 상태에 있다. 따라서 휴면에 있는 눈으로부터 잎을 전개시키거나 줄기를 유도하기 위해서는 싸이토키닌과 지베렐린의 농도가 높아져야한다. 본 연구에서도 휴면에 있는 동아로부터 잎을 유도하는데 GA_3와 BAP와 같은 싸이토키닌을 외부에서 처리하므로써 휴면을 타파할 수 있었던 것으로 생각하며, 특히 GA_3보다는 BAP가 휴면타파와 함께 세포분열을 유기하여 잎이 전개되는데 더 효과적이었던 것으로 판단된다.

초대배양된 동아 중 2월에 채취한 동아는 생장에 있어 다른 계절에 채취한 동아와 큰 차이를 보였는데 GA_3가 첨가된 배지에서 모든 동아에서 줄기가 발생한 것이었다. 이는 BAP가 첨가된 배지에서 단지형태로 개엽하여 줄기가 형성되지 않은 것과 뚜렷한 차이를 보였다. Figure 5는 2월에 채취한 동아의 초

대배양 후 BAP와 GA_3가 첨가된 배지에서 개엽 후 동아의 생중량을 비교한 것이다. 분산분석결과 BAP 2.0㎎/ℓ와 3.0㎎/ℓ가 첨가된 배지에서의 동아의 생중량이 다른 처리보다 무거운 것으로 나타났는데 이는 캘러스에 의한 영향으로 보인다. GA_3가 첨가된 배지에서 형성된 줄기는 GA_3의 농도에 따라 길이에 차이가 있었다. GA_3 3.0㎎/ℓ에서 평균 10㎜로 가장 길게 나타났다. Bonga(1997)는 *Larix decidua*의 동아를 배양하여 줄기를 유도한 결과 채취시기에 따라 동아의 잎의 전개율이 달라졌으며, 특히 눈이 트기 직전에 채취한 동아로부터 많은 줄기를 얻을 수 있다고 하였으며, 다른 시기에 채취한 동아는 배양 초기에 배의 형태와 비슷한 구조를 보였다고 하여 본 연구와 유사한 결과를 보였다. Broquedis(1998)는 시기별로 동아 내에 존재하는 수용성 탄수화물과 Sucorse의 농도를 비교하였는데 온도가 낮아지는 10월부터는 Raffinose와 Sucrose의 축적이 일어나며, 싹이 트기 전에는 감소하여 겨울동안 내한성 역할을 하는 것으로 추측하였는데 이러한 동아 내의 여러 가지 물질들이 변화하므로 시기에 따라 동아로부터 잎이 전개되는 비율이 달라진 것으로 생각된다.

동아의 채취시기별 개엽율은 생장조절물질이 첨가되지 않았던 대조구와 비슷한 경향을 보였으나 BAP가 첨가된 배지에서 보다 높은 개엽율을 보여 BAP를 첨가하므로써 채취시기에 관계없이 개엽율을 높일 수 있었다. 생장이 정지된 후 약 4개월이 지난 후에 잎의 전개율이 높아진 것은 동아의 휴면과 관계된 것이라 생각되며, 그 시기의 눈의 휴면이 사라지는 시기로 추측된다. 그러므로 동아의 휴면을 타파하고 식물체를 재생시키기 위해서는 자연상태와 유사한 저온에 처리하거나 더 높은 수준의 호르몬 처리가 필요한 것으로 보인다.

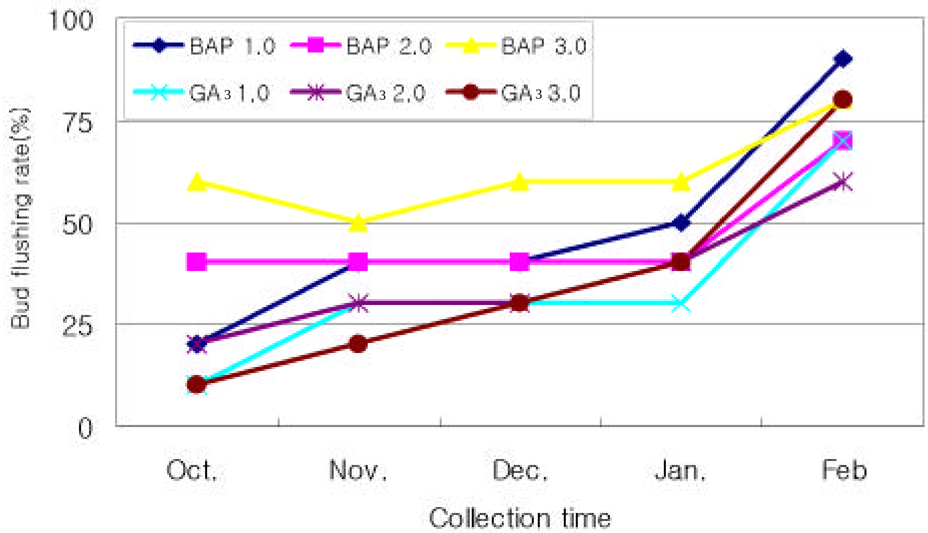

Figure 3. Differences of bud opening rate of *P. yedoensis* depending on the various plant growth regulators, concentrations and plating time. Culture period was 2 weeks under 16h/day photoperiods.

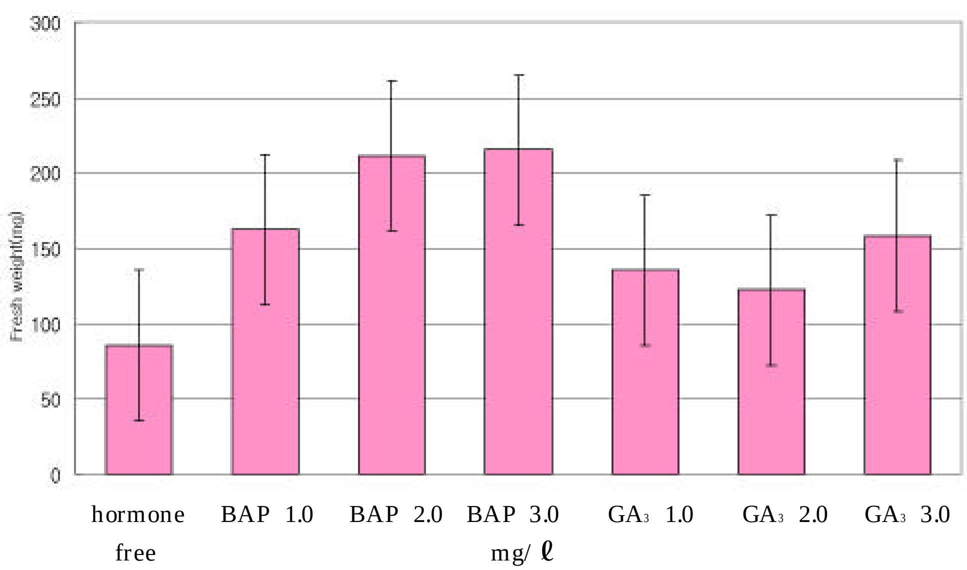

Figure 4. Fresh weight of the winter bud on the various concentrations of BAP or GA_3.

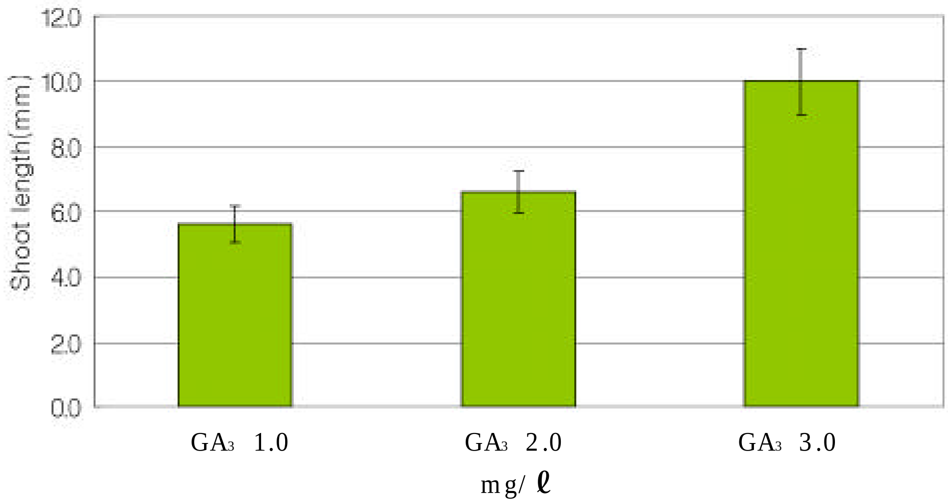

Figure 5. Shoots length induced from winter bud on the WPM media supplemented with GA_3.

왕벚나무의 동아를 초대배양할 때에 BAP**를 단독으로 처리하여 배양하였을 경우에는 줄기의 형성과 개엽에 있어 완전하지 못한 것이 단점이다. 동아에서 처음 형성된 줄기는 길이생장을 하지 못해** rosett**형의 식물이 되었다. 이는 배양기간동안 신장하지 못해 다경줄기를 유도하기에 부적합하였다.** 2**월에 배양한 동아에서** GA_3**는 줄기형성에 효과가 있는 것으로 나타나** BAP**첨가 배지에서 다발형으로 자란 식물로부터 줄기를 유도하기 위하여** BAP**와** GA_3**를 동시에 처리한 결과는 다음과 같았다**(Figure 6, Table 3).

Table 3. Shoot length and fresh weight of bud differentiated from winter buds on the media supplemented with BAP and GA_3.

PGR's Concentration (mg/ℓ)	Shoot length(Mean±SD) (cm)	Fresh weight (Mean±SD) (mg)
BAP 1.0 + GA_3 0.5	2.5 ±0.7b*	167.6 ±30.4b
BAP 1.0 + GA_3 1.0	2.8 ±1.3b	204.8 ±67.9a
BAP 1.0 + GA_3 2.0	5.0 ±2.2a	190.3 ±63.0a

* Means with the same letter are not significantly different at the α =0.05 following Duncan's multiple range test.

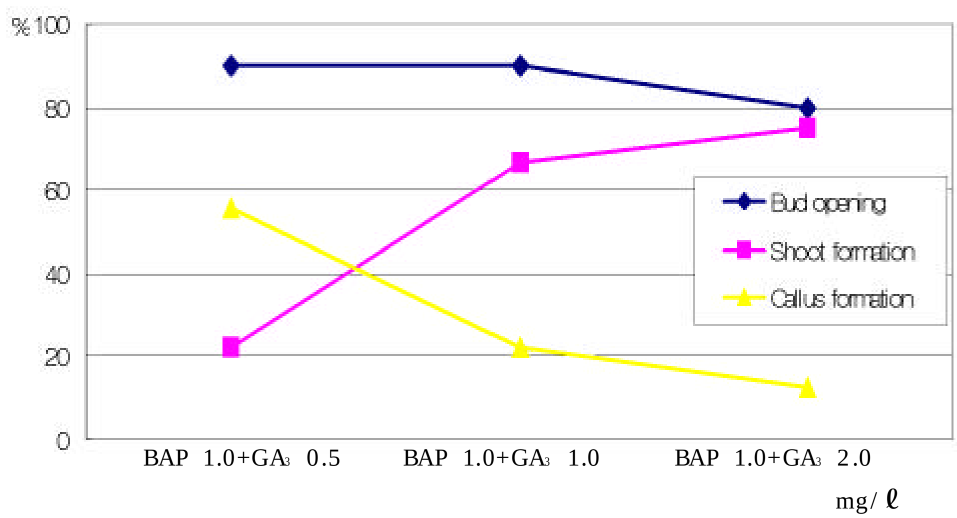

Figure 6. The rate of bud opening, shoot formation and callus formation of winter bud of *P. yedoensis* on the media supplemented with BAP and GA_3. Culture media was WPM, basal salts and vitamins, and culture period was 2 weeks.

BAP에 대한 GA_3의 농도가 높아짐에따라 개엽율과 캘러스 형성율은 다소 낮아졌으나 줄기 형성율은 현저히 높아지는 것으로 나타났다. 특히 캘러스의 형성율은 급격히 낮아졌다. 줄기의 길이에 있어서 GA_3의 농도가 BAP 농도보다 높을 때 가장 길게 자란 것으로 나타났다(Table 3). Jones and Hopgood (1979)는 *P. avium*의 동아배양시에 MS배지에 BA 1.0㎎/ℓ, IBA 0.1㎎/ℓ GA_3-NH_4를 0.1㎎/ℓ첨가하여 66%의 분화율을 얻었다고 하였는데 비록 GA_3의 농도가 낮지만 GA_3가 줄기 형성에 효과적인 것으로 추측할 수 있다.

3) 저온처리에 의한 동아의 전개

계절별로 채취하여 동아의 개엽율을 조사한 결과 겨울동안 저온에 노출되었던 왕벚나무의 동아에서 개엽율이 높게 나타났다. 따라서 동아가 형성되고 저온에 노출되지 않았던 시기인 10월에 동아를 채취하여 젖은 종이에 싸서 3 4℃의 저온저장고에 보관한 후 2주, 3주 및 4주간 저장한 후 저온처리가 개엽분화율에 미치는 영향을 조사한 결과는 Figure 7과 같다. 생장조절물질을 첨가하지 않은 대조구와 BAP를 1.0㎎/ℓ의 처리구 모두에서 저온처리를 하지 않은 동아의 개엽율이 높은 것으로 나타났다. 2주간 저온저장한 것은 대조구에서 29.1%, BAP 처리구에서 38.8%로 저온저장하지 않은 동아보다 개엽율이 약간 낮게 나타났다. 그러나 3주 및 4주간 저온저장했던 동아는 개엽율이 급격히 낮아지는 것을 볼 수 있었다. 저장기간에 관계없이 BAP를 처리한 배지에서 개엽율이 높게 나타났으나 4주간 저장한 동아는 BAP에 의한 효과가 나타나지 않았다. 그러나 Marino 등(1985)이 시료를 2 4℃에 저장하면 배양재료를 오래도록 공급할 수 있으며 기내반응도 양호하다고 한 것과 동아를 살균용액에 담군 후 2 4℃에 냉장보관하면 냉장기간이 길어질수록 분화율이 높아진다고 한 Druart(1992)의 결과와는 상이하게 나타났다. 이는 동아의 채취시기가

다르기 때문인 것으로 생각되는데 일반적으로 눈의 휴면은 저온에 의해 유도되는데 계절적으로 10월은 동아가 휴면에 들어가기 시작한 시점으로 짧은 기간의 저온저장이 오히려 눈의 휴면을 유도했을 가능성이 있다고 생각되며, 모수로부터 계속적으로 수분과 양분이 공급되었던 상태의 동아는 계절에 관계없이 개엽한 결과를 볼 때 전혀 양분공급이 되지않는 상태에서 동아를 저장하므로써 저장기간이 길어질수록 동아 자체의 활력이 감소되었기 때문이라고 생각된다. Bonga(1997)는 *Larix decidua*의 가지를 -5℃의 저온저장한 결과 3개월이 지난 후 동아가 전개하였으며, 자연상태에서 겨울을 지낸 동아와 비교할 때 줄기가 형성되지 않고, 배와 같은 형태를 보였다고 하였다. 이는 동아의 휴면 타파에 저온처리만으로는 효과적이지 못하다는 것으로 생각된다. 동아의 휴면을 타파하는데는 저온처리와 함께 장일조건이 만족되어야한다. 따라서 빛의 대체효과가 있는 BAP를 처리하하므로써 개엽율이 더 높아진 것으로 생각된다.

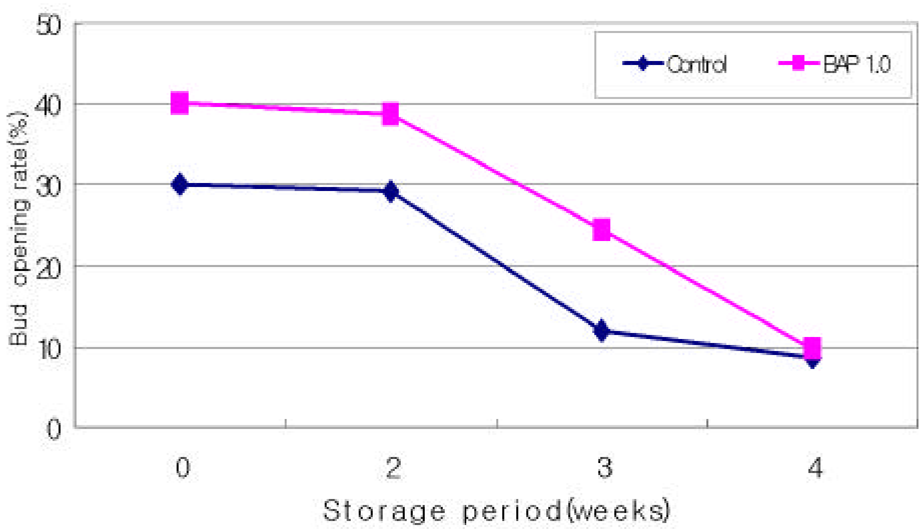

Figure 7. The change of bud opening rate depending on the cold storage period.

2] 다경줄기 유도

1) 배지별 식물체의 생장비교

기내배양에서 다경줄기를 유도함에 있어 배지의 성분은 중요한 역할을 한다. 그러므로 배양하고자 하는 식물에 적합한 배지를 선택하는 것이 중요하다. 다섯가지 배지에 Sucrose를 첨가하거나 첨가하지 않는 상태에서 식물체의 생중량을 조사하여 식물의 생장에 미치는 배지의 영향을 조사하였다.

Table 4. Growth of the plants on the five media with or without sucrose[1].

Media	Sucrose	
	0%	2%
Control	2.9±1.1c[2]	8.2±8.5c
B_5	7.5±3.2ab	44.8±34.6b
GD	6.9±3.3ab	48.4±30.4b
1/2 MS	7.1±5.0ab	51.3±30.0b
MS	9.0±4.8a	65.5±30.2a
WPM	5.2±2.6ab	42.8±25.8b

[1] Growth(g) = Fresh weight after 4 weeks - Fresh weight when the culture began.
[2] Means with the same letter are not significantly different at the α=0.05.

Sucrose는 에너지원으로서 배지의 삼투압에 지대한 영향을 미치는 요인으로 일반적으로 20 30g/ℓ를 첨가하게 된다(Pierik, 1987). 본 연구에서 Sucrose를 첨가하지 않은 배지와 2%의 Sucrose를 첨가한 배지에서 식물의 생장을 비교한 결과 현저한 차이를 보였으며, 배지별로 차이가 나타났다. 생장의 차이는 Sucrose가 첨가된 배지에서는 뿌리가 형성되었으며, 기부에 캘러스가 형성되었고, 그렇지 않은 식물체들도 잎의 크기가 증가하여 생중량이 증가한 것으로 보

인다. 배지중에서는 MS 배지에서 생중량이 가장 무거운 것으로 나타났으나 식물의 잎의 색과 생장에 있어 배지간의 차이는 크게 나타나지 않았다. 한편 Sucrose가 첨가된 배지와 그렇지 않은 배지간에 생중량 및 생장의 차이는 현저하였다. Tricoli 등(1985)은 *P. serotina*를 배양하여 다경줄기를 얻고자 Sucrose를 농도별로 처리한 결과 3%에서 가장 좋은 결과를 얻었으며, Sucrose의 농도가 낮아질수록 줄기발생이 저조하였다고 하였다. 왕벚나무의 경우 여러 가지 배지에따라 줄기의 생중량에 다소 차이가 있었으나 그보다 Sucrose의 존재에 더 큰 영향을 받은 것으로 생각된다.

2) 싸이토키닌 및 지베레린 처리에 의한 다경줄기 유도

식물의 다경줄기를 유도하는데 있어 배지의 성분과 함께 싸이토키닌의 역할은 지대하다. 일반적으로 *Prunus* spp.의 기내배양에서 고농도의 싸이토키닌과 저농도의 오옥신을 첨가하면 줄기를 비교적 쉽게 얻을 수 있다고 하였다. 싸이토키닌 중에는 BA가 지배적으로 사용되었으며, 오옥신은 IBA가 일반적으로 사용되었다(Reeves *et al.*, 1983; Jona and Vigliocco, 1985; Almehde and Parfitt, 1986; Hammerschlag *et al.*, 1987). 왕벚나무의 경우 동아로부터 새로운 줄기가 분화되기 위해서는 싸이토키닌과 더불어 GA_3의 영향이 있었다. Reeves 등(1987)도 고농도의 BA는 줄기신장을 방해하는 경향이 있어 줄기신장을 위해서는 BA의 농도를 줄이고 GA_3를 첨가하였다고 하였다. 따라서 생장한 줄기로부터 다경줄기를 유도하기 위해 BAP와 GA_3를 각각 농도별로 처리하여 다경줄기유도에 미치는 영향을 조사한 결과 Table 5와 같았다. BAP는 농도에 관계없이 저농도에서도 줄기를 생산하는 것으로 나타났으나 GA_3는 새로운 줄기를 유도하는데 효과가 없는 것으로 나타났다. 반면 GA_3는 25 30%가 뿌리가 발생하는 현상이 관찰되었다.

Table 5. The differentiation from the explants derived from winter bud of *P. yedoensis* on medium supplemented with various concentrations of BAP or GA_3[1].

PGRs[2] (㎎/ℓ)	No. of explants cultured	No. of explants inducing shoots	Shoot induction rate (%)	No. of rooted explants	rooting rate (%)
BAP 0.5	20	20	100	0	0
BAP 1.0	20	20	100	0	0
BAP 2.0	20	19	95	0	0
BAP 3.0	20	20	100	0	0
BAP 5.0	20	19	95	0	0
GA_3 0.5	20	0	0	5	25
GA_3 1.0	20	0	0	6	30
GA_3 2.0	20	0	0	5	25
GA_3 3.0	20	0	0	6	30
GA_3 5.0	20	0	0	6	30

[1] Culture medium was based on WPM basal salts and vitamins and culture period was 4 weeks under 16h/day photoperiods.

[2] Plant Growth Regulators.

따라서 다경줄기 유도에 가장 효과적인 BAP의 농도를 구명하고자 BAP를 다섯 가지 농도로 처리하여 생산된 줄기의 수와 길이를 측정하였다(Table 6).

BAP를 처리한 결과 생산된 줄기의 수는 BAP의 농도가 증가할수록 많아졌으며, 반면 줄기의 길이는 0.5㎎/ℓ의 저농도에서는 평균 12mm였으나 3.0㎎/ℓ이상 첨가되었을 때 발생한 새로운 줄기는 길이생장을 하지 못하고 부정아의 형태로 남아 더 이상 자라지 못하였다. 5.0㎎/ℓ이상의 농도에서 발생한 줄기는 배지 속으로 들어간 부분에서 많이 발생하였으며, 그중 일부는 유리화된 잎이 비정상적으로 길게 생장하는 것을 볼 수 있었다. Tricoli(1982)와 Tricoli 등(1985)은 *Prunus serotina*의 동아를 이용한 다경줄기 유도시 BAP의 농도가

1.0㎎/ℓ이상이 되면 줄기는 많이 발생하지만 줄기의 길이 생장이 저해된다고 하여 본 연구결과와 유사하였다. 또 Druart(1988)는 싸이토키닌의 농도를 높게 하여 많은 액아를 얻었지만 유리화현상이 일어났다고 하여 고농도의 싸이토키닌이 줄기발생에는 효과적이지만 적합하지 못하였다. 따라서 많은 줄기를 생산하는 동시에 길이를 생장시키기 위해서는 다른 처리가 필요하다고 생각된다.

Table 6. Number and growth of shoots regenerated on the WPM medium supplemented with BAP for 4 weeks [1].

BAP (㎎/ℓ)	No. of shoots induced (Mean±SD) [2]	Shoot length (Mean±SD) (mm)	Fresh weight of explants (mg) (Mean±SD)
0.5	3.5±2.4a	12.0±6.0a	414.3±201.6ab
1.0	6.3±3.3ab	7.2±1.6b	640.0±294.5a
2.0	7.3±1.9ab	6.7±0.5b	586.0±347.2ab
3.0	9.0±0.8b	< 5㎜	325.0± 76.0ab
5.0	9.5±3.3b	< 5㎜	223.3± 40.4b

[1] Growth(g) = Fresh weight after 4 weeks - Fresh weight when culture began.

[3] Means with the same letter are not significantly different at α=0.05.

초대배양시 GA_3는 줄기의 길이생장에 효과가 있는 것으로 나타났으므로 BAP와 혼용처리하므로써 새로운 줄기를 유도하고 줄기의 길이를 신장시킬 수 있었다. BAP와 GA_3를 농도별로 혼용처리에 따른 원래 줄기의 길이, 새로 형성된 줄기의 수, 줄기의 길이를 측정한 결과 Table 7, 8와 같았다.

10㎜ 길이의 줄기를 각 배지에 치상하여 다경줄기를 유도하였는데 새로운

줄기를 생산한 각각의 줄기의 길이는 평균 13.8 17.5㎜로 다소 차이가 있었으나 Duncan's multiple range test 결과 유의성이 없는 것으로 나타났다. 치상된 줄기와 새로 생산된 줄기는 형태적으로 다르게 나타났는데 원래 치상된 줄기는 줄기가 경화되었으며, 잎의 크기가 커지고 색도 새로 형성된 줄기의 것보다 짙은 녹색을 띠고 있었다. 어떤 것은 줄기의 정단부가 약간 갈변하면서 새로운 잎이 형성되지 않는 현상을 보였다.

Table 7. The shoot length(㎜) cultured on media supplemented with various concentrations of GA_3 and BAP after 4 weeks.

GA_3 (㎎/ℓ)	BAP(㎎/ℓ)		
	0.5	1.0	3.0
1.0	15.9±2.9	16.0±3.2	15.0±2.5
2.0	16.8±4.3	16.1±2.4	14.8±1.9
4.0	17.5±4.1	17.4±3.8	13.8±2.6

BAP와 GA_3를 혼용한 결과 새로운 줄기를 형성한 원래의 줄기의 생장에는 큰 차이가 없었으나 새로 형성된 부정아 및 줄기의 수는 BAP의 농도보다는 GA_3의 농도에 따라 차이가 나타났다. 4.0㎎/ℓ의 GA_3가 첨가된 배지에서는 BAP의 농도와 관계없이 많은 줄기가 형성되었다. 이는 GA_3를 첨가하지 않고 BAP만 첨가한 때와 비교할 때 줄기 형성수가 많은 것으로 나타났는데 이는 줄기의 길이 생장을 위하여 처리하였던 GA_3가 BAP와 혼용처리되면서 상승효과를 나타낸 것으로 생각된다. 새로 형성된 줄기의 길이생장은 BAP 단독 처리구보다 길게 나타났으며, 그 중 4.0㎎/ℓ의 GA_3가 첨가된 배지에서 가장 긴 것으로 나타나 GA_3가 줄기의 길이생장에 효과가 있는 것으로 나타났다. 이는 *Prunus*속의 다른 종을 배양하여 다경줄기를 유도할 때 GA_3가 포함되었을 때

양호하였다는 연구결과와 일치하였다(Snir, 1982). 그러나 BAP 3.0㎎/ℓ와 함께 첨가한 처리구에서는 줄기의 길이생장이 불량한 것으로 나타나 BAP와 GA_3의 두 생장조절물질의 농도비에서 BAP가 더 높을 경우 GA_3보다는 BAP의 효과가 더 강하게 나타나는 것으로 생각되었다.

Table 8. The number and length of shoots induced on the media supplemented with various concentrations of GA_3 and BAP after 4 weeks.

BAP (㎎/ℓ)	GA_3 (㎎/ℓ)	Number of shoots induced (Mean±SD)	Length of induced shoots (Mean±SD, mm)
0.5	1.0	8.8±0.9bc	13.7±2.2b
	2.0	8.2±1.7c	15.2±3.6ab
	4.0	11.7±2.1a	17.1±1.9a
1.0	1.0	8.0±2.0c	13.6±2.5b
	2.0	7.8±1.3c	13.6±2.1b
	4.0	12.4±3.7a	15.1±2.5ab
3.0	1.0	7.9±1.7c	8.9±0.9c
	2.0	9.9±3.3ab	8.7±0.9c
	4.0	11.6±3.6a	9.2±1.7c

왕벚나무의 줄기에서 다경줄기를 유도할 때 새로운 줄기의 형성은 여러 가지 형태로 나타났다. 기부로부터 부정줄기가 형성되는 경우와 액아에서 줄기가 형성되는 것과 새롭게 형성된 줄기의 액아에서 다시 줄기가 형성되는 경우였다(Figure 8). 이는 배양기간에 따라 그 차이가 현저하게 나타났다(Table 9). 4주 배양동안 생산된 평균 줄기의 수는 15.4개로서 다른 *Prunus* spp.에서의 3주 배양시 BAP의 농도에 따라 다르게 나타났지만 4 10개와 비교할 때 비교

적 많이 생산되었으나 BAP의 농도가 높아지면서 정단부에 괴저가 생겼다고 하여(Almehdi and Parfitt, 1986) 보다 건강한 줄기를 얻기 위해서는 BAP의 농도를 조절할 필요가 있는 것으로 생각된다.

왕벚나무의 경우 배양기간이 길어질수록 형성되는 줄기의 수는 많아지고, 길이는 길어졌다. 배양 8주후에는 1차 2차 줄기의 형성이 활발하였으며, 줄기의 길이생장도 양호하였다. 그러나 배양 12주가 되었을 때는 짧은 길이의 줄기는 갈변 고사하고 정단부가 노랗게 변하면서 고사하는 현상이 나타났다. 배양된 줄기는 다경줄기유도 조건의 배지에서의 수명은 대략 12주 내외로 추정되며, 4주 이상 8주 이내의 기간동안 생장이 가장 활발한 것으로 생각된다. 다경줄기 유도시 처음으로 치상하였던 줄기는 배양기간이 길어질수록 줄기와 잎의 색이 짙어지고, 줄기가 경화되며, 정단부가 갈색으로 변하며 고사하는 형태적인 변화가 나타나 BA의 농도뿐만 아니라 배양기간에 따라서도 정단괴저 현상이 일어났다(Figure 8). 또 Reeves(1983)는 *Prunus persica*를 배양할 때 배양기간 및 배지의 pH에 따라 고사율에 차이가 있는데 pH 5.8의 경우 배양 1개월 후 8.3%, 배양 2개월 후 62.5%가 고사하였다고 하여 배지의 pH에 의해서도 정단괴저현상이 나타나는 것으로 생각된다. 왕벚나무의 경우 배양 2개월에 고사현상은 약간 나타났지만 생장이 매우 활발하였으며, 심한 고사현상은 나타나지 않아 *Prunus persica*와 비교할 때 생장속도가 느리거나 또는 기내에서 생장하기 위한 배양조건이 적합하였다고 생각된다.

Table 9. The number and the length of shoots induced from the shoots originated from winter buds depending on the culture periods.

Culture Periods	Shoot regeneration	Number of shoots (Mean±SD)	Shoot length (Mean±SD,㎜)
4 weeks	First	8.7±3.2	12.7±5.5
	Second	6.5±6.5	length≤5
	Total	15.4±8.4	12.7±5.5
8 weeks	First	14.2±9.2	21.4±8.9
	Second	25.4±14.3	14.2±6.9
	Total	39.5±22.5	18.3±8.9
12 weeks	First	14.7±3.9	18.1±9.4
	Second	9.1±8.6	10.7±4.8
	Total	23.8±9.0	16.9±9.1

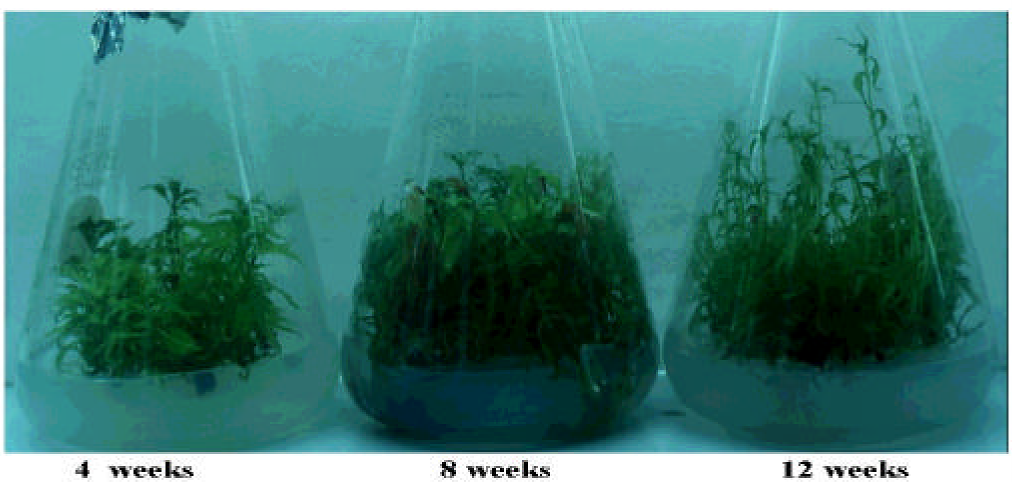

Figure 8. Comparison of the shoot growth depending on the culture periods.

3) 액체배양을 이용한 기내대량증식

식물의 액체배양은 고등식물의 세포를 단세포화하거나 급속하게 증식되는 유리세포를 획득하기 위함이며, 주로 약리적으로 중요한 식물의 이차대사산물을 획득하기 위해 이용되었으며, 세포배양에 의한 각종 저항성 세포주 선발시 선발압(selection pressure)을 가하는 방법으로 이용되어 왔다(김 등, 1992). 보통 캘러스등의 미분화된 세포를 이용하였지만 고체배지와 달리 액체배지에서의 배양은 배지의 영양분이 식물조직에 직접 닿아 양분 흡수가 용이하므로 생장속도를 가속화시킬 수 있다는 장점이 있다. 한편 생물반응기를 이용한 대량증식 시스템으로 체세포배, 식물체 생산의 수단으로 이용하고자 할 때 액체배지를 이용하며, 이를 실용화하기 위해서는 식물의 반응을 조사할 필요가 있다.

① 정단배양

고체배지에서 자란 식물체의 정단부를 다경줄기 유도시 사용하였던 조합에 기초하여 12가지 조합의 액체배지에 진탕배양하였다. 배양 0주, 1주, 2주동안 매주 생중량의 변화를 조사하여 생장을 측정하였다(Table 10).
정단부의 초대배양시 생중량을 1로 하였을 때 1주후와 2주후의 생중량을 측정하여 비율로 나타내었다. 액체배지 속에 자라던 정단부는 배양 2 3일후부터 반응을 시작하여 생장속도가 매우 빨랐으며, 2주되었을때는 배양기내에서 포화상태를 이루었다. 배양 1주에서 2주사이에 배양속도는 매우 높아 배양초기에 비하여 최소 41.4배에서 최대 118배까지 생중량이 증가하였다. 배양 1주에는 BAP 농도에 큰 영향을 받지 않아 모든 배지에서 생중량의 증가율이 비슷하였으나 배양 2주때에는 BAP 0.8㎎/ℓ 첨가된 조합에서 생장비율이 가장 높은 것으로 나타났다. 이는 줄기의 길이생장과 함께 눈으로부터 새로운 줄기가 형성되었기 때문이었다. Hammerschlag(1982)는 *Prunus persica*의 정단배양시

Agar배지보다 액체배지에서 생장이 양호하였다고 하여 액체배지를 이용한 배양방법이 더 많은 양의 식물체를 생산하기 위한 방법으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

Table 10. The relative growth of shoot tip cultures in liquid media[1].

Media	Culture periods (weeks)		
	0	1	2
GA_3 1.0 + BAP 0.1	1	21.8*	71.0*
GA_3 2.0 + BAP 0.1	1	29.1	104.0
GA_3 3.0 + BAP 0.1	1	27.5	88.9
GA_3 4.0 + BAP 0.1	1	21.9	108.9
GA_3 1.0 + BAP 0.4	1	10.9	58.4
GA_3 2.0 + BAP 0.4	1	12.5	68.8
GA_3 3.0 + BAP 0.4	1	16.1	83.3
GA_3 4.0 + BAP 0.4	1	19.7	113.1
GA_3 1.0 + BAP 0.8	1	20.1	117.2
GA_3 2.0 + BAP 0.8	1	9.3	41.4
GA_3 3.0 + BAP 0.8	1	19.1	111.3
GA_3 4.0 + BAP 0.8	1	23.2	118.0

[1] Fresh weight after suspension culture/fresh weight of before suspension culture.

② 줄기배양

정단부 배양과 같은 조건으로 액아를 하나씩 포함하고 있는 절간을 이용하여 배양한 후 생장을 조사하였다. 절간의 액체배양시 생중량의 증가는 정단부의 생중량 증가와 비교할 때 매우 낮은 것으로 나타났다. 생중량 증가의 시기는 2 3주 사이에 급격히 증가하는 경향이었다. 배지에 따른 생중량의 차이

는 크지 않았으나 BAP 0.8㎎/ℓ가 첨가된 배지에서 생장이 가장 양호하였다. 치상한 절편체는 1주째부터 액아에서 줄기가 형성되기 시작하여 배양 4주째는 대부분의 절편체에서 줄기가 형성되었다.

특히 배양 1주에서 2주사이에 줄기형성율이 급격히 증가하였다(Figure 9). 줄기의 생중량의 변화도 줄기 형성율과 같은 경향을 보여 배지에 따른 차이가 크게 나타나지 않았다(Figure 10). 이는 고체배지에서 다경줄기를 유도할 때와는 다른 경향으로 배지에 포함된 생장조절물질를 흡수하는데 고체배지보다는 액체배지가 더욱 효과적인 것으로 생각된다. 그러나 절간을 재료로 한 액체 현탁배양에서도 배양기간이 길어질수록 유리화 현상이 나타났다. Reeves 등(1983)은 Agar 배지와 액체배지에서의 배양한 지 1개월 후 줄기의 고사율이 Agar 배지에서 4.5%, 액체배지에서 20%로 매우 높게 나타났다고 하여 액체배지의 단점을 보고하였다. 그러므로 양호한 상태의 줄기를 얻기 위해서는 배양기간을 조절할 필요가 있다.

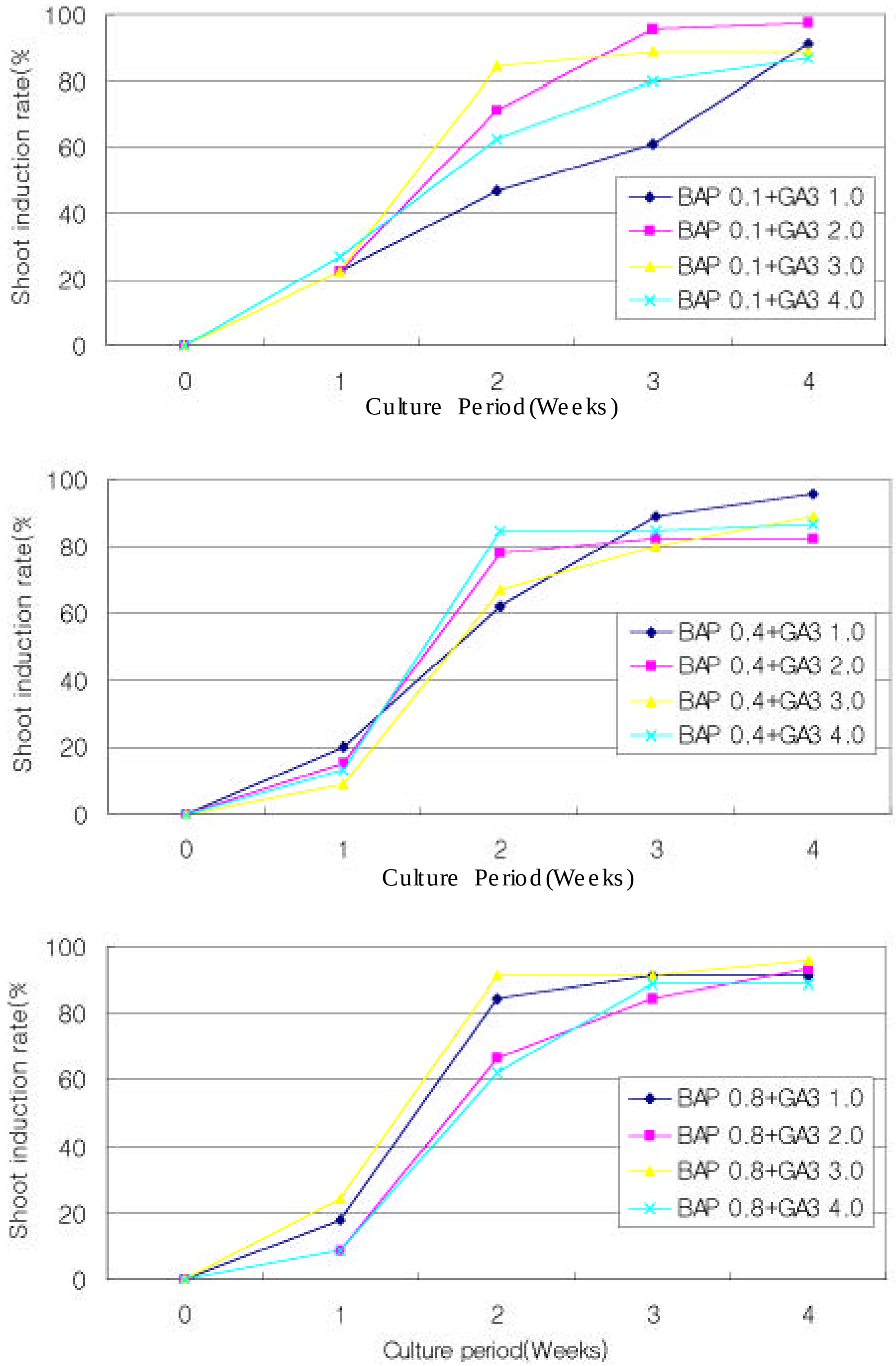

Figure 9. Shoot induction rate on the liquid media depending on the culture periods.

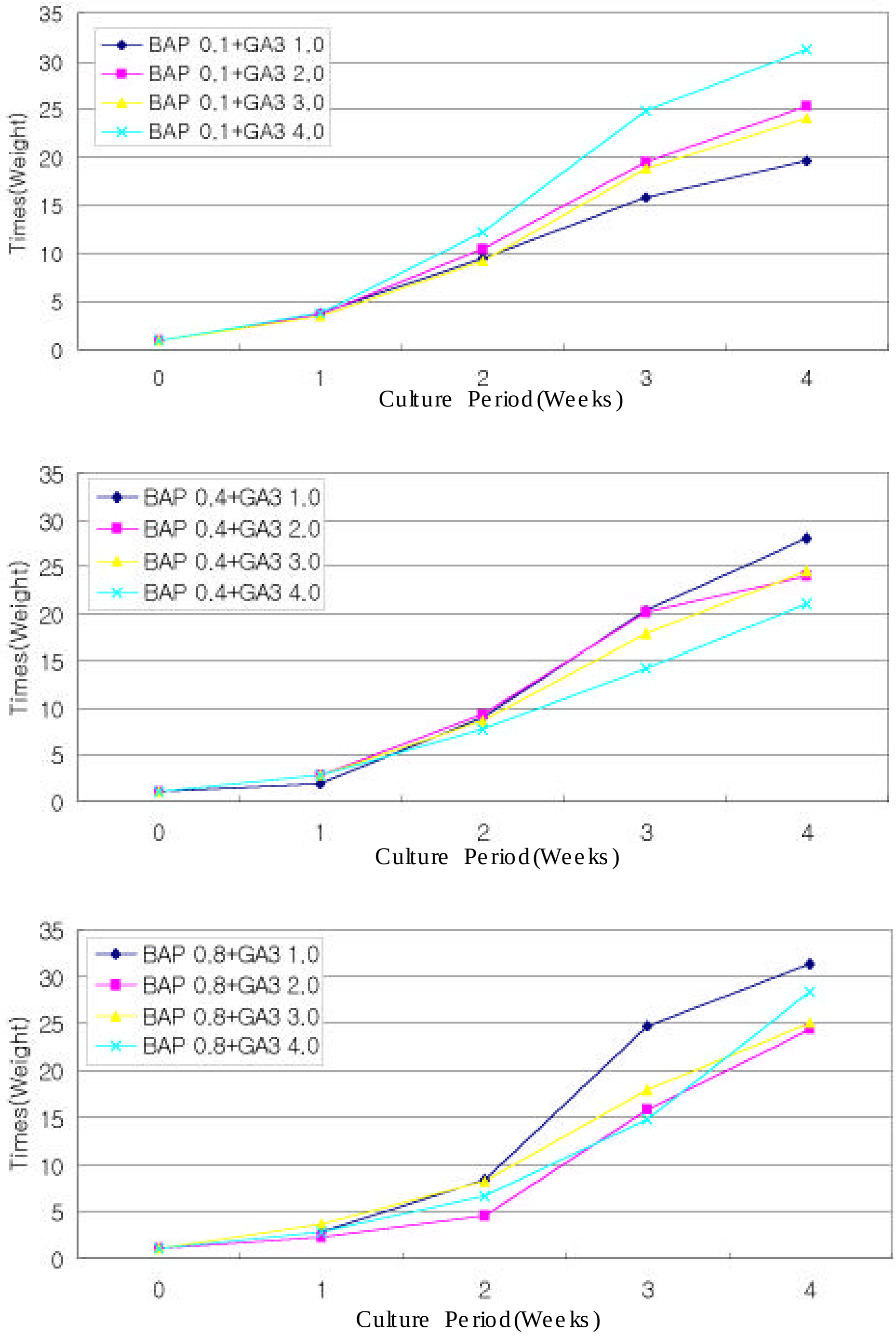

Figure 10. The relative growth of cultured shoot in liquid media.

* Fresh weight after suspension culture(g)/fresh weight of before suspension culture(g)

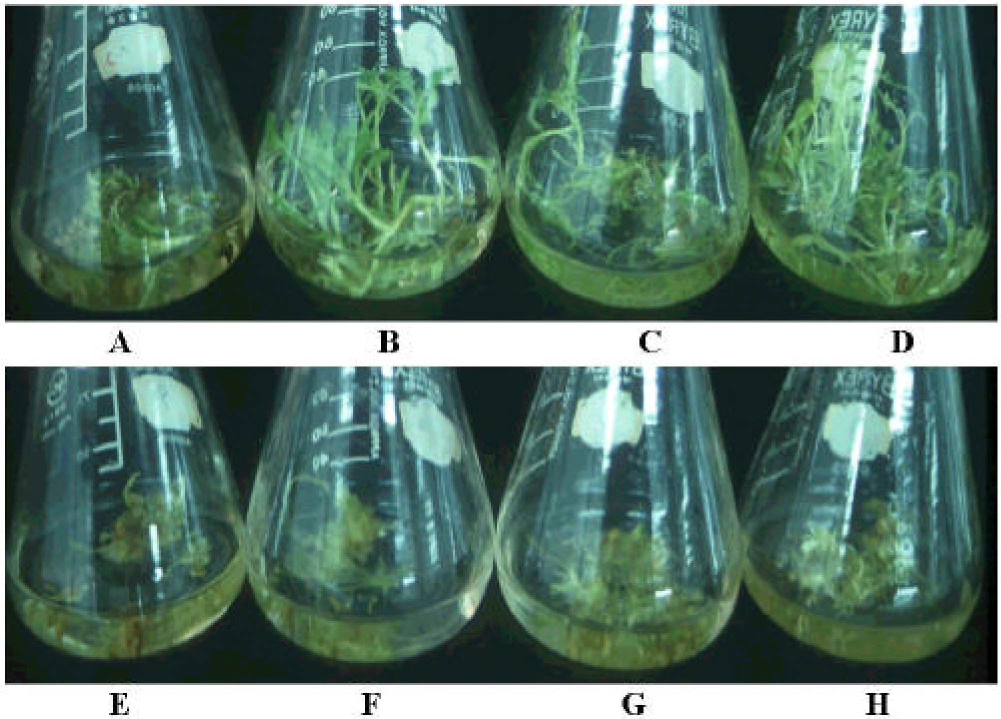

Figure 11. Shoot growth on liquid media with different treatments of BAP and GA_3.

A : BAP 0.1 + GA_3 1.0, B : BAP 0.1 + GA_3 2.0, C : BAP 0.1 + GA_3 3.0, D : BAP 0.1 + GA_3 4.0 E : BAP 0.8 + GA_3 1.0, F : BAP 0.8 + GA_3 2.0, G : BAP 0.8 + GA_3 3.0, H : BAP 0.8 + GA_3 4.0

3] 캘러스 유도 및 기관분화

캘러스를 통한 식물체의 재생은 체세포 잡종이나 특정형질을 가진 변이체를 육성하는데 이용되며(Chalupa, 1987; Ostry and Skilling, 1988), 임목육종계획에 세포수준에서 유전적 조작을 위한 방법을 적용하는데 필수적인 단계이다(Park and Son, 1988). 뿌리는 분열이 왕성한 부분으로 캘러스를 유도하기 위한 조직으로 이용되어 왔다(Son and Hall, 1990).

1) 캘러스의 유도

배양당시 모든 조직을 생중량 6㎎으로 일정하게 치상하였으며, 배양 5주 후에 캘러스 형성율, 뿌리 유도율, 생중량을 조사한 결과는 다음과 같다(Table 12). 치상한 절편체의 표피가 붉은 빛을 띠기 시작하였으며, 캘러스 세포가 커지면서 표면은 붉은색의 반점들이 생기며, 그 아래부분은 아이보리색의 캘러스가 형성되었다. 배지의 조합에 따라 캘러스의 생중량과 형성율 및 뿌리 형성율에 차이가 나타났다. NAA와 2,4-D 모두 농도에 관계없이 캘러스의 형성율은 높았으나 두 가지 생장조절물질에 대한 캘러스 형성형태는 다르게 나타났으며, 단독처리한 것과 Kinetin을 첨가한 배지에서도 캘러스의 형태는 매우 다르게 나타났다. NAA와 2,4-D 모두 단독으로 고농도로 처리되었을 때 캘러스의 형성율보다는 뿌리의 형성율이 높았으며, Kinetin과 BAP가 함께 첨가되었을 때 뿌리 발생을 억제할 수 있었으나 NAA 3.0㎎/ℓ의 고농도에서는 뿌리 발생율이 여전히 높았다. 캘러스의 생중량을 비교해보면 NAA 3.0㎎/ℓ가 단독 또는 Kinetin과 혼용처리된 두가지 경우 모두 가장 높은 것으로 나타났으며, 2,4-D의 경우 1.0㎎/ℓ가 첨가된 처리구에서도 생중량이 높게 나타났다. 이는 두 캘러스의 형태가 다르기 때문인데 NAA는 작은 알갱이와 같은 세포덩어리가 모이듯이 생겼으며, 2,4-D가 첨가된 배지에서는 다량의 수분이 포함되어 크림과 같은 형태였으며, 세포의 크기도 매우 작게 형성되었다. 두 가지 생장조절물질을 비교할 때 2,4-D보다는 NAA가 첨가된 배지에서 생장이 양호한 캘러스를 얻을 수 있었다. 왕벚나무의 경우 뿌리로부터 캘러스를 유도한 연구는 없으나 미숙배로부터 캘러스를 유도하는데 2,4-D와 BAP 또는 NAA와 BAP의 조합에서 배발생캘러스가 유도되었으며, GA_3와 BAP를 첨가하므로써 더 많은 배발생 캘러스를 유도할 수 있었다(Koh *et al.*, 1997, 1998). 본 연구와는 다른 재료였으나 캘러스를 유도하는데 2,4-D 또는 NAA와 BAP와 같

은 싸이토키닌을 저농도로 처리가 효과적인 것으로 생각된다.

Table 11. Callus formation rate, fresh weight of callus and root formation rate on the different combination of NAA and kinetin on MS medium[1].

PGR[2] Concentration (mg/ℓ)	Callus formation rate (%)	Fresh weight (mg)	Root formation rate (%)
NAA 1.0	70.0	24.6±2.5	10.6
NAA 2.0	93.3	54.9±2.2	36.7
NAA 3.0	90.0	85.9±11.6	83.3
NAA 1.0 + Kinetin 0.1	73.3	43.4±10.8	0.0
NAA 2.0 + Kinetin 0.1	96.7	50.1±1.9	6.7
NAA 3.0 + Kinetin 0.1	96.7	96.1±26.1	70.0
2,4-D 1.0	60	69.8±25.4	60
2,4-D 2.0	70	80.4±17.9	70
2,4-D 3.0	90	110.0±24.6	100
2,4-D 1.0 + BAP 0.1	100	85.2±35.2	10
2,4-D 2.0 + BAP 0.1	100	130.4±81.4	20
2,4-D 3.0 + BAP 0.1	100	161.2±72.2	40

[1] Culture period was 5 weeks under 16 h photoperiods.

[2] Plant Growth Regulators.

2) 캘러스의 증식

NAA 3.0mg/ℓ과 Kinetin 0.1mg/ℓ가 첨가된 배지에서 유도된 캘러스를 대량으로 증식하기 위하여 적정한 배양조건을 찾고자 Sucrose를 농도별로 처리하여 생장을 관찰하였다. 캘러스는 Sucrose의 농도에 따라 현저한 차이가 나타났다. 캘러스의 생장은 30mg/ℓ가 첨가된 배지에서 가장 양호하였으며, 20 또는 10mg/ℓ의 배지에서도 증식은 가능하였다. 하지만 Sucrose가 첨가되지 않은 대조구와 50mg/ℓ 및 100mg/ℓ의 고농도로 첨가된 배지에서는 갈변하여

고사하는 캘러스가 생겨났으며, 이외의 캘러스도 녹색을 유지하지 못하고, 노란색으로 변하였다. Sucrose**는 에너지원뿐만 아니라 세포내 삼투압을 조절하는 역할을 하는데 캘러스의 생장은** Sucrose**가 아닌 다른 종류의 탄소원을 첨가할 때 서로 다른 반응을 보이기도 한다**(Coffin *et al.*, 1976; Song *et al.*, 1991). **왕벚나무 캘러스 세포배양시에는** 10 30㎎/ℓ**의 농도가 적합한 것으로 판단되며,** 50㎎/ℓ**이상의 고농도로 처리되었을 때 갈변하며 고사한 것은 과다한 삼투압 때문인 것으로 생각된다.**

Table 12. Growth of embryogenic callus on MS medium supplemented with different concentrations of sucrose.

Sucrose (㎎/ℓ)	Fresh weight(㎎)	Growth [1]	Death rate(%)
0	106.4±15.9c [2]	+	28.0±22.8
10	165.9±27.7c	++	0
20	281.7±70.6b	+++	0
30	493.7±183.3a	++++	0
50	261.1±68.2b	++	20.0±16.3
100	99.5±17.8c	+	56.0±16.7

[1] + : very poor, ++ : poor, +++ : good, ++++ : excellent

[2] Means with the same letter are not significantly different at α=0.05

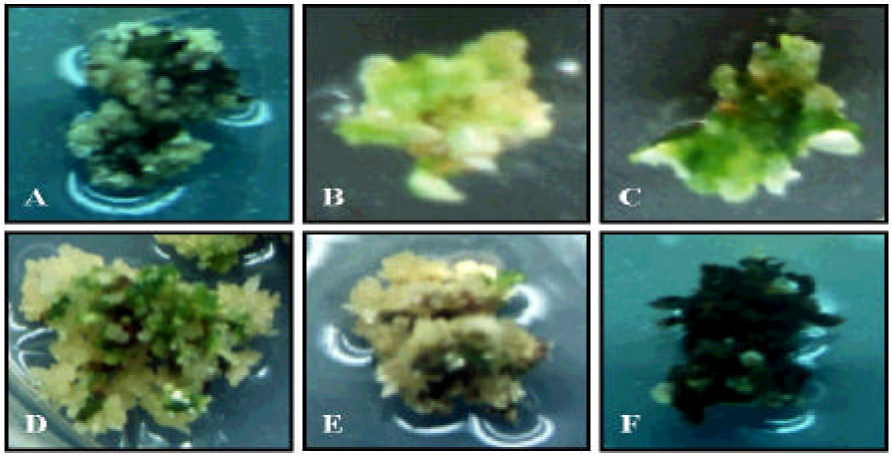

Figure 12. The comparison of the callus growth on the different concentrations of sucrose on MS medium. A: sucrose 0%, B:1%, C:2%, D:3%, E:5%, F:10%

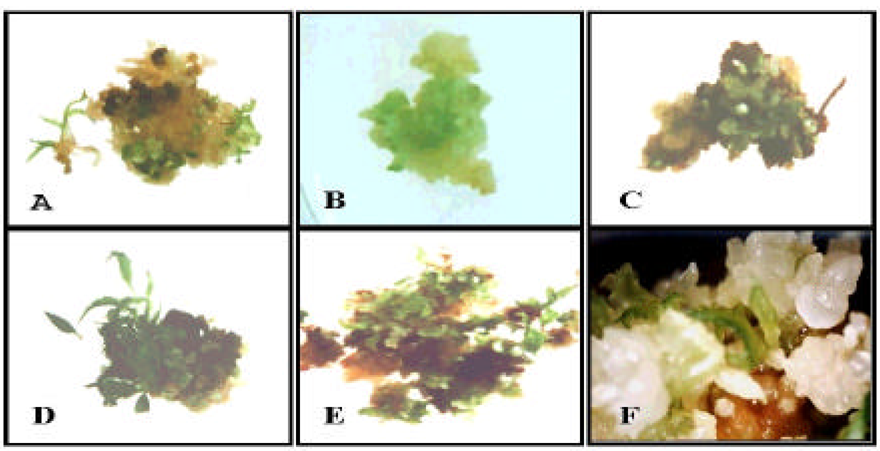

Figure 13. Callus and shoot induction on WPM medium supplemented with various plant growth regulators. A : BAP, B : Zeatin, C : GA_3, D :BAP 0.2 + GA_3 2.0, E : BAP 0.4 + GA_3 4.0, F: BAP 0.2 + GA_3 2.0

3) 캘러스로부터 줄기 분화

증식된 캘러스는 BAP, Zeatin, GA_3를 각각 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 및 5.0㎎/ℓ를 첨가하거나, GA_3 4.0㎎/ℓ+BAP 0.4㎎/ℓ 또는 GA_3 2.0㎎/ℓ+BAP 0.2㎎/ℓ, GA_3 0.4㎎/ℓ+BAP 0.04㎎/ℓ의 조합된 배지에 줄기분화를 위하여 배양되었다(Figure 13, F). 줄기분화배지에 치상된 캘러스는 표면이 울퉁불퉁해지면서 배와 같은 형태로 생장하였다. 그러나 이 캘러스의 배와 같은 기관은 배발달 단계중 특정 단계의 특징과는 다른 형태였으며, 기관으로 분화될 때 체세포배의 특징인 자엽, 줄기, 뿌리의 형태를 갖추지 못하고, 줄기와 잎만 발달하는 것을 볼 때 배발생캘러스로 생각하기에는 무리가 있었다. 그러나 체세포배로 형성시킬 수 있는 방법을 모색할 필요는 있다고 생각되었다. 왕벚나무 종자의 미숙배로부터 체세포배를 유도하는 경우는 있었으나(Koh *et al.*, 1997, 1998), 이는 모수의 목적유전인자를 그대로 반영하지 못하기 때문에 뿌리를 이용하여 체세포배를 유도한다면 목표가 되는 유전형을 가진 개체를 보다 대량으로 증식할 수 있을 것으로 생각된다. 반면 Druart(1981)는 *Prunus incisa* × *serrula* cultive의 뿌리에서 유래한 캘러스에서 체세포배를 유도하여 뿌리유래 캘러스에서 체세포배를 유도가 가능할 것으로 생각된다.

생장조절물질에 따라 기관분화의 양상이 다르게 나타났는데 BAP, Zeatin, GA_3를 단독으로 처리한 배지에서 줄기는 분화되지 않았으며, BAP와 GA_3가 혼용처리된 배지에서 줄기가 분화하였다(Table 13). Druart (1980)는 *Prunus* 종의 분열조직에서 재생된 식물체의 뿌리에서 유도한 캘러스로부터 줄기를 재생하는데 BA 1.0㎎/ℓ, GA_3 0.1㎎/ℓ를 첨가하였는데 이는 본 연구와는 생장조절물질의 비율은 다르지만 역시 BAP와 함께 GA_3를 첨가하여 본 실험결과와 비슷한 경향을 보여 벚나무류에 있어 GA_3는 분화에 효과적인 물질로 생각된다.

BAP, Zeatin, GA_3가 각각 첨가된 배지에서 캘러스는 진한 초록색을 띠고 생장을 하였지만 Zeatin과 GA_3는 줄기유도에 효과가 없었으며, BAP가 첨가된 배지에서는 잎이 발달하기도 하였으나 정상적인 줄기로 자라는데는 실패하였다 (Figure 13, A).

Table 13. Shoot induction rate from the callus on the WPM media for 4 weeks on the 16h photoperiod.

Growth regulators (㎎/ℓ)	Shoot induction rate(%) (Mean±SD)	No. of shoots induced from callus (Mean±SD)
GA_3 0.4 + BAP 0.04	12.0±11.0	1.3±0.6
GA_3 2.0 + BAP 0.2	76.0±16.7	4.0±2.5
GA_3 4.0 + BAP 0.4	52.0±11.0	2.5±1.4

GA_3 2.0㎎/ℓ+BAP 0.2㎎/ℓ 배지는 다경줄기를 유도하는데 가장 효과적인 조합인 BAP와 GA_3의 농도를 1/2로 줄인 것으로 줄기에서 다경줄기를 유도하는데 이용되었던 GA_3 4.0㎎/ℓ+BAP 0.4㎎/ℓ조합보다 효과적이었다. 이 농도의 1/10인 GA_3 0.4㎎/ℓ+BAP 0.04㎎/ℓ의 조합에서는 캘러스가 증식될 뿐 줄기를 유도하는데는 적합하지 못했다. 왕벚나무의 기내배양 시 동아에서 개엽를 유도할 때 BAP가 필요하였으며, GA_3는 줄기를 유도하는데 매우 효과가 있었다고 하였는데 캘러스에서 줄기를 유도함에 있어 GA_3가 매우 효과적이었다. BAP를 단독으로 처리하였을 때 잎이 형성되었으나 줄기유도에는 효과적이지 못하였다. GA_3 단독처리구에서는 시간이 경과할수록 캘러스가 갈색으로 변하면서 활력이 떨어졌으나 두 생장조절물질을 혼합하여 줄기를 유도할 수 있었다. 따라서 왕벚나무의 조직배양시에 동아배양에서와 같이 BAP와 GA_3 두

생장조절물질이 혼합되었을 때 상승효과를 나타내는 것으로 판단된다.

4] 발근유도

1) 배지선정시험

기내에서 증식시 가장 적합한 조건의 배지를 알기 위하여 조직배양에 쓰이는 일반적인 5종의 배지(B_5, GD, 1/2MS, MS, WPM)를 선정하여 배지의 무기성분이 식물체의 발근 및 생장에 미치는 영향을 조사하기 위해 Sucrose를 첨가하지 않고 4주간 배양하고, 2% Sucrose를 첨가한 배지에서 배양 후 뿌리가 발생하는 절편의 수와 캘러스 발생 수, 뿌리와 함께 캘러스가 발생하는 절편체의 수를 조사하였다. 배양 후 생중량과 치상당시의 생중량의 차이를 생장량으로 간주하였다. 대조구로서 아무것도 첨가하지 않은 Agar배지와 2% Sucrose만을 첨가한 배지를 이용하였을 때, Sucrose가 첨가되지 않은 모든 배지에서는 뿌리가 발생하지 않았으며, 캘러스의 발생도 관찰되지 않았다. 반면 2% Sucrose가 첨가된 배지에서는 대부분의 배지에서 뿌리와 캘러스가 형성되는 것을 볼 수 있었다(Table 14).

다섯 가지 배지는 서로 다른 농도의 무기양분이 포함되어 있지만 줄기의 발근에 있어서는 55.6 67.4%로 큰 차이를 보이지 않았으며, 통계적으로도 유의성이 인정되지 않았다. 반면 Sucrose나 무기물이 첨가되지 않은 대조구의 한천배지에서는 거의 발근이 되지 않았으며, Sucrose만 2% 첨가된 배지는 대조구 한천배지보다는 높은 발근율을 보여 식물체의 발근유도에 무기물의 영향외에 sucrose도 영향을 미치는 것으로 생각된다.

대부분의 배지에서 뿌리가 발생함과 동시에 캘러스의 형성도 관찰되었다. 배지 중 MS배지에서 캘러스 형성율이 높았으며 뿌리와 캘러스가 함께 형성되는 비율은 8.3 37.7%로 나타났다.

Table 14. The rate of rooting, callus formation and rooting with callus of shoot on five different media.

Media	Root formation rate(%)	Rate of rooting with callus formation(%)	Callus formation rate(%)
Control 1 [1]	7.1±9.5c [3]	0	0
Control 2 [2]	28.3±6.9b	6.7±11.5	0
B_5	42.2±21.7ab	23.3±15.3	37.7±40.2
GD	60.0±13.3a	20.0±17.3	27.7±19.7
1/2 MS	66.7±11.3a	30.0±10.0	21.3±25.8
MS	53.3±21.2ab	43.3±32.1	24.7±31.4
WPM	46.7±17.9ab	3.3±5.8	8.3±14.4

[1] 0.7% agar medium without the macro- and micro-nutrients and sucrose.
[2] 0.7% agar medium without the macro- and micro-nutrients but with 2% sucrose.
[3] Means with the same letter are not significantly different at the α=0.05.

다섯 가지 배지에서 4주간 자란 식물체는 치상당시와 비교할 때 형태적으로 약간의 변화가 있었다. 일부는 배지 속에 들어갔던 부분이 하얗게 또는 갈색으로 변하거나 정단부가 노랗게 변하면서 낙엽이 지는 경우가 있었다. 그러나 대부분의 식물체는 건전한 상태였으며, 잎의 색도 초록색으로 유지하고 있었다. 줄기 길이의 변화는 거의 없었다.

2) Sucrose 농도에 따른 발근

다섯 가지의 배지에서 Sucrose가 식물체의 생장에 미치는 영향을 실험한 결과 기내배양 중 Sucrose는 식물체의 생장뿐만 아니라 발근율에도 영향을 미치는 것으로 나타났다. 1/2MS배지를 선택하여 Sucrose의 농도를 조절하여 생

장에 미치는 영향을 조사한 결과 Sucrose의 농도가 높아질수록 발근율이 높아지는 것을 볼 수 있었다(Table 15). Sucrose의 농도가 5%에서 90.9%의 높은 발근율을 보였으며, 저농도에서는 40 50%로 낮아 대조를 이루었다. 그러나 3% 이상이었을 경우에 86%의 높은 발근율을 보였다. Sucrose 농도의 차이는 식물체의 생장과 캘러스의 형성 및 크기에도 영향을 미쳤다. 1 2%의 농도에서는 잎의 크기가 작으며, 잎의 숫자가 적었고, 잎은 연한 녹색을 띠며 잎맥이 약간 붉어지는 경향이 있었고 캘러스의 크기는 매우 작았다. Sucrose의 농도가 3%이상되었을때는 잎의 크기가 커졌으며, 생장이 양호하고, 발생한 뿌리의 길이도 길었지만 캘러스의 크기가 커지기 시작했다. 또한 발근시에 캘러스의 형성이 동반되는 비율이 높아졌다.

Table 15. The rate of rooting and callus formation on media supplemented with different concentrations of sucrose[1].

Sucrose (g/ℓ)	Root formation rate(%)	Rate of rooting with callus formation(%)	Callus formation rate(%)
0	19.4c[2]	0	0
10	40.9b	81.8	45.5
20	50.0ab	88.9	40.9
30	86.4a	94.7	90.9
40	77.3a	100.0	94.7
50	90.9ab	90.0	95.5

[1] Culture medium was based on MS and culture period was 4 weeks.

[2] Means with the same letter are not significantly different at the α=0.05.

Minotta(1981)는 peach의 기내줄기에서 뿌리유도시 Sucrose와 다른 종류의 당을 동시에 처리했을 때 발근율이 높아졌다고 하여 본 연구와 같이 *Prunus*류의 발근에 Sucrose가 영향을 미치는 것으로 생각된다. 그러나 Sucrose의 농도가 높아질수록 발근과 함께 커다란 캘러스의 형성이 동반되는 문제점은 연구되어야 할 과제이다.

3) 오옥신의 종류 및 농도에 따른 발근

기내에서 증식된 식물체의 발근을 유도하기 위하여 여러 가지 종류의 배지와 두가지 오옥신을 농도별로 처리한 결과는 Table 16과 같다. 배양을 시작한지 일주일이 지나면서 절단면에 하얀색의 캘러스가 형성되기 시작하였다. 특히 NAA가 첨가된 배지의 식물체에서는 캘러스가 크게 형성되었으며 뿌리는 대부분 흰색의 털과 같은 뿌리가 생겼으며, 배지위의 줄기에서도 뿌리가 발생하였다. IBA에서도 줄기의 절단면에 큰 캘러스가 생기면서 뿌리가 유도되었다. 뿌리의 길이는 길게 한 두 개가 자라는 형태였다. NAA 0.5㎎/ℓ가 첨가된 배지에서는 액아와 절단면에서 새로운 줄기가 발생하기도 하였다.

Table 16. Rooting rate of *P. yedoensis* on the five different media containing various concentrations of IBA and NAA.

Auxin	Concentration (㎎/ℓ)	Rooting rate (%)					Mean
		B_5	GD	1/2MS	MS	WPM	
IBA	0.5	25	51	17	73	57	33.3
	1.0	80	65	36	52	75	46.8
	2.0	60	35	25	35	50	31.4
NAA	0.5	54	60	44	46	60	40.9
	1.0	42	52	32	42	54	33.8
	2.0	31	35	46	52	41	33.2

IBA는 농도에 따라 큰 차이는 없었으나 1.0 ㎎/ℓ가 첨가되었을 때 가장 높은 발근율을 보였다. IBA가 같은 농도로 첨가되었을 때 첨가되었을때는 캘러스의 발생이 현저하였으며, 뿌리의 발생은 항상 캘러스를 통하여 나타났다. NAA를 첨가하였을 때 저농도인 0.5㎎/ℓ에서 발근율이 가장 높았으며, 농도가 높아질수록 발근율은 낮아졌다. 반면 캘러스의 형성율은 높아졌으며, 캘러스의 크기도 매우 커지는 경향을 보였다. 뿌리는 캘러스를 통해 발생하였으며 매우 연약하고, 털과 같은 형태로 식물체를 옮길 때 식물체에서 분리되어 뿌리로서의 역할을 기대할 수 없었다. IBA와 비교하였을 때 발근을 위한 조건으로서 적당하지 못했다. 그러나 다른 *Prunus*류에서는 IBA(Skirvin et al., 1980; Hmmerschlag, 1982)를 많이 사용하였으며 Ruzic and Cerovic(1985)은 여러 종류의 오옥신을 첨가한 중 NAA 1.0 ㎎/ℓ의 처리구에서 90.6%로 가장 높게 나타났다고 하였으며, 왕벚나무의 경우 IBA 4.0㎎/ℓ를 첨가한 GD배지에서 발근율이 60%로 나타나 오옥신의 종류와 농도 또는 같은 품종내에서도 다르게 반응하는 것으로 생각된다.

4) 식물체의 캘러스 유 무 및 배양토에 종류에 따른 기내발근

기내에서 대량증식된 왕벚나무 줄기를 기외에 이식하거나 삽목하여 환경순화를 거치기 전 단계로서 발근되지 않은 줄기를 한천배지가 아닌 인공배양토를 배지로하여 기내 조건에 삽목하였을 때도 발근이 가능한가를 고찰하기 위하여 인공으로 조제된 3가지의 배양토에 직접 삽목한 후 4주후에 발근율을 조사하였다. 한편 기부에 형성된 캘러스의 존재여부에따라 발근율 및 활착율에 미치는 영향을 조사하고자 캘러스가 있는 줄기와 그렇지 않은 줄기로 구분하여 삽목을 실시하였다. 배양토마다 각각 10점씩 5반복하였으며, 4주후에 발근율을 조사하고 생존한 식물체를 조사하였다. 수집한 데이터는 SAS system을 이

용하여 Duncan's multiple range test와 T-test를 실시하여 평균간의 차이에 대한 유의성을 검정하였다

Table 17. Difference of rooting rate and survival rate of two kinds of shoots on three types of soil *in vitro*.

Soil type	Shoots without callus		Shoots with callus	
	Rooting rate(%) (Mean±SD)	Survival rate (%)	Rooting rate(%) (Mean±SD)	Survival rate (%)
A [1]	84.0±19.4a [2]	100	26.0±5.5c	82.0
B	46.0±11.4bc	100	26.0±20.7c	96.0
C	60.0±18.7b	100	32.0±4.5c	94.0

[1] See table 1.

[2] Means with the same letter are not significantly different at α=0.05.

캘러스가 형성되지 않은 줄기는 줄기가 형성된 지 4주가 되는 신초로서 모든 배양토에서 100%의 생존율을 보였으나, 기부에 캘러스가 있는 줄기는 4주이상 배양된 것으로써 캘러스가 없는 신초보다는 생존율이 낮았으나 82%이상이므로 양호한 편이었다. 한편 배양토에 따른 발근율의 차이는 캘러스가 없는 신초는 Peatmoss, Vermiculite 및 Perlite가 동량으로 혼합된 토양에서 84%로 발근율이 가장 높았으며, 송이와 혼합된 토양에서 60%로 양호하였으나, 모래와 혼합된 토양에서 40%로 낮은 발근율을 보였다. 기부에 캘러스가 형성되어 있는 줄기는 평균 발근율이 26.0 32.0%로 세가지 배양토 모두에서 매우 낮게 나타났다. 캘러스의 존재여부에 따른 발근율의 차이는 T-test 결과 5%에서 유의성이 인정되어, 캘러스 존재는 발근에 저해요인으로 작용하는 것으로

나타났다. 반면 Okimura(1961)는 소나무 삽목시 캘러스가 형성되지 않은 조직보다 캘러스가 형성된 조직에서 발근이 더 잘된다고 하여 본 연구와는 다른 결과를 보여 줄기에 캘러스의 존재여부가 발근에 미치는 영향을 확실하게 단정지을수는 없지만 왕벚나무의 경우 기내에서 형성된 캘러스를 그대로 두고 삽목한 결과 활착율이 저하되는 경향이 있었다. 캘러스가 없는 신초의 발근형태는 기부에서 직접 뿌리가 발생하거나 발근되지 않은 것은 기부에 캘러스가 형성되어 있었고, 캘러스를 그대로 두고 삽목한 경우 토양속에서 캘러스는 검게 변해 있었으며, 정단부는 살아있음에도 불구하고 캘러스와 연결된 줄기 부분이 누렇게 말라서 죽어갔다(Figure 14). 또 캘러스가 있는 줄기의 발근형태는 기부가 아닌 줄기의 중간부분에서 뿌리가 발생하는 경향이 있었다. 이는 한천배지에서는 캘러스를 통하여 뿌리가 형성되는 현상과는 다른 것으로 토양이 배지로서 조건이 다르기 때문인 것으로 생각된다. 삽목시 캘러스가 없는 신초에서 더 높은 발근율과 활착율을 보였는데 이는 캘러스가 존재하므로써 배양토로부터 수분 및 양분의 흡수가 방해를 받았거나, 비록 기내배양이었지만 배양기간이 길어지면서 기내줄기가 노화되므로써 수분함량 및 식물체내 무기양분의 양이 변화하여 발근에 영향을 미쳤기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 이 배양기간에 따라 식물체 내의 생리적인 차이를 고찰할 필요가 있다고 생각한다.

왕벚나무 기내식물체를 기내에서 직접 삽목했을 때 발근율이 Sucrose를 고농도로 처리한 경우보다는 낮았으나, IBA 또는 WPM배지의 양분존재하에서 최소 17 80%로 일정하지 않았던 것과는 반대로 배양토 A 타입에서 50 100%의 높은 발근율을 보였다. 이는 외부에서 오옥신을 첨가하지 않아도 발근율이 높았다는 맥락과 일치하며, 배양용기가 반투명하여 일반 시험관보다는 빛의 세기가 약해지면서 벚나무류의 줄기에서 뿌리를 유도하기 위하여 암처리를 하였을 때 증진시킬 수 있었다는 보고를 볼 때(Tricoli, 1982; Tricoli *et al.*, 1985; Mante *et al.*, 1989) **한천배지가 담긴 시험관보다 빛의 세기가 약한 것이 왕벚나무의 발근을 촉진한 것으로 생각된다.**

Table 18. Difference of number and length of roots induced from two kind of shoots on three types of soil *in vitro*.

Soil type	Shoots without callus		Shoots with callus	
	Number of roots induced (Mean±SD)	Length of root (cm)	Number of roots induced (Mean±SD)	Length of root (cm)
A [1]	2.8±0.42a [2]	5.1±0.9b	1.9±0.88bc	4.2±3.0b
B	2.0±0.82b	5.5±2.1b	1.2±0.42c	4.0±2.6b
C	2.3±1.1ab	11.3±3.5a	1.8±0.92c	4.6±1.8b

[1] See table 1.

[2] Means with the same letter are not significantly different at α=0.05.

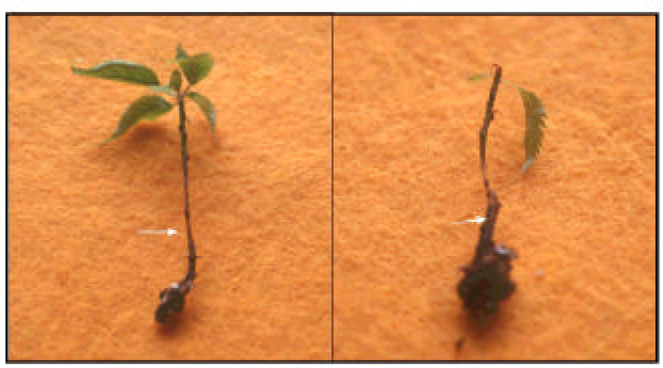

Figure 14. The shoot with callus at the base part 4 weeks later after cutting.

각 배양토에 따라 유도된 뿌리의 수와 길이를 조사한 결과는 Table 19와 같다. 한 개의 식물체에서 유도된 뿌리의 수는 평균 1.2 2.8개였으며, 배양토 A 타입에서 캘러스가 없는 줄기의 평균 뿌리 수가 2.8개로 가장 많았으며, 같은 배양토에서도 캘러스가 존재할 때 뿌리의 수는 1.9개로 T-test 결과 유의성이 인정되어 캘러스가 발생한 뿌리의 수에도 영향이 있는 것으로 생각되었다. 한편 모든 배양토에서 캘러스가 존재하는 줄기의 뿌리수가 적었으며, 그 중에서도 모래와 혼합된 배양토에서 발근율과 함께 뿌리의 수도 가장 적은 것으로 나타났다. 형성된 뿌리의 길이는 평균 3.99 11.27㎝로 나타났으며, 다른 토양과 달리 송이가 혼합된 토양에서 뿌리의 길이가 가장 긴 것으로 나타났다.

세 종류의 배양토에 대해 함수율을 조사한 결과 A 타입의 배양토는 많은 양의 수분을 가장 장시간 보유하고 있을 수 있으므로 기내의 습도조건을 충족시킬 수 있을 수 있었던 것으로 생각되며, 송이토가 혼합된 토양에서는 수분량 감소가 A 타입의 토양보다 빠르고, 토양입자가 크므로 뿌리의 발달이 두드러진 것으로 생각된다.

5) 기내배양토에서 발근처리된 식물의 이식 후 활착율

기내삽목 후 발근된 식물체와 발근되지 않은 식물체를 온실 조건하에서 세 가지 배양토에 이식한 후 활착율을 조사한 결과는 Table 19와 같았다. 기내에서 삽목하여 캘러스가 없고 발근된 식물체는 90 100% 활착되었으며, 캘러스가 있고 발근된 식물체는 모래가 섞인 토양에서 45.5%, 다른 두 토양에서는 73.3 75.0%로 높게 나타났다. 발근되지 않았던 식물체 중 캘러스가 없는 것은 16.7 26.7%로 뿌리가 있는 식물체와 비교할 때 활착율이 매우 낮게 나타났으며, 발근되지 않고 캘러스가 존재하는 식물체는 17.1 21.9%로 역시 매우 낮게 나타났다. 기내 삽목 후 발근된 식물체와 발근되지 않은 식물체의

활착율에 차이가 나타난 것은 기내 삽목동안 발근될 수 있었던 것과 그렇지 않은 식물과의 각각의 생리상태가 다르기 때문인 것으로 생각된다.

Table 19. Survival rate of the shoots in greenhouse established by cutting *in vitro*.

Soil type	Shoot condition			
	+R-C *	+R+C	-R-C	-R+C
A	92.1	75.0	18.2	21.1
B	100.0	45.5	16.7	17.1
C	90.0	73.3	26.7	21.9

+R-C : shoots with roots but without callus, +R+C : shoots with roots and callus, -R-C : shoots without roots and callus, -R+C : shoots with callus but without roots.

2. 삽목 및 환경순화

1〕 삽목 및 이식

1) 삽목시 활착에 미치는 배양토의 영향

기내삽목과 같은 종류의 세가지 배양토를 사용하여 삽목을 실시하였다. 배양토의 종류는 기내삽목과 같이 하였으나 삽목하는 환경조건이 기내와 다르기 때문에 각 배양토의 수분함량은 시간이 지남에 따라 달라졌다(Figure 15).

각 토양은 물리적 화학적 성질이 다른데 그 중 수분을 함유하고 있는 정도의 차이가 심하게 나타났다. 충분히 관수한 후 1일부터 5일까지 매일 함수율이 낮아지는데 관수 후 첫날 송이와 모래의 함수율은 각각 62%, 54.7%로 낮은 편이었으나 배양토 A는 함수율이 113%로 매우 높았다. 많은 시간이 경과한

후 각 토양들이 보유하고 있는 수분량을 비교해보면 배양토 A는 오랜동안 적정량의 수분을 보유하고 있는 것으로 나타났다.

기내에서 증식된 줄기는 야생에서 채취한 삽수와는 매우 다른 생리적인 특성을 가지고 있기 때문에 삽목시 외부의 환경조건에 따라 활착율에 큰 영향을 받게 된다. 기내에서 기외로 옮긴 직후 뿌리가 토양에 정착되지 않는 이유보다는 잎과 줄기의 수분손실에 의한 피해와 무균배양되었기 때문에 외부 환경의 곰팡이와 같은 균류에 의한 피해가 활착율이 낮아지는 원인으로 생각되었다. 식물체의 삽목시 기부에서 뿌리의 형성은 일반적으로 유관조직의 중심부에 바깥쪽이나 그 다음 층에서 내생적으로 발생하게 된다. 대부분의 발근이 용이한 목본 식물은 사부방사유세포에서 발생한다고 하였다(Hartmann *et al.*, 1990). 뿌리가 형성되는 과정중에 캘러스 형성 단계를 거치지 않고 직접 발근되는 경우와 캘러스가 먼저 형성되는 경우가 있는데 왕벚나무의 경우 기내 발근과정중 배지, 오옥신 및 Sucrose의 영향으로 캘러스 형성율이 높았다. 이 캘러스의 존재가 이후 삽목이나 발근된 개체의 이식 순화과정에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구는 잘 되어 있지 않다. Hartmann과 Kester(1983)는 캘러스의 형성과 뿌리의 형성은 독립된 과정으로서 캘러스의 유무가 발근에 영향을 미치는 것은 더 많은 연구가 필요하다고 하였다. 일반적으로 삽목후 형성된 캘러스와 달리 기내조건에서 형성된 캘러스는 많은 당이 함유되어 토양에 삽목할 경우 줄기의 기부가 썩게되어 오히려 줄기에서 발근을 저해할 수도 있다는 우려가 있다.

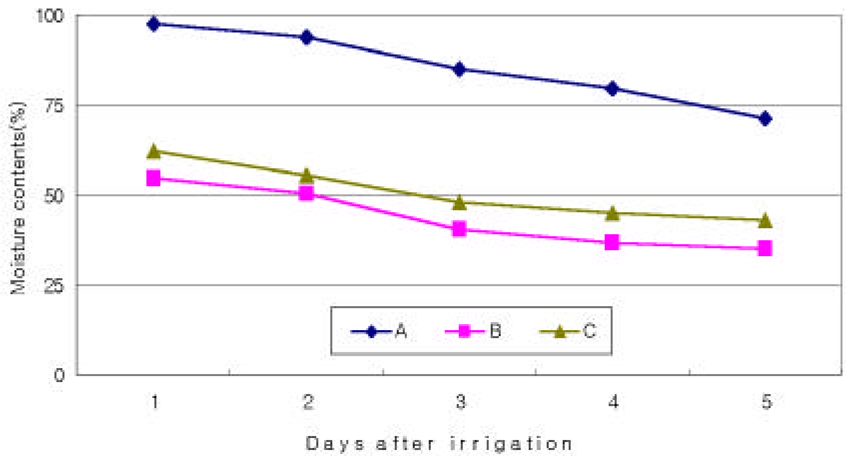

Figure 15. The changes of the water content of the three types of soil.

따라서 줄기의 기부에 캘러스가 형성되어 있는 것과 캘러스가 형성되지 않은 신초로 구분하여 삽목한 후 발근 및 활착율을 조사한 결과 캘러스가 없는 신초의 활착율은 평균 29.2%, 캘러스를 유지한 것이 평균 16.1%로 나타났다. 캘러스가 없는 신초의 활착율이 더 높은 것으로 나타났다. 기외삽목의 활착율은 기내삽목과 비교할 때 매우 낮은 것으로 나타났는데 이는 증식된 줄기가 직접 외부환경에 노출되기에 잎과 줄기의 생리상태나 구조가 적합하지 않은 것으로 생각된다. 그러나 캘러스가 없는 신초의 발근율이 높은 것은 같은 결과로서 외부 환경의 요인이 아닌 식물체 자체 상태가 요인인 것으로 판단된다.

또 식물의 활착에 미치는 배양토의 종류에 따른 활착율을 조사한 결과 A 타입의 배양토(Peatmoss : Vermiculite : Perlite = 1:1:1)에서 가장 높은 것으로 나타나 기내삽목에서와 같은 결과를 보였다(Table 20). Moon 등(1987)은 상수리나무를 삽목할 때 Peat moss와 Vermiculite를 동량으로 혼합한 배양토와 Vermiculite와 Perlite를 동량으로 혼합한 배양토가 모래를 섞은 다른 배양토에서보다 발근율이 높았으며 이는 뿌리가 형성되어 발달하는데 상토에 함유된 수

분량과 이를 보유하고 있는 능력에 의한 차이라고 하여 본 연구결과와 유사하였다.

Table 20. Survival rate of two different shoots on the three kinds of soil types.

Soil type	Shoot type	
	Shoots without callus	Shoots with callus
A [1]	59.5±11.2a [2]	54.2±14.4a
B	42.3± 5.9b	28.3±11.8b
C	50.5± 8.7ab	46.3±18.9ab

[1] See table 1.

[2] Means with the same letter are not significantly different at α=0.05

발근되지 않은 줄기를 삽목할 때 0.8% IBA와 0.4% NAA의 두 가지 발근촉진제를 분의법으로 처리한 결과는 Table 21과 같다.

Table 21. Rooting percent of the shoots were treated with growth regulators.

Rooting substance	Soil type		
	A [1]	B	C
Control	59.5	42.3	50.5
IBA 0.8%	30	42.5	42.5
NAA 0.4%	25	28.6	28.6

[1] See table 1.

대조구와 비교할 때 모든 토양종류에서 IBA와 NAA를 처리한 후 발근율 및 활착율이 증진되지 않은 것으로 나타났다. 한편 B와 C의 경우 큰 차이가 없었으나 A타입의 토양에서는 발근율이 현저하게 떨어졌으며, NAA 0.4%는 오히려 발근율이 낮아지는 것으로 나타나 기내에서 발근유도시 NAA의 효과와 같은 결과를 보여 NAA는 왕벚나무의 발근을 위한 조절물질로는 적합하지 않은 것으로 나타났다. 이상의 결과로 볼 때 왕벚나무 기내배양된 줄기로부터 뿌리를 유도하지 않고 직접 삽목할 경우 Peatmoss : Vermiculite : Perlite = 1:1:1로 혼합한 토양이 적합하며, 별도의 발근처리를 하지 않아도 발근이 용이한 것으로 나타났다.

2) 삽목 및 발근된 식물의 이식 후 계절에 따른 활착

온실에서 인공배양토에 기내증식된 줄기를 6월부터 9월까지 매월 삽목하고, 삽목 4주 후 발근되어 활착된 식물체의 수를 조사하였다. 활착율은 6월에 가장 낮고, 9월에 가장 높았으며, 점차 활착율이 높아지는 것으로 나타났다 (Figure 16). 삽목 후 식물체는 공기 습도에 가장 민감한 반응을 보였는데 90%이상으로 높게 유지되어야 잎의 상태가 양호하였다. 반면 습도가 높으면 곰팡이에 의한 피해가 나타나 활착에 큰 어려움이 있었다. 삽목의 발근에는 온도가 영향을 미치는데 6, 7, 8월의 기온은 9월의 평균기온보다 월등히 높기 때문에 활착율에 차이가 있었던 것으로 보인다.

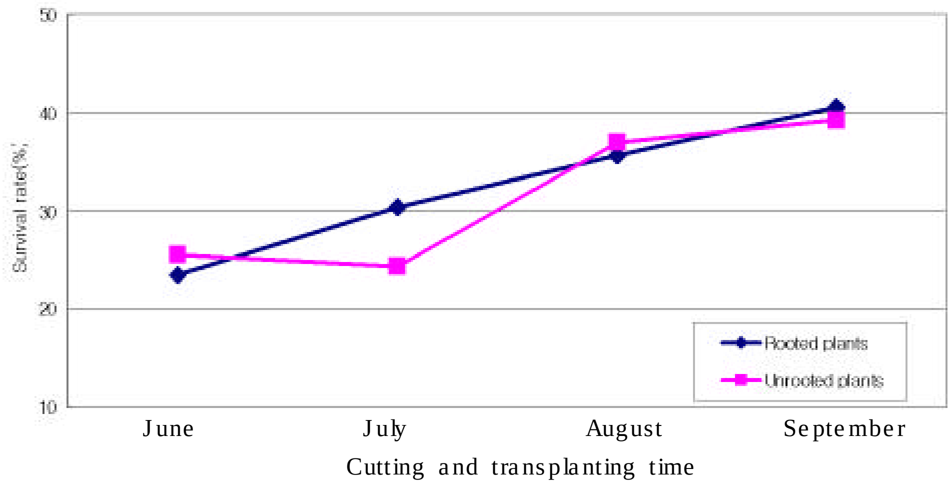

Figure 16. The change of survival rate depending on the transplanting time.

Rosati 등(1980)은 *Prunus salicina*의 배양시 뿌리를 유도하기 위해서는 15℃보다 21, 26℃가 더 적합하다고 하여 온도와 뿌리의 발생과 관계가 있음을 제시하였다. 기외 삽목의 경우 기내와는 다른 환경이지만 25±2℃의 조건에서 기내삽목한 결과 최대 84%까지 발근된 것과 비교하면 매우 낮은 것으로 온도와의 상관성이 있는 것으로 추측된다. 따라서 6, 7, 8월의 온도가 9월의 온도보다 높았으며, 습도와 곰팡이와 같은 요인으로 인해 9월에 실시한 삽목 활착율이 높은 것으로 생각된다.

기내에서 발근된 상태의 줄기를 인공배양토에 이식하여 온실에서 순화과정을 거쳤다. 삽목과 같이 6월부터 9월까지 매월 이식하고, 이식 4주 후 생장이 정상적이며 새로운 뿌리가 발생하여 활착된 식물체의 수를 조사하였다.

발근된 식물체를 온실에 삽목과 같은 조건에 이식하고 4주후의 활착율은 삽목의 결과와 같이 6,7,8월에 낮고, 9월에 높았다. 발근된 식물체의 활착율이 삽목과 비교할 때 크게 차이가 나지 않으므로 식물체의 활착율은 식물체의 발근에 의한 요인보다는 이식 후 환경에 의해 영향을 받는 것으로 생각된다.

앞의 내용과 같이 제주 자생 왕벚나무의 기내배양기술을 통한 대량증식법을 확립하였으며, 이를 요약하면 Figrue 17과 같다.

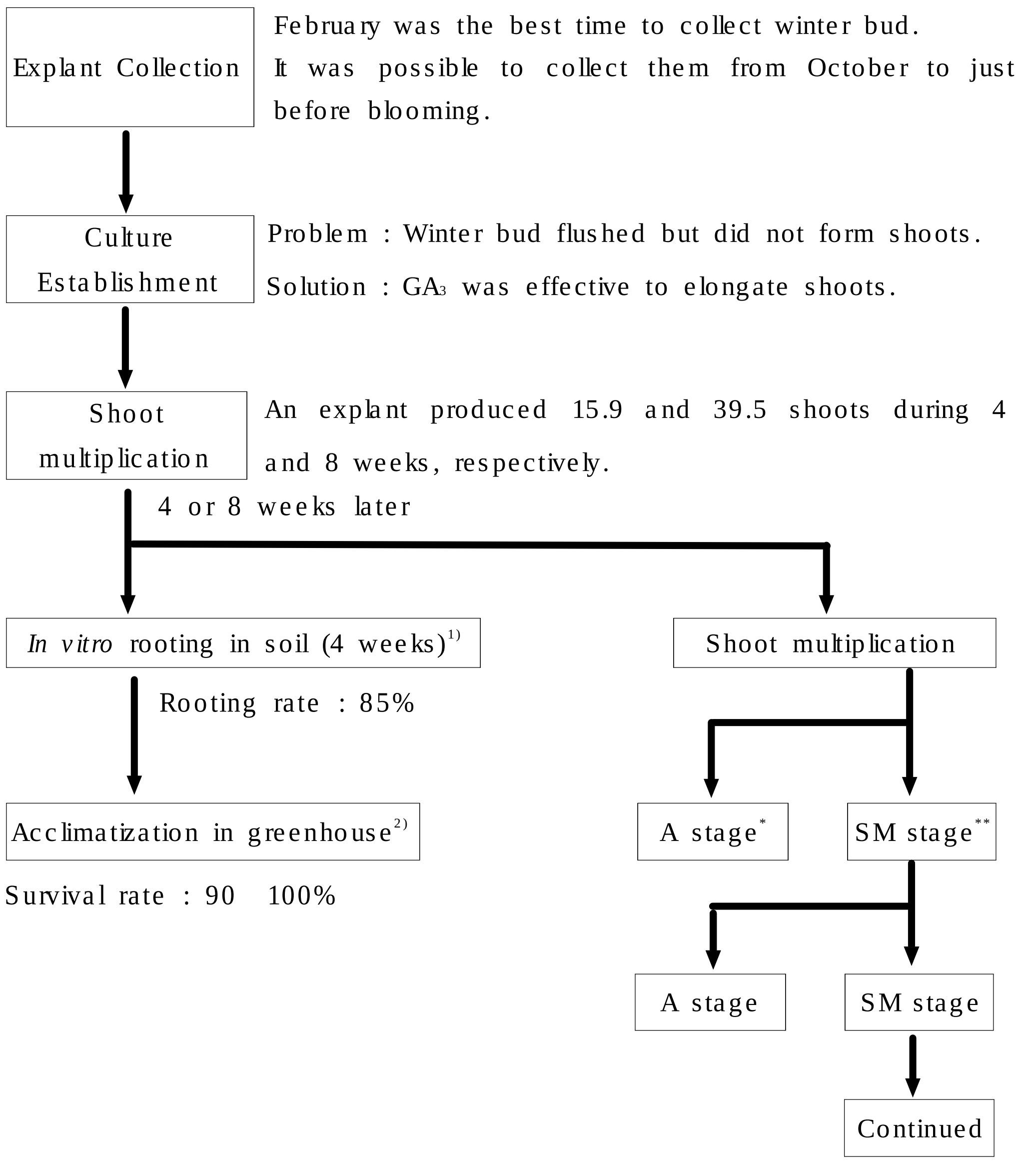

Figure 17. The flow chart of mass propagation system through *in vitro* culture of *Prunus yedoensis*.

* A stage : 1) + 2) ; ** SM stage : Shoot multiplication.

Merits

1. We could collect the winter buds from October to February.
2. Shoots directly elongated from winter buds by supplementing GA_3.
3. Shoot multiplication rate was very high.
4. Shoots were rooted in soil *in vitro*.
5. Survival rate of rooted shoots in soil *in vitro* in the greenhouse was almost 100%.

2] 활착된 조직배양묘의 생장

이식 및 삽목된 왕벚나무 조직배양묘는 겨울을 거친 후 일반토양으로 이식하였다. 이때 배양토에 따라 발생한 뿌리의 수와 길이를 조사 비교하였다. 이식된 배양묘를 50본을 선정하여 줄기의 길이(기내에서 자란 후 순화된 줄기와, 순화된 후 형성된 줄기), 잎 수, 잎의 엽록소량 및 근원경을 매월 조사하여 배양묘의 생장을 조사하였다. 또 식물체 50본의 줄기의 상 중 하단 부분으로 나누어 각 부위의 잎을 두 개씩 정하여 SPAD 502로 엽록소량을 측정한 후 평균을 구하였다. 환경순화 후 겨울을 지낸 식물체는 3월초부터 새잎이 발생하며 생장이 시작되었다. 활착당년지의 길이는 4월에서 5월 사이에 가장 길게 자랐으며, 근원경의 직경도 4월에서 6월 사이에 가장 많이 증가한 것으로 나타났다(Figure 18). 활착후 형성된 신초의 길이는 5월에서 6월 사이에 생장이 가장 왕성하였으며 7월, 8월이 지나면서 생장속도가 현저히 감소하는 것으로 나타났다(Figure 19). 전년줄기, 근원경 및 신초의 길이 생장이 자연조건에서와 같이 공통적으로 4월에서 6월 사이에 가장 왕성하게 이루어졌으며, 줄기의 생장은 평균 47cm로 매우 양호하였다. 줄기의 길이 생장과 함께 잎의 수도 늘어났으며, 위치별 잎의 엽록소함량을 조사한 결과 생장이 왕성하였던 시기에 잎의 수도 증가하였으며, 생장량이 감소하였던 7, 8월에는 낙엽현상으로 잎의 수가 감소하였으며(Figure 20), 엽록소의 함량은 새로운 잎이 형성되는 상단부는 시간이 지날수록 약간씩 높아졌으나 중 하단부의 잎보다 낮게 나타났으며, 생장속도가 늦어진 7, 8월에는 새잎의 엽록소 함량과 중앙부위의 잎의 엽록소 함량과 같은 수준이 되었다(Figure 21). 하단부의 잎은 생장이 왕성했던 5월까지 증가하였으나 6월부터 황화현상이 일어나기 시작하였으며 엽록소의 함량이 줄어들면서 7, 8월에는 상 중단부의 잎보다 낮은 것으로 나타났다. 또한 7월부터 낙엽현상이 두드러졌으며 9월에는 대부분이 탈락하였다.

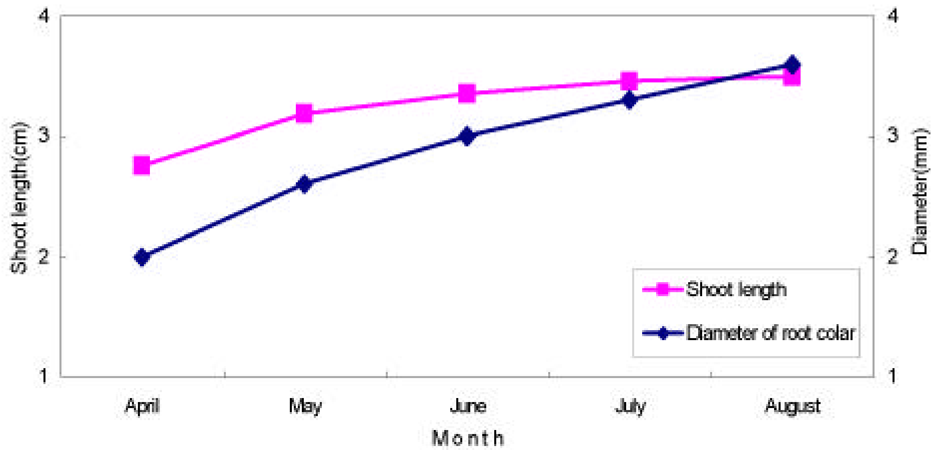

Figure 18. The growth of the shoots and root collar grown *in vitro* after acclimatization in the green house.

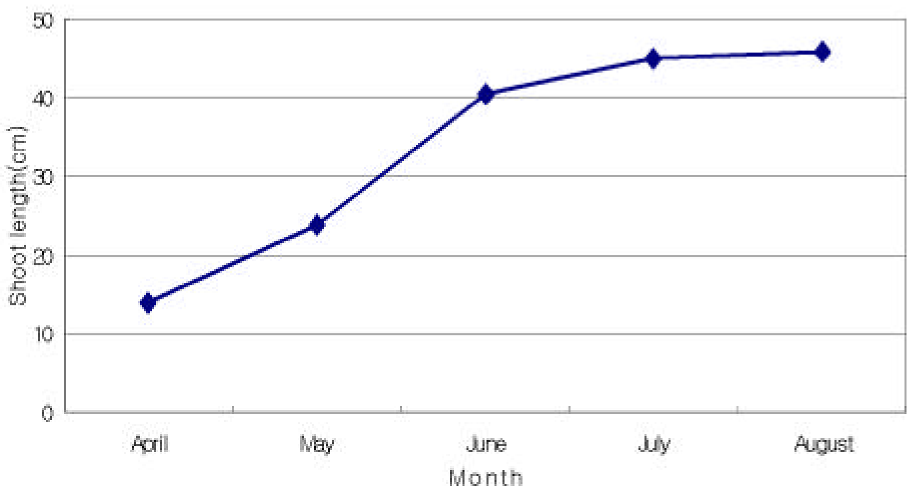

Figure 19. The growth of the shoots formed after acclimatization in the green house.

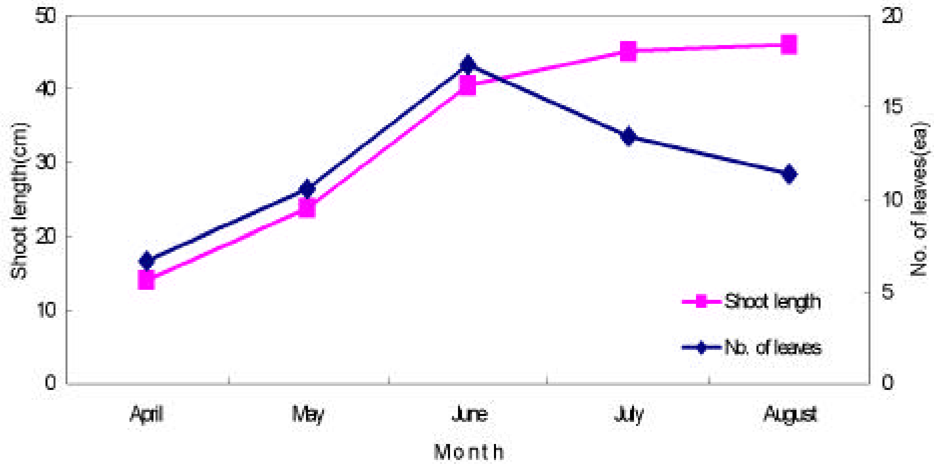

Figure 20. Growth of shoots formed after acclimatization and change of the number of leaves of the shoots.

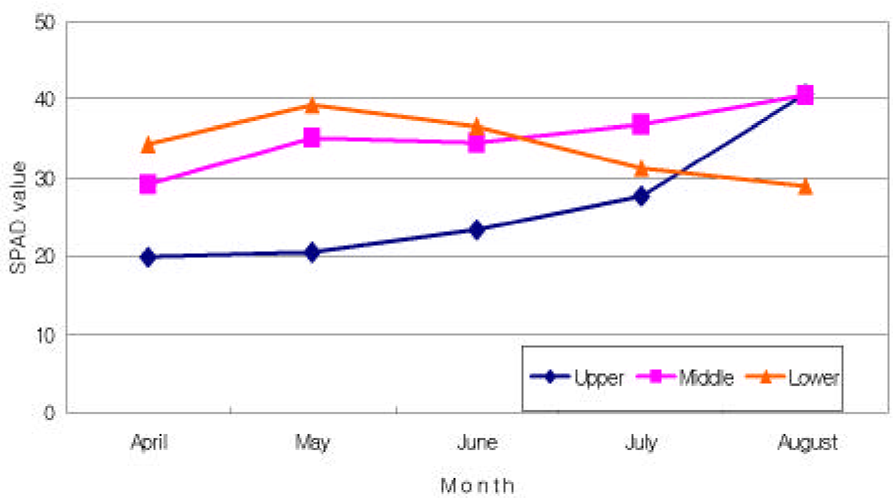

Figure 21. The change of the SPAD value of three different parts of the leave`s after acclimatization in the greenhouse.

3. 기내배양과 환경순화에 따른 식물체의 특성변화

1] 기내배양에서 얻은 식물체의 DNA 변이

많은 식물종들은 조직배양법을 이용하여 증식되었을 때 형태적으로 변이가 일어나거나 염색체의 배수성에 변이가 발견되는 경우가 있다. 김 등(1992)은 부정아의 발생과정을 거쳐 대량증식시킬 경우에 변이체의 발생빈도가 높다고 하였다. 본 연구에서 자생하는 왕벚나무를 조직배양법을 통해 증식하였을 때 동아를 이용하여 줄기를 유도하고 그 줄기로부터 다경줄기를 유도함에 있어 액아로부터 유도된 줄기와 함께 기부의 캘러스 형성과 함께 부정아의 발생빈도가 높다. 따라서 증식된 식물이 유전적으로 안정되어 있다고 단정할 수 없다. 그러므로 조직배양을 통하여 생산된 식물체의 DNA를 추출하여 유전적으로 안정되어 있는지를 확인하고자 하였다. 각 클론의 잎의 채취하여 Genomic DNA를 추출한 후 RAPD 방법을 이용하여 클론간의 DNA의 변이와 모수와 조직배양묘의 DNA의 안정성을 확인하였다. 두 가지 Primer를 이용하여 분석한 결과 주요 Band에서 차이가 없는 것으로 나타나 유전적으로 안정되어 있는 것으로 생각되었으나 앞으로 더 많은 계대배양 후 다양한 Primer를 사용하여 변식체의 변이를 조사할 필요가 있다.

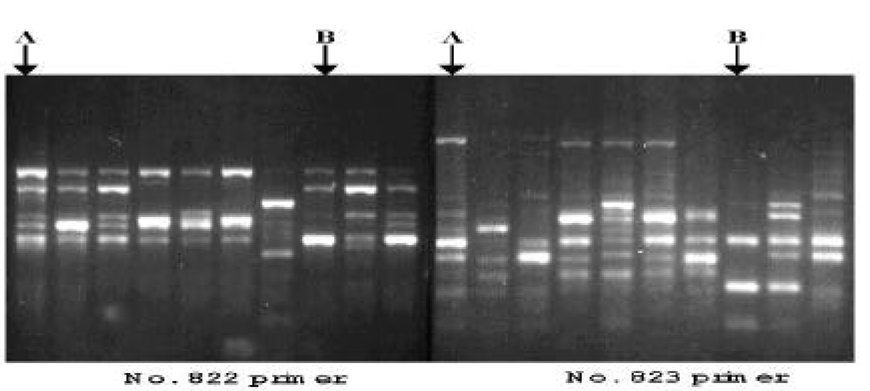

Figure 22. DNA analysis between plants grown in field and *in vitro*

A: Tissue cultured plant, B: Tree grown in field

2] 식물체의 무기원소의 함량비교

식물체 내부에는 식물생장에 필요한 원소들이 존재하는데 이런 무기영양소는 여러 가지 기능을 가지고 있다. 그 중 Ca^{2+}는 세포벽의 구성성분이며, K는 기공에 삼투압을 조절하는 역할을 한다. 삽목의 경우와 같이 삽수에 잎이 존재하면 부정근이나 부정아의 발달을 촉진시킬 수 있다(Hartman *et al.*, 1990). K^+는 잎의 증산 및 호흡기능에 영향을 미치므로 삽목 또는 이식된 식물체의 순화에 중요한 요인이 될 수 있다.

기내에서 증식된 줄기는 건중량과 생중량 비의 상대적인 생장차이와 함께 식물체 내의 무기이온 함량을 비교하였다. 상대생장조사와 같은 방법으로 각기 다른 세 단계의 식물체에서 잎과 줄기내에 K^+와 Ca^{+2}의 함량을 비교하였다 (Table 22).

일반적으로 K^+은 대사활성이 좋은 부분에 많은 양이 존재하는데 엽연령별로 구분할 때 미성숙엽과 노엽에는 함량이 낮고, 성숙엽에는 높은 것으로 알려져 있다. 6주간 기내배양한 식물체 잎의 K^+ 함량은 2.67이며 이로부터 2주간 생

장한 뒤 2.80으로 높아져 다경줄기 유도시 12주에 더 많은 생장을 보인것과 상응하는 결과로 보여진다. 반대로 환경이 바뀐 온실에서 순화된 식물체의 K^+ 함량은 1.97로 낮아졌다.

K^+ 이온이 이동성이 있는 반면 Ca^{2+}는 이동성이 없어 노화된 조직에 많이 축적되게 된다. 그러므로 미성숙엽에서는 함량이 낮으며, 잎의 연령이 증가함에 따라 Ca^{2+}의 양도 증가하게 된다. 배양단계별로 볼 때 Ca^{2+}의 함량은 점점 증가하였으며, 특히 순화된 후의 함량은 기내배양된 식물체에 비해 높게 나타났다. Na^+은 배양단계에 관계없이 비슷한 수준으로 나왔으며, Mg^{2+}은 Ca^{2+}와 비슷한 성질을 가지고 있으며, 함량조사결과 또한 유사하였다. Mn^+은 엽록소에 포함되어 있어 엽록소함량이 높은 곳에 다량으로 존재하게 된다. 따라서 엽록소함량이 높았던 12-0단계와 6-4단계에서 높은 것으로 나타났다.

Table 22. The content of K^+, Ca^{+2}, Na^+, Mg^{2+} and Mn^{2+} of leaves and stems on the different stages of growth.

Tissue	Stage	K^+	Ca^{2+}	Na^+	Mg^{2+}	Mn^{2+}
Leaf	6-0*	2.67	0.28	0.34	1.65	0.18
	12-0	2.80	0.52	0.33	1.84	0.29
	6-4	1.97	1.24	0.30	3.17	0.27
Stem	6-0	2.77	0.26	0.37	11.58	0.09
	8-0	0.15	0.29	0.66	1.04	0.10
	6-4	1.03	1.01	0.50	2.25	0.12
Callus	6-0	1.88	0.22	0.34	1.00	0.13

이(1999)는 자작나무를 경화처리하는 단계에서 엽령이 증가할수록 K^+ 이온과

Ca^{2+} 이온 함량이 증가하며 변화하였는데 Ca^{2+} 이온의 증가량이 많아졌다고 하여 6주간 배양한 것보다는 12주간 배양한 것이 또 그보다 온실에서 순화된 식물의 잎에서 함량이 증가하므로써 유사한 결과를 보였다.

3] 각 단계별 식물체 잎의 해부학적 특성 및 수분 유지 능력

조직배양을 통하여 생산된 식물체는 자연환경에서 자란 유묘와는 생리적으로 다른 특성을 가지고 있어 야외환경에 순화하는데 여러 가지 어려움이 따른다. 가장 현저한 특성의 차이는 수분에 대한 잎과 줄기의 생리적인 상태로서 기내에서 배양된 식물체는 공기 중에서 쉽게 건조하게 된다. 따라서 환경순화시 대기중의 습도는 매우 중요한 요건으로 작용하였으며, 토양내의 수분 또한 기내배양된 줄기의 활착에 큰 영향을 미쳤다. 잎은 기초적으로 광합성을 하는 기관이기 때문에 목본식물의 생장과 발달에 중요한 역할을 한다. 환경조건이 변하거나 배양법이 달라져서 생기는 광합성작용의 변화는 결국 조직의 영양생장과 생식생장에 영향을 미친다. 잎은 탄수화물과 무기영양분을 저장하고 있으며 대부분 목본식물의 수분손실은 잎을 통해서 이루어진다. 잎의 최외의 표면은 비교적 방수성인 층인 큐티클층으로 덮여있다. 이 층은 Wax와 Cutin으로 이루어져 있고, Pectin층에 의해 표피세포에 붙어있다. 큐티클층의 두께는 1㎛ 또는 약 15㎛이하로 다양하다. 큐티클층은 음지에서 자란 식물은 얇은 편이고, 빛에 노출되는 식물은 두꺼우며, 식물종에 따라 큐티클층도 유전적인 차이가 있다. 또한 큐티클층은 외부로부터 균류의 침입을 막는 역할을 하기 때문에 기내에서 자란 식물체 잎의 큐티클층의 발달은 야외조건에 순화하는데 중요한 요인이 된다고 할 수 있다(Kozlowski and Pallardy. 1997). 기내에서 증식된 왕벚나무를 배양토에 심어 온실에서 순화하는 과정동안 잎과 줄기의 생리적인 특성의 변화를 관찰하기 위하여 기내에서 증식중인 어린 식물체의 잎과 줄기 기

내 삽목 후 발근된 식물체의 잎과 줄기 온실에서 순화과정을 거친 식물체의 잎의 엽록소함량(SPAD 502 value)**과 잎과 줄기의 생중량과 건중량을 잰 후 실중량을 비교하고**(Table 23, Table 24), **각 단계의 식물의 잎의 단면 및 기공을 현미경으로 관찰하여 잎의 두께**, **표피의 두께를 측정한 결과** Table 25 **및** Figure 23**과 같이 나타났다**.

Table 23. The dry weight/ fresh weight ratio of shoot cultures at the different stages grown on the different environment.

Culture periods (weeks)[1]	Plant tissue	
	Leaf	Stem
6-0	0.13±0.02	0.12±0.03
12-0	0.24±0.05	0.22±0.06
6-4	0.28±0.01	0.29±0.01

[1] F-B : F - Culture periods *in vitro*, B - Culture periods *ex vitro*

Table 24. The value of SPAD 502 of the leaves in the different stage.

Culture period (weeks)	6-0[1]	12-0[1]	6-4[1]
SPAD value	21.1±5.9b[2]	35.3±7.8a[2]	40.1±10.4a[2]

[1] F-B : F - Culture periods *in vitro*, B - Culture periods *ex vitro*

[2] Means with the same letter are not significantly different at α=0.05

Table 25. Thickness of leaves and epidermis depending on the culture periods.

Culture periods(weeks)[1]	Thickness of leave(㎛)	Thickness of epidermis(㎛)
6-0	6.8±0.9	1.4±0.13
12-0	10.0±0.9	1.9±0.28
6-4	9.4±0.5	2.3±0.25

[1] F-B : F - Culture periods *in vitro*, B - Culture periods *ex vitro*

각 생장단계별로 잎의 엽록소함량을 조사한 결과 환경순화된 후의 잎의 엽록소 함량이 가장 높은 것으로 나타났다. 같은 기내에서도 증식중인 신초와 삽목 후 잎의 엽록소 함량에 큰 차이가 있는 것으로 나타났다. 이들 엽록소의 함량 차이는 비록 같은 배양조건이더라도 기내에서 삽목 한 것이 배양기간이 길어졌기 때문인 것으로 생각되며, 엽록소의 차이가 순화 및 이식 후 활착율에 끼친 영향에 대해서 단정지을 수는 없었다.

각 단계별 잎과 줄기의 생중량에 대한 건중량의 비를 비교한 결과 차이가 있는 것으로 나타났다. 기내에서 배양되고 있는 식물체의 잎과 줄기는 생중량비에 대한 건중량의 비율이 평균 0.12 0.13, 기내에서 새로운 줄기를 생산한 후 발근된 줄기의 실중량비은 평균 0.22 0.24로 새로 형성된 식물체보다는 높은 것으로 나타났으며, 환경순화를 거친 식물체의 잎과 줄기의 실중량비는 0.28 0.29로 앞의 두 단계의 식물체보다 높은 것으로 나타났다. 이는 배양조건 중 기내의 습도가 매우 높기 때문인 것으로 생각되며, 기내 및 기외 삽목 후 활착율의 결과를 보면 기내에서 삽목 한 후 환경순화시 활착율이 매우 높은 것으로 나타났다. 삽목시 삽수에 달린 잎의 수분포텐셜은 발근과 관계가 있으며, 이는 생장과정중에 생리학적으로나 잎과 줄기의 수분함량이 낮은 것이 환

경에 적응하기에 유리한 조건으로 작용할 것으로 생각되며, 활착된 식물체의 잎과 줄기의 실중량비가 높은 것을 볼 때 순화된 후 식물체 내의 수분량은 감소된 것으로 판단된다.

Grout and Aston(1977)과 Shutter and Langhans (1979)는 기내에서 배양된 식물체의 잎은 표면에 wax층이 덜 발달되어 있다고 하였으며, Brainerd 등(1981)과 Fuchigami 등(1981)은 기내배양된 식물체의 엽육세포에 공기층이 많아 기외에 이식한 후에 과다한 증산에 의해 마르고 결국은 죽게 된다고 하였다. 본 실험에서 각 단계별 잎 표면의 큐티클층의 두께를 조사한 결과 각 배양단계별로 차이가 나타났다. 6-0단계와 8-0단계의 식물체 잎의 큐티클층은 측정하기 어려울 정도로 매우 얇게 형성되어 있었으나 순화과정을 거친 식물체의 잎 표면은 큐티클층이 발달되었다. 이는 외부 환경에 적응하면서 잎이 발달하여 두께가 두꺼워지며, 큐티클층이 발달한 것으로 생각된다. Wetzstein과 Sommer(1982)는 *Liquidambar styracifluca* 잎의 큐티클 층을 관찰한 결과 순화 후 식물체의 것이 더 두껍게 발달하였다고 하여 본 연구결과와 같았다. 큐티클 층은 병해를 막는 역할을 하는 것으로도 알려져 있는데 Mexican pepper의 성숙한 과실이 병해에 저항성이 있는 것은 미성숙한 과실의 표면 큐티클층의 두께보다 붉게 익은 과실의 것이 두껍기 때문이라고 하였다(Biles *et al.*, 1993). Gilly 등(1997)은 Ivy를 기외에서 순화하는 동안 잎의 큐티클층은 기내에서 기외로 옮겨진 후 식물의 큐티클층의 생합성이 일시적으로 감소하여 두께가 얇았으나 기외의 어린 잎에 큐티클에 방사능표지가 잘 된 것은 새로운 환경에 적응하기 위해 급속히 활성이 활발해졌기 때문이라고 하였다. 따라서 기내에서 온실로 옮겨진 식물체 잎의 큐티클층은 변화하는데 이는 식물의 환경변화에 대하여 적응하기 위한 방법이며, 중요한 요인으로 작용한다고 할 수 있을 것이다.

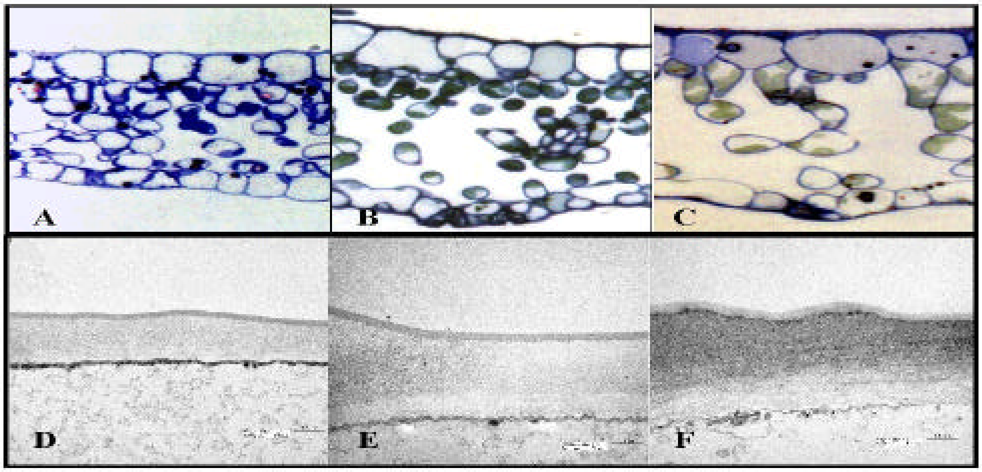

Figure 23. Photographs of cross section of leaves depending on the different culture periods.

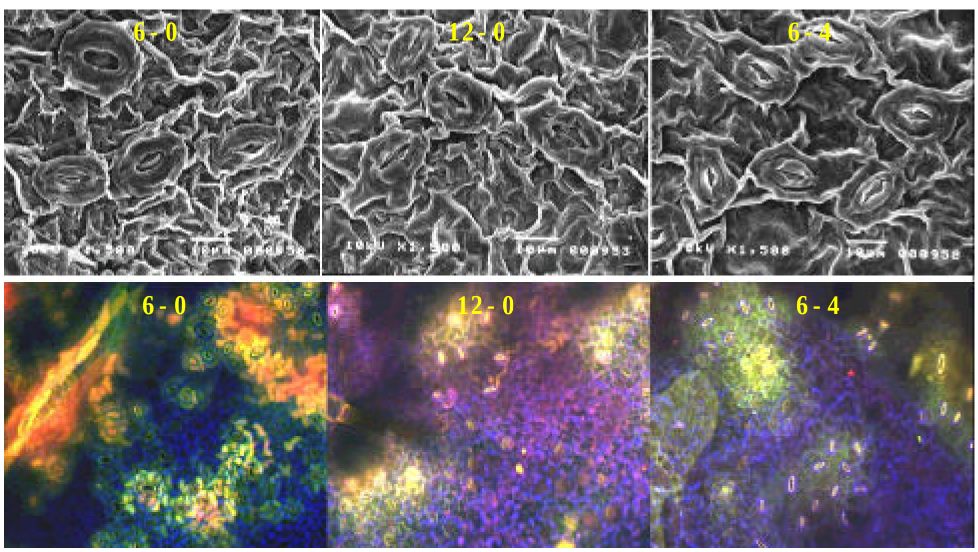

Figure 24. Stoma of leaves depending on the different culture periods

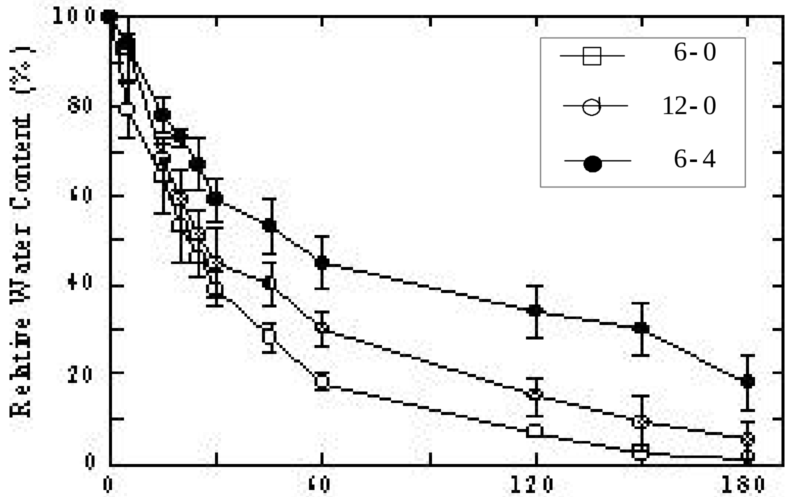

Figure 25. The change relative water content of the detached leaves of the plants among the culture stages and acclimatization.

각 단계별로 잎의 수분유지능력에는 큰 차이를 보였는데 특히 기내에서 6주간 배양된 식물체의 잎과 순화된 잎의 수분유지능력의 차이는 매우 현저하였다(Figure 25). 이는 잎의 해부학적인 특성에서 나타난 바와 같이 순화된 잎은 잎의 두께, 표피세포의 두께, 큐티클 층의 두께가 기내배양된 식물체보다 두껍기 때문인 것으로 생각된다. 기내에서 12주간 배양된 식물체의 잎은 순화된 식물체보다 잎의 연령이 높았으나 수분유지능력이 저조한 것을 고려하면, 잎의 특성이 변화된 것은 잎의 연령이 증가하기 때문이 아니라 식물체가 기내보다 건조한 상태의 외부 환경에 적응하면서 변화된 것으로 판단된다. 따라서 잎의 수분유지능력을 높인다면 외부 환경에서 식물체의 생존율을 높일 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

1. 왕벚나무의 동아는 NH_4NO_3의 농도를 각각 400, 800 및 1,200㎎/ℓ로 달리한 배지에 배양한 결과 각 배지별 개엽율에 약간의 차이가 있었으나 통계적으로 유의성이 없는 것으로 나타났다. 개엽 후 잎과 줄기가 발달하지 않아 정상적인 식물체를 얻기 위해서는 생장조절물질이 필요한 것으로 판단된다. 각 채취시기별 개엽율은 큰 차이가 없었으나 다른 시기에 비해 2월에 채취한 동아에서는 개엽율이 높은 것으로 나타났다. 생장조절물질을 첨가하여 잎을 유도할 때 생장조절물질이 첨가되지 않은 배지와 비교할 때 BAP가 첨가된 배지에서는 각 시기마다 개엽율이 높게 나타났으며, 2월에 채취한 대부분의 동아에서 잎이 발달하였다. 반면 GA_3는 10월에서 1월에 채취한 동아의 개엽에 큰 효과가 없었으나, 2월에 채취한 동아에서 줄기가 형성되었다. BAP와 GA_3를 혼용처리한 결과 잎과 줄기가 함께 발달하여 동아로부터 줄기를 유도하는데 매우 효과적이었다. 10월에 채취한 동아를 저온저장한 후 개엽율은 큰 효과를 나타내지 못했는데 동아를 저온저장하므로써 동아의 분화력이 오히려 상실되는 것으로 나타났으며, 그 시기는 약 2 3주인 것으로 판단된다. 이상의 결과를 볼 때 왕벚나무 동아는 10 1월중에 휴면에 들어가 분화력이 활발하지 못하였으며, 이를 타파하기 위해서는 BAP와 GA_3를 처리하는 것이 효과적이고, 2월에는 분화율이 높아지는 것으로 보아 눈의 휴면이 타파되는 시기로 생각된다.

2. 왕벚나무의 양호한 생장을 위하여 각 배지별로 생장을 측정한 결과 생중량은 MS에서 가장 높았으나 식물의 잎과 생장에 있어 큰 차이는 나타나지

않았으나 Sucrose가 첨가된 것과 그렇지 않은 것의 차이는 현저하였다. BAP와 GA_3를 첨가하여 다경줄기를 유도한 결과 BAP의 농도가 증가할수록 많은 줄기가 생산되었으나 길이가 짧았다. 반면 GA_3를 단독으로 처리하였을 때 줄기는 유도되지 않았고, 뿌리가 유도되어 다른 반응을 보였다. 그러나 BAP와 GA_3를 농도별로 조합한 결과 BAP를 단독으로 처리한 것보다 더 많은 줄기를 얻을 수 있었으며, 줄기의 길이생장도 양호하였다. 두 생장조절물질의 농도비율은 1:10 (BAP : GA_3)으로 저농도 BAP와 고농도 GA_3 조합이었다. 두 생장조절물질이 조합되면서 상승효과가 나타난 것으로 생각되었다. 다경줄기 유도배지에서 배양기간이 길어질수록 형성된 줄기의 수와 길이에 차이가 있었는데 배양 8주째에 줄기의 형성이 가장 활발하였으며, 줄기의 길이생장도 가장 양호하였다. 그러나 12주간 배양된 식물체는 정단부가 노랗게 변하면서 고사하거나 과밀하여 줄기가 가늘어지면서 생장상태가 불량해져 다경줄기 유도의 기간은 대략 4주 이상 8주 이내가 적합하다고 판단된다.

3. 기내배양된 왕벚나무를 정단부와 절간으로 나누어 BAP와 GA_3를 12가지로 조합하여 줄기를 유도한 결과 정단부는 치상한지 2 3일부터 반응을 시작하여 매우 빠른 속도로 생장하여 1 2주 배양기간동안 최초의 생중량보다 최소 41.4 118배가 증가하였다. 한편 절간은 정단부보다 생장이 느렸으며 생중량의 증가시기는 배양 2 3주 사이가 가장 빠르게 나타났고, 배양 4주째에 대부분의 절편에서 줄기가 발생하였으나 배양기간이 길어지면서 유리화 현상이 나타나 절간배양은 고체배지에서 이루어지는 것이 더 적합할 것으로 생각되었다.

4. 기내배양된 줄기에서 형성된 뿌리를 재료로하여 캘러스를 유도한 결과 NAA와 2,4-D 모두 캘러스 유도에는 효과적이었으나 유도된 캘러스의 생장형태가 다르게 나타났으며, 이 두 생장조절물질을 단독으로 처리한 것은 캘러스 형성보다 뿌리가 발생되었으며, Kinetin과 BAP가 첨가된 배지에서는 뿌리발생율이 낮았으며, 2,4-D가 첨가된 배지보다 NAA가 첨가된 배지에서 캘러스의 생장이 양호하였다. 유도된 캘러스를 증식하는데 Sucrose의 농도에 따라 생장을 조사한 결과 30㎎/ℓ의 농도에서 가장 생장이 왕성하였고, Sucrose가 첨가되지 않거나 50㎎/ℓ이상의 높은 농도로 처리되었을 때 높은 삼투압으로 인해 갈변 고사하였다. 증식된 캘러스로부터 줄기를 유도하기 위하여 대조구를 포함 19가지의 배지에 치상한 결과 Zeatin, GA_3 등 생장조절물질이 단독으로 처리된 배지에서는 줄기가 유도되지 않았으며, BAP가 첨가된 배지에서는 잎이 발달하였으나 비정상적인 형태를 하고 있었다. 그러나 BAP와 GA_3가 조합된 배지에서 줄기 분화되었는데, 그 조합은 다경줄기를 유도하기 위해 사용되었던 조합과 그의 1/2 농도로 왕벚나무의 기내배양시 BAP와 GA_3는 항상 혼용되어 상승효과를 나타내는 특징을 보였다. 형성된 줄기의 수는 1/2농도인 BAP 0.2㎎/ℓ, GA_3 2.0㎎/ℓ에서 많아 줄기로부터 기관유도할 때보다 비교적 낮은 농도에서 많은 줄기가 유도 되었다.

5. 다섯 가지 배지에서 뿌리를 유도한 결과 Sucrose가 첨가되지 않은 배지에서는 발근되지 않았으며, 2%의 Sucrose가 첨가된 배지에서는 55.6 67.4%로 큰 차이를 보이지 않았으며, 통계적으로 유의성이 인정되지 않았다. 대부분의 배지에서 뿌리가 발생함과 동시에 캘러스의 형성도 관찰되었다. 배지 중 MS배지에서 캘러스 형성율이 높았으며, WPM배지에서는 캘러

스 형성율이 낮았다. 왕벚나무 기내 식물체는 Sucrose 농도에 따라 발근율이 다르게 나타났다. Sucrose의 농도가 높아질수록 발근율은 높아졌으며 5%가 첨가된 배지에서는 90.9%로 가장 높았으며, Sucrose가 3% 이상 첨가된 배지에서 86%로 높게 나타났다. 그러나 Sucrose의 농도가 높아질수록 캘러스의 형성율도 높아지는 경향이 나타났다. IBA와 NAA를 농도별로 처리하여 발근율을 조사한 결과 IBA 1.0㎎/ℓ 첨가된 배지에서 가장 높은 발근율을 보였으나 캘러스 형성율이 높았고 NAA는 0.5㎎/ℓ의 농도에서 높았으나 농도가 높아질수록 발근율이 오히려 낮아졌고 캘러스 형성율이 높아져 발근을 촉진하기 위한 처리로는 부적합하였다.

6. 기내에서 배양된 줄기 중 기부에 캘러스가 있는 것과 없는 것을 구분하여 한천배지가 아닌 배양토에 삽목하여 발근에 미치는 영향을 조사한 결과 모든 배양토에서 기부에 캘러스가 없는 줄기의 발근율이 높았으며, 배양토 중에는 Peatmoss, Vermiculite, Perlite가 동량으로 혼합된 토양에서 59.5%로 높았으며, 모래가 섞인 배양토에서 발근율이 42%로 가장 낮게 나타났다. 발근된 식물체를 세 가지 배양토에 이식한 후 온실에서 순화한 후 활착율을 조사한 결과 캘러스가 없고 발근되었던 식물체는 배양토의 종류에 관계없이 90 100% 활착되었으나 캘러스가 있고 발근된 개체는 73.3 75.0%로 나타났고, 특히 모래가 섞인 토양에서는 45.5%로 낮게 나타나 기내와 마찬가지로 모래토양은 왕벚나무가 발근하는데 적합하지 않은 것으로 생각되었다. 기내에서 발근되지 않았던 식물체들은 캘러스가 존재하는 것과는 무관하게 활착율이 낮았는데 이는 각 식물체의 생리적인 상태가 다르기 때문인 것으로 생각된다.

7. 기내배양된 줄기를 캘러스가 있거나 혹은 없는 상태로 나누어 온실에 직접 삽목 한 결과 캘러스가 없는 줄기는 29.2%, 캘러스가 있는 것이 16.1%로 나타났으며, 배양토의 종류 중 Peatmoss, Vermiculite, Perlite가 동량으로 혼합된 토양에서 가장 높게 나타나 기내삽목과 같은 결과를 보였다. 또한 삽목 시기별 활착율에 차이가 나타나 6, 7, 8월보다는 9월에 삽목한 것의 활착율이 높게 나타났다. 기외삽목은 기내삽목에 비해 발근 및 활착율이 낮게 나타났는데 이는 식물체 주위 습도와 같은 환경이 다르기 때문인 것으로 생각된다. 기내에서 발근된 식물체를 이식할 때 삽목과 같이 6, 7, 8,월보다 9월에 이식한 것의 활착율이 높게 나타났다.

8. 환경순화 과정을 거쳐 활착된 왕벚나무의 생장을 조사한 결과 전년지의 길이는 4 5월 사이가 가장 많은 생장을 하였으며, 신초는 5 6월사이에 생장이 가장 왕성하였다. 근원경의 직경은 4 6월사이에 많이 증가하였으며, 7, 8월이 지나면서 생장속도가 현저히 감소하였다. 상단부 잎의 엽록소 함량은 점점 높아져 7, 8월에는 중, 하단부의 잎의 엽록소의 함량과 비슷해졌으며, 하단부의 잎은 7월부터 낙엽이 시작되고 엽록소의 함량이 줄어들었으며, 왕벚나무가 낙엽시기는 야외보다 빠른 것으로 나타났다.

9. 조직배양으로 얻어진 식물체의 변화된 특성을 조사한 결과 두 개의 Primer를 이용하여 PCR을 한 결과 변이가 없는 것으로 나타났으며, 배양기간 및 환경순화에 따라서 잎의 엽록소 함량, 생중량에 대한 건중량비, 잎의 단면 및 무기이온의 함량을 조사한 결과 배양기간이 길어질수록 엽록소의 함량은 높아졌으며, 생중량에 대한 건중량비도 높아져 식물체내 수분함량이 줄어드는 것으로 나타났고, 잎의 단면 중 잎의 두께 및 큐티클 층이 점점 두꺼워

지는 것으로 나타났다. 잎과 줄기내의 무기이온의 함량 중 K^{+}는 기내에서는 점점 높아졌으나 외부에 순화과정동안 낮아졌고, Ca^{2+}의 함량은 높아지는 경향이었다.

참 고 문 헌

김원규, 백기엽, 정근식, 정재동, 최광태. 1992. **식물조직배양 기술**. **향문사**. pp 358.

酒谷 昌孝. 1989. **サクラ, 木本植物の增殖と育種**. pp125 151.

Ahuja M. R. 1984. A commercially feasible micropropagation methods for aspen. Silvae Genetica 33: 4 5.

Ahuja M. R. 1987. *In vitro* propagation of poplar and aspen. In: Bonga, J.M. and D. J. Durzan des. Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol. Martinus, Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster.

Ahuja M. R. and H. J. Muhs. 1985. *In vitro* techniques in clonal propagation of forest tree species. *In vitro* techniques propagation and long term storage. Schäfer-Menuhr A(Ed). Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk publishers, pp 41 49.

Almehdi A. A. and D. E. Parfitt, 1986. *In vitro* propagation of peach 1. Propagation of Lovell and Nemaguard peach rootstocks. Fruit Var J. 40: 12 17.

Badenes M. L., M. J. Asins E. A., Carbonell and G. Glacer, 1996. Genetic diversity in apricot, *Prunus armeniaca*, aimed at improving resistance to plum pox virus. Plant Breeding 115: 133 139.

Bailey L. H. and E. Z. Bailey, 1976. *Prunus* L. A Concise Dictionary of Plants Cultivated in the United States and Canada. Macmillan

Publishing Company. New York. pp 918 921.

Barocka K. H., M. Baus, E. Lontke, and F. Sievert. 1985. Tissue culture as a tool for *in vitro*-mass-propagation of aspen. Z. Pflanzuchtung 94: 340 343.

Biles C. L., M. W. Marisa, W. Mark, and H. Palmer. 1993. Relationship of pytophthora fruit rot to fruit maturation and cuticle thickness of new mexican-type peppers. Physiology and Biochemistry 83: 607 611.

Bjarnason E. N., B. C. Hanger, J. R. Moran and J. A. Cooper. 1985. Production of *Prunus* necrotic ringspot virus free roses by heat treatment and tissue culture. N.Z. Agric Res 28: 151 156.

Bonga J. M. 1977. Organogenesis in *in vitro* cultures of embyonic shoots of *Abies balsamea* (blasam fir). *In Vitro* 13: 41 48.

Bonga J. M. 1980. Plant propagation through tissue culture, emphasizing woody species. Plant Cell Culture; Results and perspectives. F. Sala, B. Parisi, R. Cella and O. Ciferri (Ed.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press pp 253 264.

Bonga J. M. 1997. The effect of collection date and frozen storage on the formation of embryo-like structures and elongating shoots from explants from mature *Larix decidua* and *L. eurolepis*. Plant Cell Tissue and Organ culture 51(3) : 195 200.

Borkowska B. 1983. Micropropagation of sour cherry cultivar Schattenmorelle. Fruit Sci. Rep. 10(2): 59 66.

Boxus P. 1971. La culture (de) meristemes de *Prunus* pour l'obtention de plants sains. Acta Hortic. 44: 43 45.

Boxus P. and M. Quoirin. 1974. La culture de meristemes apicaux de quelques especes de *Prunus*. Bull. Soc. R. Bot. Belg 107:91 101.

Boxus P. and M. Quoirin. 1977. Comportement en pepiniere d'arbres fruitieres issus de culture *in vitro*. Acta Hortic 78: 373 379.

Boxus P. and P. Druart. 1986. Virus-free trees through tissue culture. In Bajaj YPS (ed.) Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 1: Trees I. Springer, New York, pp 24-30.

Brainerd, K. E., L. H. Fuchigami, S. Kwiatkowski, and C. S. Clark. 1981. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured 'Pixy' plum grown under different environments. HortScience 16:173 175.

Broquedis M. 1998. Comparison of the contents of starch, soluble carbohydrates and abscisic acid of latent buds and internodes during the vegetative cycle of grapevine(French). Vitis 37(1): 5 10.

Campbell R. A. and D. J. Durzan, 1975. Induction of multiple buds and needles in tissue culture of Picea glauca. Can. J. Bot. 53: 1652 1657.

Chalupa V. 1977. the use of regenerants from tissue culture of forest trees in tree breeding. in: Use of Tissue Culture in Plant Breeding. Czech. Acad. Sci. Prague.

Chalupa V. 1987. European Hardwoods. In: Bonga, J. M. and D. J. Durzan (ed.) Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol. 3 Martinus, Nijhoff Publishers, Dordrechet, Boston, Lancaster.

Chang S. S. J. J. Lee, J. S. Lee and S. K. Lee, 1989. Shoot formation and callus culture from internodal disk of *Populus koreana* × *P. nigra* var. *italica*. Res. Rep. Inst. For. Gen. Korea 25: 136 141.

Cheong E. J. and J. S. Yi, 1997. *In vitro* Plant multiplication from axillary buds of *Populus davidiana* Dode. J. Kor. For. Soc. 86: 128 134.

Choi W. Y., B. S. Lee, K. J. Lee, H. K. Chung, S. K. Lee and S. Y. Shim, 1988. Gene transfer into *Pinus densiflora* and *Quercus acutissima* by *Agrobacterium tumafaciens*. Res. Rep. Inst. For. Gen. Korea. 24: 121 126

Chun Y. W. and R. B. Hall, 1984. Survival and early grown of *Populus alba*×*P. grandidentata in vitro* culture plantlets in soil. J. Kor. For. Soc. 66: 1 7.

Coffin R., C. D. Taper and C. Cheng. 1976. Sorbitol and sucrose as carbon source for callus culture of some species of *Rosacea*. Can. J. Bot. 54: 547 551.

Cronquist A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York. 1262pp.

Deogratias J. M., A. Lutz and F. Dosba. 1986. Microgreffage d'apex de cerisiers (*Prunus avium* L.) multilies *in vitro* en vue de l'elimination de trois types de particules virales (CLSV, PDV et NRSV). Fruits 41: 675 680.

Druart P. 1980. Plantlet regeneration from root callus of different

Prunus species. Sci Hortic 12: 339 342.

Druart P. 1981. Embryogenese somatique et obtention de plantules chez *Prunus Incisa* × *serrula* cultive *in vitro*. Bull. Rech. Agron Gembloux 16: 205 253.

Druart P. 1985. Regulation of axillary branching micropropagation of woody fruit species. In: Symp. Veg. Prop. Woody Spec. Pisa, Sept.

Druart P. 1988. Regulation of axillary branching in micropropagation of woody fruit species. Acta Hortic. 227: 369 380.

Druart P. 1992. *In vitro* culture and micropropagation of Plum (*Prunus* spp.) In: Biothechnology in Agriculture and Forest 18.

Druart P. and P. Boxus, 1985. Comportement de varietes fruities autoenracienes par culture *in vitro*; premieres observations. Fruit Belg. 411: 194 197.

Eggens J. L. and C. P. M Wright. 1985. Nitrogen effects on monostands and polystrands of annual bluegrass and creeping bentgrass. HortScience. 20: 109 110.

Fuchigami L. H., T. Y. Cheng and A. Soeldner. 1981. Abaxial transpiration and water loss in aseptically cultured plum. J. Am, Soc. Hortic Sci. 106(4): 519 522.

Gamborg O.L., R. A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 151 158.

Gilly C. R. Rohr R. and A. A. Chamel. 1997. Ultrasturcture and radiolabelling of leaf cuticles from ivy (*Hedera helix* L.) plants *in* *vitro* and during *ex vitro* acclimation. Annals of Botany 80: 139 145.

Gresshoff P. M. and C. H. Doy, 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). Planta 107: 161 170.

Grout, B. W. and M. J. Aston. 1977. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. water loss and transfer related to changes in leaf wax and xylem regeneration. Hort. Res. 17: 1 7.

Hammerschlag F. A. 1982. Factors affecting establishment and growth of peach shoots *in vitro*. HortScience 17: 85 86.

Hammerschlag F. A. 1983. The effect of low temperature storage and phenolic compounds on *in vitro* multiplication and rooting of the plum rootstock Myrobalan. HortScience 18(2): 166 (Abstr.)

Hammerschlag F. A. and R. Scorza. 1987. Performance of *in vitro* propagated, own-rooted peaches under field conditions. HortScience 22: 1067

Hammerschlag F. A., G. R. Bauchan and R. Scorza, 1987. Factors influencing *in vitro* multiplication and rooting of peach cultivars. Plant Cell Tissue Organ Culture. 8: 235 242.

Harn C. Y. and M. Z,. Kim, 1972. Induction of callus from anthers of *Prunus americana*. Korean J. Breeding. 4: 49 53.

Hartmann H. T and D. E. Kester 1983. Plant Propagation. Prentice-hall, Englewood Cliffs, NJ. pp727.

Hartmann H. T., D. E. Kester and Jr. F. T. Davies. 1990. Plant Propagation. Prentice-Hall, Inc. New Jersey pp. 199 255.

Hotta M., K. Ogata, A. Nitta, K. Hosikawa, M. Yanagi and K. Yamazaki. 1989. *Prunus* L. Useful plant of the world. Heibonsha Ltd. Publishers. pp 854 867.

Hurby K. 1962. Hybrids from extirpated embryos. Genetic 19: 531 534.

Hyun S. K., J. H. Kim, E. W. Noh and J. I. Park, 1996. Papers on Forest Biotechnology Published by the Forest Genetics Research Institute. Noh E. R., Y. Youn, Y. J. Kwon, H. K. Moon, Y. W. Kim and Y. I. Choi (ed.) Forest Genetics Research Institute Suwon Korea.

Ivanicka J and A. Morkra. 1982. Development and cultivation of early-ripening cherry embryos Bilogia 43: 3 12.

Ivanicka J. and A. Pretova, 1986. Cherry (*Prunus avium* L.) In: Bajaj Y. P. S (ed.) Biotchnology in Agriculture and Forestry, Vol. 1: Trees I, Springer, Berlin. pp 154 169.

James D. J., S. Uratsu, J. Cheng, P. Negri, P. Viss and A. M. Dandekar, 1993. Acetosyringone and osmoprotectants like betaine or proline synersistically enhance Agrobacterium-mediated transformation of apple. Plant Cell Rep. 12: 559 563.

Jona R. and R. Vigliocco. 1985. Axillary bud culture of peach. Acta Hortic 173: 223 228.

Jones O. P. and M. E. Hopgood. 1979. The successful propagation *in vitro* of two rootstocks of *Prunus*. The plum rootstock Pixy (*P.*

institia) and the cherry F12/1 (*P. avium*). J. Hortic Sci. 54: 63 66.

Kim C. S. 1998. Distribution and taxonomic study of *Prunus yedoensis* Matsumura (Rosaceae). Ph. D. Dissertation of Cheju Natl. Univ.

Kim C. S., J. K. Koha and R. M. Cho. 1993. Effects of media, growth regulators and dark treatment on *in vitro* propagation using vegetative buds of *Prunus yedoensis* Matsumura. Kor. Soc. Plant Tiss. Cult. 20: 213 219.

Kim J. H. and J. I. Park. 1987. Shoot formation in culture of mature *Pinus densiflora*. Res. Rep. Inst. For. Gen. Korea 23: 123 127.

Kim J. H., J. I. Park, B. S. Lee, S. K. Lee and S. Y. Shim, 1989. Gene transformation of *Populus Koreana* by *Agrobacterium tumafaciens*. Res. Rep. Inst. For. Gen. Korea. 25: 117 122.

Kim Y. W., E. W. Noh, Y. Youn and E. R. Noh, 1995. Genetic transformation of *Populus nigra* using *Agrobacterium tumafaciens* LBA 4404/pBKS-1. Res. Rep. Inst. For. Gen. Korea. 31: 160 166.

Kobayashi K., L. H. Fuchigami and K. E. Brainerd. 1981. Ethylene and ethane production and electrolyte leakage of water-stressed Pixy plum leaves. HortScience 16(1): 57 59.

Koh J. K., S. J. Oh, E. S. Kim, M. H. Kim and S. C. Koh. 1998. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryo of *Prunus yedoensis* in Mt. Halla. Korean J. Plant Res. 11: 9 14.

Koh J. K., Y. C. Park, D. Y. Yang, E. S. Kim, M. Y. Oh, and S. C.

Koh. 1997. Plant regeneration and somatic embryogenesis from zygotic embryo-derived callus of native *Prunus yedoensis* in Mt. Halla. Kor. Soc. Plant Tissue Culture 24: 345 349.

Kozlowski and Pallardy. 1997. Physiology of Woody Plants. 2nd Ed. Academic press. pp 411.

Lee B. C., S. C. Kim and H. M. Kwon, 1989. In; *In vitro* propagation of a rare species, *Forsythia koreana* for. *aureoreticulata* and *Salix hallasanensis*. Res. Rep. Inst. For. Gen. Korea.31: 129 133.

Lee B. C., S. C. Kim and H. M. Kwon. 1995. *In vitro* propagation of a rare species, *Forsythia koreana* for. *aureorticulata* and *Salix hallasanesis*. Res. Rep. Inst. For. Gen. Korea 31: 129 133.

Lee B. C., S. K. Lee and J. H. Kim. 1987. *In vitro* mass-propagation of *Lagerstroemia indica* for. *alba* Rehder. Res. Rep. Inst. For. Gen. Korea. 23:128 131.

Lee J. S. and C. M. Kim, 1987. Effect of culture media and growth regulators on callus culture in *Quercus* species. Res. Rep. Agri. Sci. Tech. Chungnam Nat'l Univ., Korea. 14(2): 213 231.

Lee M. B. 1999. Effects of light on the acclimation of containerized seedlings of *Betula platyphylla* var. *japonica*. Ph D. Dissertation of Kunkook Univ. pp 92.

Lloyd G. B. and H. 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.

Mabberley D. J. 1987. *Prunus* L. The Plant-Book, A Portable Dictionary of the Higher Plants. Cambridge University Press, Cambridge pp 478 479.

Machado M .L., A. C. Machado, V. Hanzer, H. Weiss, F. Regner, H. Steinkerller, D. Mattanovich, R. Plail, E. Knapp, B. Kalthoff and H. Katinger. 1992. Regeneration of transgenic plants of *Prunus armeniaca*, containing the coat protein gene of Plum pox virus. Plant Cell Reports 11: 25 29.

Mante S., R. Scorza and J. M. Cordts. 1989. Plant regeneration from cotyledons of *Prunus persica*, *Prunus domestica*, and *Prunus cerasus*. Plant Cell Tissue and Organ culture. 19: 1 11.

Marino G., P. Rossati and F. Sagrati. 1985. Storage of *in vitro* culture of *Prunus* rootstock. Plant Cell Tissue Org Cult. 5(1): 73 78.

Mathes M. C. 1964. The culture of isolated triploid aspen tissue. For. Sci. 10: 35 38.

Minotta G. 1981. Recerche sull' impiego di differente carboidrati nei substratidi micropropagazion del susino. Riv. Ortoflorofrutt It 65: 343 352.

Moon H. K., Y. H. Park, K. Y. Lee and W. W. Kim, 1987. Rooted cuttings of *Quercus acutissima* by rooting substances and cutting media. Res. Rep. Inst. For. Gen. Korea 23: 38 46.

Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 : 493 497.

Noh E. R., S. K. Lee, Y. B. Koo and K. H. Chung, 1988. A mass propagation method of aspen (*Populus davidiana* Dode) using tissue culture and juvenile cutting techniques. Res. Rep. Inst. For. Gen. Korea. 24: 20 27.

Okimura, Y. 1961. Studies on the cuttings of pine. J. Jap. Forest. Soc. 43: 272 276.

Ostry M. E. and D. D. Skilling. 1988. Somatic variation in resistances to *Septoria musiva*. Plant Disease 72: 724 727.

Park M. K. 1965. A historical survey on the *Prunus yedoensis* in Korea. Korean J. Bot. 8: 12 15

Park Y. G. and S. H. Son. 1988. *In vitro* organogensis and somatic embryogenesis from punctured leaf of *Populus nigra* ×*P. maximowiczii*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 15: 95 105.

Pierik R. L. M., 1987. *In Vitro* Culture of Higher Plants. Nijhoff, Dordrecht. pp 36 132.

Quoirin M., P. Lepoivre and P. Boxus. 1977. Un premier bilan 10 annees de recherches sur les cultures de meristemes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. Compte Rendu des recherches, Station des cultures fritieres et maracheres, Gembloux, Belg, 1976-1977 et rapports de synthese, pp 93 117.

Ramming D. W. 1985. In ovulo embryo culture of early-maturing *Prunus*. HortScience 20(3): 419 420.

Ranjit, M., D. E. Kester and W. C. Micke. 1988. Micropropagation of cherry rootstocks: Response to culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 113: 146 149.

Reeves D. W., B. D. Horton, G. A. Couvillon. 1983. Effect of media and media pH on *in vitro* propagation of Nemaguard peach rootstock. Sci. Hortic. 21:353 357.

Rinne P., H. Tuominen, and O. Juntilla. 1994. Seasonal changes in bud dormancy in relation to bud morphoology, water and starch content, and abscisic acid concentration in adult trees of *Butula pubescens*. Tree Physiol. 14:549 561.

Rosati P., F. Marino and C. Swerczewsiki, 1980. *In vitro* propagation of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl. cv. Calita). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105: 126 129.

Ruzic D. R. and R. Cerovic. 1985. The effect of plant growth regulators on the rooting phase of plum cv. Pozegaca by tissue culture method *in vitro*. Jug Voc 19, 73- 74; 383 388.

Scorza R., L. Levy, V. Damsteegt, L. M. Yepes, J. Cordts, A. Hadidi, J. Slightom and D. Gonsalves. 1995. Transformation of plum with the papaya ringspot virus coat protein gene and reaction of transgenic plants to plum pox virus. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120(6): 943 952.

Seirlis G., A. Mouras and G. Salesses, 1979. *In vitro* culture of anthers and organ fragments of *Prunus*. Ann. Amelior Plant 29: 145 161.

Skirvin R. M. 1980. Fruit Crops In: Conger BV (ed.) Cloning Agricultural Plants Via *in Vitro* Techniques. CRC Press. Boca Raton, pp. 51 140.

Snir I. 1982. *In vitro* propagation of sweet cherry cultivars Hortic Sci. 17: 192 193.

Sommer H. E. and L. S. Caldas. 1981. *In Vitro* Methods Applied to Forest Trees. Academic Press Inc. pp 349 358.

Son S. H. 1991. *In vitro* culture systems of hybrid aspen as tools for tree improvement programs and commercial applications. Ph. D. Dissertation of Iowa Stat University Ames, Iowa.

Son S. H. and R. B. Hall. 1990. Multiple shoot regeneration from root organ cultures of *Populus alba×P. grandidentata*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 20: 53 57.

Son S. H. and R. B. Hall. 1993. Polyterra peat plug system for commercial scale acclimatization of in vitro shoot cultures of hybrid aspen (*Populus alba* L.×*P. glandidentata* Michx.). Korean J. Breed 25:179 183.

Song W. S., S. D. Oh, I. H. Park and S. O. You, 1991. *In vitro* propagation of *Zanthoxylum piperitum* DC.) I. Somatic embryogenesis and plant regeneration. Korean J. Plant Tissue Culture 18: 17 25.

Sutter E. G. and M. Hutzell. 1984. Use of humidity tents and anti-transpirants in the acclimatization of tissue-culture plants to the greenhouse. Scientia Hortculture 23: 303 312.

Taylor B. and A. Powell, 1982. Isolation of plant DNA and RNA. Focus 4: 4 6.

Tiziana A., P. Lauri and C. Damiano. 1995. Agrobacterium-mediated transformation of almond leaf pieces. Plant Cell Reports 14: 267 272.

Tricoli D. M. 1982. *In vitro* propagation of *Prunus serotina*. Proc. of 28th North Eastern Tree Improvement conference Durham, New Hampshire, July 7 9.

Tricoli D. M., C. A. Maynard and A. P. Drew. 1985. Tissue culture of propagation of mature trees of *Prunus serotina* Ehrh. I. Establishment, multiplication, and rooting *in vitro*. Forest Sci. 31: 201 208.

Tukey H. B. Artificial culture of abortive cherry embryos. J. Hered 24: 7 12.

Wann S. R. and D. W. Einspahr. 1986. Reliable plantlet formation from seedling explants of *Populus tremuloides* (Michx.). Silvae Genetica 35: 19 24.

Wann S. R., G. W. Wyckoff and J. L. Wyckoff. 1988. A tissue culture solution to a forest problem-the propagation of a tetraploid European aspen. Tree Planter Notes 39: 28 30.

Wetzstein H. Y. and H. E. Sommer, 1982. Leaf anatomy of tissue -cultured *Liquidambar styraciflua* (*Hamamelidaceae*) during acclimization Amer. J. Bot. 69(10) : 1579 1586.

Yenikev K. K., V. A. Vysotsky and G. A. Plotnikova. 1984. Peculiarities of *in vivo* an *in vitro* development of cherry embryos isolated in early stages of embryogenesis. Sel'skokhoz Biol 11: 46 48.

Youn Y., S. K. Lee, and J. I. Park. 1992. *In vitro* propagation of a rare species-*Berchemia berchemiaefolia*. Res. Rep. For. Gen. Res. Inst. Korea 28: 63 67.

Zdrujkovskaja-Richter A. I. 1983. *In vitro* culture of excised embryos and ovules of *Cerasus avium* Moench. In: Erdelska O. (ed.) Fertilization and embryogenesis in ovulated plants. Proc 7th Int. Cytoembryol Symp, High Tetra, June 14 17, pp 311 315.

Zimmerman R. H. and I. Fordham, 1985. Simple methods for rooting apple cultivars *in vitro*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110(1); 34 38.

Zuccherelli G, V. Venturi and C. Damiano, 1978. Rapid propagation on a vast scale of Damasco 1869 rootstock by *in vitro* culture. In: Round-Table Conf. *In vitro* multiplication of woody species, Gembloux, Belg, June 6-8, pp 269 282.

제주산 왕벚나무(*Prunus yedoensis* Matsumura)의 기내배양을 통한 대량증식기술에 관한 연구

정 은 주

강원대학교 대학원 임학과

왕벚나무(*Prunus yedoensis* Matsumura)는 꽃이 아름답고, 공해에 견디는 힘이 강해 조경수로 각광을 받고 있으며, 대경목 생산이 가능하여 가구재, 선박재 등 용재로서 이용가치가 높은 유망한 수종이나 현재 대부분 가로수로 식재되어 있다. 가로수로 식재된 왕벚나무는 단일영양계로 추정되며, 뚜렷한 변이특성을 알지 못한채 보급되고 있는 실정이다. 반면 제주에 자생하는 왕벚나무는 꽃의 형태 및 색깔 등 개화형질에서 다양한 변이를 보유하고 있어, 우수한 개체를 선발하고 증식할 필요가 있다. 그러나 자생 왕벚나무는 노령목일뿐만 아니라 충분한 증식재료 확보에 어려움이 있으며, 개체수 또한 적어 유전자원 보존을 위해서도 대량증식방법을 구명해야 할 것이다. 따라서 본 연구는 조직배양법을 이용하여 유용한 왕벚나무 자원을 대량증식하고자 기내배양법, 삽목 및 환경순화에 영향하는 요인들을 구명하였다.

동아로부터 줄기 유도시 NH_4NO_3의 농도, BAP, GA_3, IBA의 농도 및 채취시기에 따른 여러 요인에 따라 잎의 전개 및 줄기유도에 영향을 미쳤다. BAP와 GA_3 처리시 잎의 전개율이 높아졌으며, 전혀 효과가 없었던 IBA 처리를 제외한 모든 처리구에서 2월에 채취한 동아에서 줄기 유도율이 높은 것으로 나타났다. 동아로부터 유도된 줄기를 이용한 다경줄기 유도에는 BAP와 GA_3를 혼용처리할 때 가장 효과적이었으며, 배양 4 8주 사이에 평균 15.4 39.5개

의 줄기를 생산하였다. 액체배양을 통하여 정단부를 이용하여 다경줄기를 유도할 때 2주간 44 118배의 생장량을 보여 대량증식이 가능하였다. 뿌리를 이용한 캘러스 배양 결과 Sucrose가 3% 첨가된 배지에서 생장이 가장 양호하였으며, BAP와 GA_3가 첨가된 배지에서 줄기재생이 가능하였다.

기내에서 증식된 줄기로부터 발근유도시 sucrose의 농도에 영향을 받았으며, 오옥신은 종류 및 농도에 따라 발근율이 상이하였다. 또한 한천배지가 아닌 배양토에 직접 발근을 유도한 경우 Peatmoss, Perlite, Vermiculite를 동량으로 혼합한 토양에서 캘러스가 없는 줄기가 높은 발근율을 보여 왕벚나무의 발근은 용이한 것으로 판단되었다.

기내배양된 줄기를 온실에서 직접 삽목하거나 발근 후 이식하였을 때 삽목활착율은 삽목시기와 배양토에 영향을 받아 Peatmoss, Perlite, Vermiculite를 동량으로 혼합한 토양에서 9월에 삽목할 때 가장 높게 나타났다. 발근된 식물체의 활착율은 9월에 일반상토에서 활착율이 높았으며, 한천배지에서 발근된 식물체보다 배양토에서 발근된 식물체의 활착율이 높게 나타났다. 순화 후 일반 토양에 이식된 유묘는 4월 6월 동안 생장이 가장 활발하였으며, 8월 9월 사이에 생장량이 감소하였으나 생장이 양호하였다.

기내배양을 통해 증식된 식물체들의 배양시기 및 환경순화에 따른 특성을 조사한 결과 모수와 번식체 간의 DNA는 PCR을 이용하여 조사한 결과 차이를 보이지 않았으며, 엽록소의 함량, 무기이온의 함량 등에 차이가 나타났으며, 특히 순화과정 후에 잎의 두께와 표피세포 및 큐티클층의 두께가 두꺼워진 것으로 나타났다. 또한 기내식물체와 순화된 식물체의 잎의 수분유지능력에 차이가 있어 식물체의 수분유지능력이 순화에 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

이상 본 연구를 통하여 왕벚나무의 기내배양을 이용하여 대량증식체계를 확립하고, 식물체 생산에 영향하는 여러 가지 요인을 구명하였다.

A Study on Mass Propagation of *Prunus yedoensis* Matsumura from Cheju Using *In Vitro* Culture Technique

Cheong, Eun Ju

Department of Forestry
Graduate School, Kangwon National University

Summary

Prunus yedoensis Matsumura is popular as ornamental species because it has not only beautiful flowers but also tolerance to various pollutants in the cities. This species has straight and tall stem which is available for furniture or ship. Most of them, however, were planted at the road side in Korea. They were supposed to be originated from a clone. There is no much information about their variation. However, *Prunus yedoensis* growing in Mt. Halla has various unique characteristics of flower color, blooming time and etc. We need to select good trees and propagate for conservation of genetic resources. Most of trees in Mt. Halla are too old to propagate by clonal propagation methods such as cutting. This study was performed to investigate the mass propagation method using *in vitro* culture techniques.

1. *In vitro* culture system was established using winter buds growing in Mt. Halla. They were collected every month from October to February and cultured on the media that were modified in the concentrations of NH_4NO_3 from WPM medium. The bud flushing rate showed slightly different among the media and collecting time. After leaf flushing, shoots did not develop from the buds. BAP was more effective to flush leaves than GA_3 and IBA. The winter buds collected on February showed good responses on the media. Shoots were directly developed from the winter buds on the medium supplemented with BAP and GA_3. The buds stored at 4℃ for several weeks showed poor response. The ability of organogenesis of the buds was reduced gradually with the storage period.

2. Five media were tested for growth of *P. yedoensis*. Fresh weight of the shoots on the MS medium was higher than any other media, i.e. B_5, GD, 1/2MS and WPM. There was a significant difference between the media with sucrose or without. BAP was effective to produce new shoots. Most of the length of shoots induced were short on the medium with high concentrations of BAP. To produce large number of shoots, it took from 4 weeks at least to 12 weeks on WPM medium supplemented with BAP and GA_3. During 8 weeks in culture, an explant produced 35.9 shoots on average. Over 12 weeks, some of shoot tips turned yellow and became dead.

3. *In vitro* shoots were divided into two parts, shoot tip and stem with an axillary bud. They were cultured in liquid media which induced BAP and GA_3. Shoot tips grew very fast and the fresh weight reached 41.4 118 times from the original weight within two weeks. However, stem with an axillary bud responded slow. Most explants produced adventitious shoots within 4 weeks. It was the problem that vitrification occurred during the culture in liquid media. While shoot tip culture in liquid media might be the way to produce many shoots in a short time, stem culture should be modified to protect the vitrification of shoots.

4. Roots of *in vitro* shoots were used for callus induction. NAA and 2,4-D, when used with BAP or kinetin, were effective to induce callus from the roots. The roots showed different responses to the auxins. The best combination was 3.0mg/ℓ NAA with 0.1mg/ℓ kinetin. Callus growth was the best on the medium with 3% sucrose. Over 5% sucrose, callus turned brown and dead. In organogenesis from the callus, the combination of BAP and GA_3 was effective. When it cultured on the medium with BAP only, abnormal leaves were developed without shoots. Callus which cultured on the medium with GA_3 only, no shoots or leaves developed from the callus. The best combination for organogenesis was 0.2mg/ℓ BAP and 2.0mg/ℓ GA_3.

5. *In vitro* rooting, there were no differences among the media but sucrose affect root induction. As the concentration was increased, callus forming rate was also increased. 90.9% of shoots rooted on the medium with 5% sucrose. Rooting rate was not increased by addition of IBA or NAA. As the concentration of NAA was increased, rooting rate was decreased but callus forming rate increased.

6. Another method for rooting *in vitro* was achieved by using soil as a medium instead of agar medium. 84% of the shoots were rooted on the mixture of peatmoss, vermiculite, perlite(1:1:1, v/v). The soil which was mixed with sand was not adequate for rooting. Rooting rate of shoots with callus at the basal end was very poor compared with the shoots without callus. 90 100% of shoots which rooted on soil *in vitro* survived after transferred in the greenhouse. Rooted shoots *in vitro* appeared to be hard to survive the media containing sand, as they showed 45.5% of survival ratio. Shoots unable to root *in vitro* were difficult to survive after transfer in the greenhouse and almost all of them died.

7. Shoots without callus rooted 29.2% and shoots with callus 16.1% survived on the soil in the greenhouse. Soil mixture of peatmoss, vermiculite and perlite(1:1:1, v/v) was most desirable for rooting as shown in rooting of *in vitro*. Shoots with or without roots were

transferred to the greenhouse monthly from June to September. Rooting ratio was higher in September than any other months.

8. After acclimatization, shoots were grown in the greenhouse. The growth of the shoots which were formed *in vitro*, grew fast in April and May than in any other months. New shoots formed after acclimatization vigorously elongated between May and June. The growth rate was gradually decreased from July. It was from April to June that shoots grow vigorously. It was appeared that the contents of the chlorophyll of the leaves increased as time went on.

9. The differences were observed among the plants based on the different stage of propagation and acclimatization. The chlorophyll contents was low when they were cultured *in vitro* for 6 weeks. The ratio of the dry weight to the fresh weight were increased depending on the culture period and acclimatization. The cuticle layer on the epidermis was less developed in the case of 6 week culture. After acclimatization, however, plants showed thicker on the epidermis than *in vitro* condition. While the concentration of K^+ of the leaves were decreased as plants grew bigger, the concentration of Ca^{2+} were increased. There was no significant differences between the mother plant and shoots produced *in vitro* according to the DNA bands amplified by PCR with two primers.