

여름철 함박꽃초대배양에서 외식체의 갈변화억제와 시험관싹유도에 적합한 재료소독조건을 밝히기 위한 연구

한영광, 박금성, 리춘희, 조충원

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《…새로운 약초자원을 적극 찾아내고 그에 대한 연구사업을 강화하여 효능이 높은 고려약을 많이 만들어내도록 하여야 하겠습니다.》(《김정일전집》 제23권 201페이지)

모란과 모란속의 함박꽃(*Paeonia lactiflora* Pall.)은 페오놀리드나 페오니플로린을 비롯한 여러가지 약용물질들이 풍부하고 원예적가치도 대단히 높은 약용 및 원예식물이다.[1, 3, 5]

조직배양기술은 함박꽃의 다량번식과 선발육종의 중요한 수단으로 널리 이용되고있다. 그러나 여름철에는 식물재료가 크게 오염되어있고 외식체에서 갈변화가 심하게 발생하여 무균시험관싹유도가 어렵기때문에 초대배양을 거의 진행하지 못하고있다.[2, 4]

이로부터 우리는 함박꽃의 초대배양에서 제기되는 시기적제한성을 극복하고 결눈재료에 대한 소독효과를 높이면서도 갈변화발생을 억제하고 무균시험관싹을 유도할수 있는 소독조건과 방법을 확립하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

실험재료로는 6월초부터 7월초사이의 함박꽃식물체를 이용하였다.

재료소독과 외식체제작 결눈이 하나씩 포함되도록 3cm정도로 줄기절편을 잘라내고 중성비누액으로 결면세척을 하였다. 재료를 75% 알콜로 10s동안 처리한 다음 10% 표백분상청액과 0.1, 0.2% 승홍용액을 소독제로 하여 각이한 방법으로 처리하였다. 소독처리된 재료의 아래웃쪽을 잘라버리고 결눈이 포함된 0.5cm정도의 줄기절편을 외식체로 이용하였다.

초대배양 소독공정을 거친 외식체를 무균시험관싹유도를 위한 초대배양배지(MS)에 접종하고 온도 (24±2)°C, 비침도 2 000lx, 빛주기 16h/d인 조건에서 40일동안 배양하였다. 시험구당 외식체는 15개씩 접종하였다.

소독효과 외식체에서 나타나는 오염의 발생시기와 오염률을 지표로 하여 소독효과를 평가하였다. 오염발생시기는 접종후 외식체에서 오염이 처음 관찰될 때까지의 일수이며 오염률(%)은 접종한 전체 외식체중 오염된 외식체수의 백분률로 구하였다.

갈변화 시험구외식체들의 갈변화(발생)률과 갈변화된 개별적인 외식체들의 갈변화정도를 지표로 하여 평가하였다. 갈변화률(%)은 접종한 외식체중 갈변화된 외식체수의 백분률로 구하였고 갈변화정도는 외식체들의 색변화와 배지의 갈색물질확산상태에 따라 다음의 4개 급으로 나누고 갈변화된 전체 외식체중 매개 급의 외식체수의 백분률로 구하였다.

1급: 외식체가 연한갈색을 띤 상태

2급: 외식체가 연한갈색을 띠고 배지에 확산된 갈색물질의 직경이 1cm이하인 상태

3급: 외식체가 진한갈색을 띠고 배지에 확산된 갈색물질의 직경이 1cm이하인 상태

4급: 외식체가 진한갈색을 띠고 배지에 확산된 갈색물질의 직경이 1cm이상인 상태

무균썩유도는 접종한지 30일 지나서 접종한 전체 외식체중 유도된 무균시험관썩수의 백분율로 구한 무균썩유도률(%)을 지표로 하여 평가하였다.

결과 및 논의

1) 재료소독과 외식체발육에 미치는 표백분상청액처리시간의 영향

표백분상청액을 소독제로 하여 줄기절편을 각이한 시간 소독하고 배양과정에 나타나는 외식체의 오염과 발육상태를 관찰하였다.(표 1)

표 1. 표백분상청액의 처리시간에 따른 소독효과와 외식체발육상태

처리시간 /min	소독효과		무균썩 유도률/%	갈변화률 /%
	오염발생시기/d	오염률/%		
0(대조)	2.2±0.1	100	0	46.6±1.6
10	3.3±0.1	100	0	48.7±1.8
15	3.5±0.1	100	0	50.8±1.7
20	3.5±0.2	100	0	49.2±1.7
25	4.3±0.2	100	0	47.8±1.5
30	4.6±0.3	100	0	49.6±1.6
35	4.8±0.3	93.7±3.5	0	50.9±1.7
40	4.7±0.3	84.1±2.9	0	48.1±1.7

표 1에서 보는바와 같이 오염발생은 전반적으로 대조구에 비하여 늦어졌으며 시험구들중에서도 25min이상 처리구들은 20min이하 처리구들에 비해 오염발생이 1일이상 지연되었다.

처리시간이 30min이하인 시험구들에서는 외식체가 전부 오염되었으며 35min이상 처리된 외식체들중에 완전히 소독된 외식체들이 일부 있었지만 처리시간을 늘려도 여전히 오염률이 높았다. 이것은 실험에 리용한 6, 7월재료의 오염상태가 비교적 심하며 이런 재료의 소독에서는 표백분의 효과가 매우 낮다는것을 보여준다. 이로부터 표백분상청액처리만으로는 재료의 소독이 어려우며 승홍을 비롯하여 소독효과가 강한 다른 소독제들을 적절히 리용할 필요가 있다고 보았다.

한편 소독처리를 전혀 하지 않은 대조구에서 갈변화률은 표백분상청액을 처리한 시험구들과 큰 차이가 없었는데 이것은 표백분자체는 갈변화발생에 직접적인 영향을 주지 않는다는것을 보여준다. 대조구에서 나타난 갈변화는 외식체의 상처나 급격한 성장조건의 변화와 같은 갈변화의 주요원인으로 되는 스트레스에 예민하게 반응하는 함박꽃자체의 고유한 생리적특성에 기인된다고 본다.

갈변화정도를 관찰한데 의하면 20min이하 처리한 시험구에서는 1급비율이 70%이상이었고 25min이상 처리한 시험구들에서는 2급, 3급비율이 높았으며 4급은 전혀 나타나지 않았다.(그림 1)

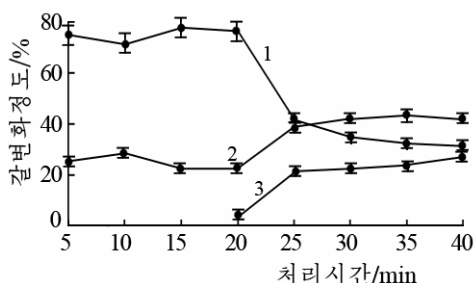


그림 1. 표백분상청액의 처리시간에 따른 갈변화정도
1-1급, 2-2급, 3-3급

그림 1에서 보는바와 같이 표백분상청액은 갈변화의 발생자체에는 직접적인 영향을 주지 않지만 처리시간이 오래면 외식체들의 갈변화상태에 일정한 영향을 주었다. 이로부터 표백분상청액이 소독효과는 비교적 약하지만 처리시간을 20min이하로 하면 외식체의 갈변화에 거의 영향을 주지 않는다는것을 알수 있다.

2) 재료소독과 외식체발육에 미치는 승홍용액의 농도와 처리시간의 영향

실험재료의 오염상태가 심하다는것을 고려하여 각이한 농도의 승홍용액을 리용하여 소독실험을 진행하고 외식체의 오염과 발육상태를 관찰한 결과 소독효과와 외식체생장에 주는 영향이 표백분과 뚜렷이 차이났다.(표 2)

표 2. 승홍용액의 농도와 처리시간에 따르는 소독효과와 외식체발육상태

처리농도 /%	처리시간 /min	소독효과		무균썩 유도률/%	갈변화를 /%
		오염발생시기/d	오염률/%		
0(대조)	0	2.1±0.1	100	0	48.5±1.6
	5	3.4±0.1	100	0	66.6±2.4
	10	4.4±0.2	84.6±2.8	0	75.7±2.8
0.1	15	4.7±0.2	45.2±2.7	3.7*	79.7±3.0
	20	4.6±0.2	23.5±2.3	0	100
	25	4.8±0.3	3.8±0.8	0	100
	5	4.1±0.2	82.7±2.6	0	88.7±2.9
0.2	10	4.5±0.2	63.7±2.2	0	100
	15	4.7±0.3	42.7±1.4	0	100
	20	4.6±0.2	24.5±0.9	0	100
	25	4.8±0.3	0	0	100

* 27개 외식체중 1개 썩이 유도

전반적으로 승홍용액의 농도가 높고 처리시간이 길수록 오염발생이 지연되고 오염률이 낮아지지만 갈변화발생이 심해지는 경향성이 뚜렷이 나타났다. 0.1% 승홍용액으로 15min간 처리한 시험구에서는 오염률이 50%이하로 낮아지고 오염되지 않은 외식체들중에서 1개의 썩이 유도되었지만 썩유도률이 3.7%정도로서 대단히 낮았으며 발생한 썩이 정상적으로 자라지 못했다. 이것은 승홍용액에 의한 소독효과는 높지만 처리농도를 높이고 처리시간을 늘이는 경우에는 외식체가 심하게 손상되어 무균썩유도가 잘 진행되지 않는다는것을 보여준다.

한편 0.1% 농도의 20min이상 처리구와 0.2% 농도의 10min이상 처리구에서는 외식체가 모두 각이한 정도로 갈변화되었는데 이것은 승홍용액이 표백분과 달리 갈변화발생을 촉진시키는 작용을 한다는것을 말해준다.

한편 승홍용액의 처리농도가 높고 처리시간이 길수록 외식체의 갈변화가 심해졌다.(그림 2)

0.1% 농도로 처리시간이 20min이상일 때부터는 갈변화정도가 3, 4급인 외식체의 비율이 높아졌으며 무균썩이 전혀 생기지 않은 0.2% 농도구에서는 처리시간이 10min이상인 경우에 거의 대다수 외식체의 갈변화정도가 4급으로서 외식체색갈이 짙어지면서 검게 보이고 체적이 크게 줄어드는 현상이 나타났다.

이러한 결과는 일단 오염에서 벗어난 외식체의 갈변화상태가 썩발육에 큰 영향을 미치며 0.2% 농도의 승홍용액에서는 심한 갈변화로 하여 외식체로부터 무균썩발육을 기대하기 어렵다는것을 보여준다. 실험을 통하여 함박꽃의 무균썩유도에서는 갈변화가 관건적인 장애요인으로 되며 소독효과가 충분히 클뿐아니라 외식체의 갈변화를 최대한로 억제할수 있는 합리적인 재료소독방법이 해결되어야 한다고 보았다.

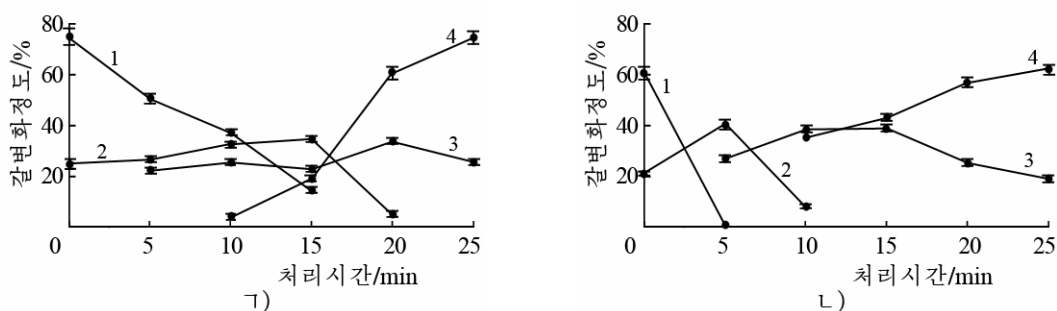


그림 2. 승홍용액의 처리농도와 시간에 따르는 갈변화정도

ㄱ) 승홍용액의 처리농도가 0.1%인 경우, ㄴ) 승홍용액의 처리농도가 0.2%인 경우

1-1급, 2-2급, 3-3급, 4-4급

3) 표백분상청액과 승홍용액의 결합처리방법이 재료소독과 무균썩유도에 미치는 영향
소독효과가 강한 승홍용액과 소독효과는 상대적으로 낮으나 갈변화에 큰 영향을 주지 않는 표백분상청액을 결합한 합리적인 소독처리방법을 밝히기 위한 실험을 진행하였다.(표 3)

표 3. 표백분상청액과 승홍용액의 결합처리방법에 따르는 소독효과와 외식체발육상태

처리방법*	오염률/%	무균썩유도률/%	갈변화률/%
1	100	0	65.9±2.5
2	88.6±2.9	0	72.3±2.4
3	39.4±1.4	0	80.3±3.1
4	100	0	65.2±2.4
5	54.3±1.8	12.2±0.5	68.3±2.7
6	28.7±1.1	3.9±0.2	80.6±2.8
7	75.8±2.8	0	66.1±2.5
8	43.7±1.7	4.1±0.2	75.0±2.7
9	25.3±0.9	0	81.7±3.1

* 1-표백분상청액 10min+승홍용액 5min, 2-표백분상청액 10min+승홍용액 10min,
3-표백분상청액 10min+승홍용액 15min, 4-표백분상청액 15min+승홍용액 5min,
5-표백분상청액 15min+승홍용액 10min, 6-표백분상청액 15min+승홍용액 15min,
7-표백분상청액 20min+승홍용액 5min, 8-표백분상청액 20min+승홍용액 10min,
9-표백분상청액 20min+승홍용액 15min

소독효과는 표백분상청액 20min과 승홍용액 15min 처리한 시험구에서 그중 높았으며 처리시간이 길수록 오염률이 낮아지는 경향성이 뚜렷하였다. 승홍용액처리시간이 비교적 길고 오염이 비교적 적으며 상대적으로 갈변화가 심하지 않은 3개 시험구(5, 6, 8번 시험구)에서 무균썩발육이 관찰되었는데 이것은 일단 오염에서 벗어난 외식체에서 발생하는 갈변화가 결논의 썩발육을 억제하는 중요한 요인으로 된다는것을 말해준다.

3개 시험구중에서 표백분상청액으로 15min 처리하고 편이어 0.1% 승홍용액으로 10min 소독처리한 5번 시험구에서 무균시험관썩의 유도률이 12%정도로서 비교적 높았다. 이러한 결과는 여름계절 함박꽃초대배양에서 처음으로 되는것으로서 서로 다른 소독효과와 갈변화작용특성을 가진 승홍용액과 표백분상청액을 합리적으로 배합하여 소독처리를 진행하면 재료상태가 불리한 여름철에도 초대배양을 통하여 오염과 갈변화를 억제하고 무균시험관썩유도를 실현할수 있다는것을 보여준다.

맺 는 말

표백분상청액은 승홍용액에 비해 소독효과는 약하지만 처리시간을 20min이하로 하면 외식체의 갈변화발생에 영향을 주지 않는다.

승홍용액은 표백분상청액에 비해 소독효과는 강하지만 외식체의 갈변화에 심한 영향을 준다. 승홍용액을 0.1% 농도로 20min이상, 0.2% 농도로 10min이상 처리하면 모든 외식체에서 갈변화가 발생하며 처리농도가 높고 처리시간이 길수록 갈변화정도가 심해진다.

결눈재료를 표백분상청액으로 15min, 0.1% 승홍용액으로 10min동안 련이어 소독처리하고 외식체를 초대배양하면 12%정도로 무균시험관싹을 유도할수 있다.

참 고 문 헌

- [1] 임록재 등; 조선식물지 2, 과학기술출판사, 291~292, 1996.
- [2] D. Zhao; Scientia Horticulturae, 217, 123, 2017.
- [3] W. Jia; Journal of Applied Sciences, 14, 8, 2189, 2014.
- [4] 郑黎文; 林业科学研究, 24, 3, 379, 2016.
- [5] 王吉凤; 植物研究, 32, 1, 84, 2015.

주체109(2020)년 1월 5일 원고접수

A Sterilizing Condition Suitable for Preventing Explants Browning and Inducing *in vitro* Shoots in Primary Culture of Peony in Summer

Han Yong Gwang, Pak Kum Song, Ri Chun Hui and Jo Chung Won

The sterilizing effect of calcium hypochlorite is weaker than of corrosive sublimate solution, but it doesn't affect the browning of the explants when treating less than 20min. corrosive sublimate solution has stronger sterilizing effect than calcium hypochlorite, but great impact on explants browning. When treating 0.1% corrosive sublimate solution for over 20min or 0.2% corrosive sublimate solution for over 10min, all the explants turn brown. As the concentration gets high and the treating time gets long, the browning state gets serious. We sterilized the lateral buds by calcium hypochlorite for 15min and then by 0.1% corrosive sublimate solution for 10min and the induction rate of sterile *in vitro* shoots was 12% in primary culture.

Keywords: peony, lateral bud, browning, sterilization