〈報文〉

# 담배 半數性의 幼葉培養에 關한 研究

韓　昶　烈
(原子力廳 放射線農學研究所)

# Studies on the Culture of Haploid Tobacco Leaf

Harn, Changyawl
(Radiation Research Institute in Agriculture, Office of Atomic Energy)

(1972. 6. 19 접수)

## ABSTRACT

Young haploid leaf derived from the anthers of tobacco plant was cultured and plantlets of various ploidies were obtained.

When the leaf was put on the medium supplemented with kinetin as growth regulator, plantlets developed directly from the leaf, and the plants coming out in early stage of culture were all haploid. Plants developing in later stage were mostly haploids with some exception of diploid and aneuploid.

Leaves were also cultured on the callus-inducing media supplemented with 2,4-D and kinetion, and the calluses were sub-cultured for six months. Plants developed from these calluses were mostly aneuploids of various chromosome numbers.

In view of the fact that the plants directly developed from the leaf were all haploid, the tissue of the original leaf explant was assumed to be uniform as far as chromosome number was concerned. On the other hand, it seemed that the occurrence of various ploidies in the plants derived from the calluses of same origin was the result of the influence of in vitro culture. Apical meristem tissues and various multicellular bodies were formed in the epidermal and inner mesophyll tissues as well as in the sub-epidermal cells.

## 緖　論

植物의 組織을 器內培養했을 때 Callus나 Callus에서 分化된 植物體에 倍數體, 異數體等 여러 染色體異常이 생긴다는 것은 널리 알려저 있는 事實이지만 그 原因에 對해서는 아직 모르는 點이 많다. (Sacristan 1971). 이러한 原因에 對하여는 培養한 組織片自體가 여러가지 倍數性細胞들의 混合體이기 때문이라던가 또는 Callus로 繼代培養하는 中에 染色體變異가 생거나기 때문이라고 說明하고 있다(韓・金 1971, Partanen 1963, Shimeda and Tabata 1967, Shimada 1971, Torrey 1959, Vcukeswaran and Spiess 1963).

한편 組織을 培養했을 때 組織片의 變化, Callus의 形成, Callus에서 植物體의 再分化等에 對한 報告는 많지만, 培養된 組織片에서 直接 植物體가 分化된 例나 이에 對한 組織學的研究는 거의 없다(Kato and Takeuchi 1966, Kato 1968).

本 研究는 半數體담배의 幼葉을 培養하여 잎에서 直接 植物體를 誘起시키는 한편 잎에서 일단 Callus를

誘起 시키고 이 Callus를 오랫동안 繼代培養한 후 다시 植物體를 分化시켜서 이들 植物體들의 染色體變異를 調査함으로서, 組織培養時 培養組織에서 由來된 Callus를 植物體에 各種 染色體變異가 생기는 原因을 究明하고, 植物의 分化된 組織의 染色體數를 推定하고, 培養된 幼葉에서 直接 植物體가 생길때 잎組織이 어떻게 變化하는가를 調査하기 爲하여 實施하였다.

## 材料 및 方法

材料는 담배의 葯을 培養하여 얻은 半數體를 使用하였는데 그것은 半數體가 2倍體에 比해 細胞學的으로 不安定하여 染色體變異를 追究하기가 容易하고 또 染色體異常이 생겼을 때 淘汰와 殘存이 比較的 빠르게 進行되어 殘存個體가 短時日內에 安定되는 等 有利한 點이 많기 때문이다. 이들 半數體는 草丈이 約 4cm인 幼植物로서 100ml의 Erlenmeyer flask에서 無菌的으로 培養되어 있었던 것이다.

길이 2cm 넓이 0.5cm 內外의 잎을 葉柄에서 分離하여 잎全體가 培地에 接觸되도록 接種하였다.

培地는 Murashige and Skoog와 Blaydos의 基本培地에 Auxin類, Kinetin, Yeast extract(YE)를 여러가지로 組合하여 添加한 것을 使用하였다(Table 1). 잎에서 直接 植物體를 誘起하기 爲하여는 $M_2$培地를 使用하였고 Callus를 誘起하기 爲하여는 $M_1$培地를 使用하였다. 誘起된 Callus는 同一한 組成의 培地에서 約 1個月間 增殖시킨 後 $M_2$ 및 $M_3$培地에 移植하여 1個月 間隔으로 6個月間 繼代培養하여 幼植物을 分化시켰다.

分化된 植物體들의 染色體數는 根端을 0.002M 8-hydroxyquinoline水溶液에 前處理하여 Farmer氏液에 固定한 後 Feulgen染色을 하여 調査하였고 組織의 觀察은 培養中인 잎을 一定한 間隔으로 固定하여 常法에 依해 Paraffin 切片을 만들어 檢鏡하였다.

## 結果 및 考察

### 1) 培養組織片으로부터 植物體의 分化 및 Callus 發生

잎에서 直接 植物體를 誘起시키기 爲해 半數體의 幼葉을 $M_2$培地에 培養하였다. 培養 後 約 10日이 되면 잎의 表面이나 葉脈은 正常잎에서와 같이 平滑하지 못하고 거칠게 되어 잎의 表面과 裏面의 區別이 잘 안된다. 培養 後 約 20日이 經過하면 培養된 잎에서 幼植物이 생겨나는데(Fig. 1) 主로 잎의 周緣部에서 많이 發生하며 한個의 잎에서 數個의 잎이 同時에 생겨난다. 그後 時日이 經過함에 따라 처음에 分化된 幼植物의 基部에 Callus狀의 組織塊가 생기며 여기에서 多數의 植物이 생겨나기도 하고 먼저 생긴 植物體의 幼葉이 培地에 接着되어 다시 幼植物이 分化되기도 하여 培養後 約 40日쯤 되면 처음에 培養된 幼葉의 한 場所에서 多數의 個體가 叢生된 하나의 植物群을 이룬다(Fig. 2).

이들 한個의 잎에 叢生되어 있는 幼植物들을 한個씩 分離하여 生育調節物質을 除去한 새로운 培地에 移植하면 正常的인 生育을 하는데 普通 한個의 잎에서 20~30個의 幼植物을 分離할 수 있다. 이들 幼植物의 集團을 Table 2에서 Clone 1 이라고 하였다.

Clone 1의 個體들을 떼어 내고난 組織塊의 表面은 非正常으로 發達한 生長點과 Callus들로 되어 있는데 이런 狀態의 組織塊를 同一한 培地에 約 2個月間 繼代培養하면 그동안에 多數의 植物體가 分化되어 나오는데 이 植物들을 모두 合하여 Clone 2라고 하였다.

한편 半數體의 幼葉을 $M_1$培地에 培養하면 約 2週日後부터 培地와 接觸된 部分에서 Callus가 생겨나기 始作한다(Fig. 3). Callus는 일단 생겨나기 始作하면 旺盛하게 生育하여 急速히 增殖되는데 이들 Callus를 $M_2$ 및 $M_3$ 培地에 移植하면 植物體가 分化된다. 約 6個月間 繼代培養하여 分化된 個體들을 Clone 3 으로 하였다.

### 2) 分化된 植物體들의 染色體數變異

Table 2에서 보는 바와 같이 幼葉을 培養한 後 約 40日 以內에 생긴 Clone 1의 個體들의 染色體數는 材料에 使用된 幼葉과 같이 2n=24 即 半數體들이고, Clone 1의 個體들을 切取한 나머지의 잎 組織塊를 2個月間 繼代培養한 것에서는 半數體 35個體 以外에 2倍體와 異數體가 各各 한個式 생겨났다. 한편 잎에서 Call-

**Table 1.** Growth regulators in mg per liter used for callus or shoot induction from haploid tobacco leaf

| Kinds of medium | Kinetin | NAA | IAA | 2,4-D | YE | Basic medium |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $M_1$ | 2 | — | 2 | 2 | 5,000 | Blaydes |
| $M_2$ | 2 | — | — | — | 5,000 | *M & S |
| $M_3$ | 6 | 2 | — | — | 5,000 | M & S |

* Murahige and Skoog

us를 誘起시켜 6個月間 繼代培養한 것에서 生긴 植物體들의 染色體變異는 複雜하여 15個體中 半數體는 5個뿐이고 나머지는 染色體數가 各各 다른 異數體들이 었다.

**Table 2.** Frequency of various ploid plants derived from leaf tissue and callus

| | Haploid | Diploid | Aneuploid | Total |
|---|---|---|---|---|
| Clone 1 | 22 | — | — | 22 |
| Clone 2 | 35 | 1 | 1 | 37 |
| Clone 3 | 5 | — | 10 | 15 |

植物體의 染色體數를 決定할 때에는 根端 또는 Shoot 等의 生長點分裂組織을 材料로 하는데 이들 分裂組織에서는 細胞分裂이 正常的으로 이루어지고 間或 異常分裂이 생기더라도 이런 細胞들은 곧 陶汰되기 때문에 觀察되는 染色體數는 항상 그 植物固有의 것이다. 그러나 植物의 分化된 組織에서는 分化組織의 位置나 種類에 따라 細胞의 形態와 크기등이 區區한 것으로 보아 이들의 染色體數에도 變異가 있으리라고 推測되나 기왕에는 이를 究明할 길이 없었다. 本 實驗에서는 幼葉을 培養했을 때 早期에 생겨난 個體들이 全部 半數體였다는 事實은 幼葉의 各 組織이 同一한 染色體로 되어있다는 것을 意味한다. Takebe (1971)등은 2倍體담배의 Pith組織은 染色體數가 相異한 細胞들로 構成되어 있으나 잎의 葉肉組織細胞들은 染色體數의 變異가 없고 2倍性으로 均一하다고 하였는데 본 實驗의 結果는 그 正當性을 立證해주고 있다.

Clone 1의 個體들 間에는 染色體數의 變異가 없는데 Clone 2나 Clone 3의 個體들에는 半數體外에 各種 染色體數異常個體들이 있는것은 器內培養하는 동안에 Callus 組織에 染色體數의 異常이 생겼기 때문이라고 생각된다.

一般的으로 體細胞組織을 培養했을 때 Callus나 Callus에서 分化된 植物들에 半數體, 2倍體, 各種 倍數體, 異數體등 여러가지 染色體數變異가 생긴다는 報告가 많이 있으며, 또 이러한 原因에 對해서는 서로 對立된 見解가 있다.

Partanen(1963), Shimada와 Tabata(1967)는 體細胞組織을 培養했을 때 여러가지 倍數性의 Callus가 생겨나는 것은 使用한 組織片이 이미 여러가지 染色體數의 細胞로 되어있기 때문이라 하였다. 한편 培養組織의 染色體數異常은 培養基內의 生育調節物質 때문이라는 見解는 오래 前부터 있었다(Torrey 1959, Venketeswaran 1963). 韓·金 (1971)은 *Solanum nigrum* (2n=72)의 葯培養에서 얻어진 半數性 Callus에서 半數體 以外에 여러가지의 倍數體植物이 分化되었다하고, 이를 Callus가 모두 葯內의 小胞子에서 由來된 것으로 보아 이들 染色體變異는 Callus의 器內培養이 原因이라 하였다. 本 實驗에서 Clone 2 및 Clone 3에 屬하는 植物體들이 모두 染色體數의 變異가 없는 半數性 幼葉에서 由來되었는데도 不拘하고 染色體數의 變異가 생긴것은 器內培養이 原因이라고 斷定해도 좋을 것 같다.

### 3) 培養된 幼葉組織의 變化

培養當時의 잎은 一層의 表皮組織 및 柵狀組織과 3~4層의 海綿組織으로 되어 있으며 比較的 均一한 細胞들이 規則的으로 排列을 하고 있다 (Fig. 4).

培養後 約 10日이 되면 各組織의 細胞들이 커지고 形態 및 排列도 不規則하게 되어 組織間의 區別이 어렵게 된다 (Fig. 5). 外觀上 잎의 表面과 裏面과의 區別이 되지 않는 것은 이와 같이 各 組織間의 區別이 없어지기 때문이다.

培養後 約 20日이 되면 表皮, 表皮直下組織, 內部海綿組織等의 細胞들이 分裂하여 生長點分裂組織 또는 여러 形態의 多細胞體를 形成한다(Figs. 3, 6,7).

培養이 좀더 進行된 잎組織에서는 不規則한 分裂을 하여 Callus로 發達되는것, Anticlinal 또는 Periclinal division을 하는 細胞, 多細胞體化된 游離細胞等 여러가지가 있다(Fig.8). 培養初期의 잎組織에서는 大部分의 分裂細胞가 生長點原基를 形成하지만 繼代培養을 함에 따라 많은 細胞들이 Callus組織으로 發達된다.

細胞分裂은 잎의 어느 組織에서나 可能하지만 生長點原基는 表皮直下組織의 細胞들에서 더 많이 생긴다 (Table 3). 一般的으로 表皮組織은 Anticlinal division을하여 表皮層의 水平的擴大 以外에는 變化가 없는 것인데 本 實驗에서 表皮細胞들이 多細胞體 또는 生長點으로 變하는 것은 特異한 現象이라 할 수 있다. Kato와 Takuchi(1966), Kato(1968)는 당근의 幼軸을 培養했더니 表皮細胞가 直接 不定胚를 形成한다고 報告하였다. 本 實驗結果는 表皮 細胞가 不定胚를 形成하지 않고, 直接 頂端分裂組織을 形成하고, 이것이 植物體로 成長해 버린다.

組織培養을 했을때 一般的으로는 培養組織片에서 Callus가 形成되고, 이 Callus에서 植物體가 再分化되

는 것이 普通이다. 담배의 幼葉을 培養했을 때는 培地의 生育調節物質을 適宜 調節함으로서 幼葉의 各 組織에서 生長點이나 植物體를 直接 再分化시킬 수도 있고, 또 植物體들의 染色體數의 變異를 調節할 수가 있었다.

**Table 3.** Frequency of shoot primordia and multicellular bodies occurring in the leaf tissues

| | Epidermis | Mesophylls | |
|---|---|---|---|
| | | *Sub-epidermis | Inner spongy mesophylls |
| Shoot primordia | 5 | 21 | 4 |
| Multicellular bodies | 3 | 6 | 2 |

* Pallisade tissue and sub-epidermal spongy tissue.

담배의 葯培養을 交雜育種에 適用할 때에는 $F_1$의 葯에서 생긴 半數體를 染色體倍加를 시켜 $F_1$世代의 當年에 Homo 2倍體를 만들어 育種年限을 短縮시킬 수 있는데, 同一 葯에서 생긴 어린 半數體에 本 幼葉培養技術을 適用시키면 葯培養技術을 交雜育種에 利用하는데 있어 더욱 빠르고 經濟的으로 할 수 있을 것이다.

幼葉培養이 담배 以外의 다른 作物에서도 可能하게 되면 育種事業을 한층 더 容易하게 할 수 있을 것이다.

## 摘　　要


담배의 葯培養에서 由來된 半數體植物의 幼葉을 培養해서 植物體를 誘起시켰다. 生育調節物質로서 Kinetin 만을 添加한 培地에서는 早期에 생긴 植物體들은 모두 半數體이고, 2個月間 繼代培養한 後에 생긴 것은 37個體中 35個가 半數體이고 나머지 2個體는 2倍體와 異數體가 各各 1個씩이었다. 한편 2.4-D와 Kinetin을 添加해서 잎에서 일단 Callus를 誘起시킨 後 約 6個月間 繼代培養하면서 分化시킨 植物體들은 15個體中 5個가 半數體이고, 나머지는 各種 染色體數의 異數體들이었다.

幼葉에서 直接 생긴 植物體들 中 初期의 것들이 모두 半數體인 것으로 보아 잎組織은 모두 同一한 染色體數로 되어있다 할 수 있고, 또 이런 잎에서 생긴 Callus를 繼代培養 後 分化시킨 植物體들에 染色體數變異가 생겼다는 것은 Callus의 器內繼代培養이 原因이라 할 수 있다.

幼葉의 各 組織들은 어느 組織에서나 生長點原基, 游離多細胞體, Callus 組織等을 形成하나 生長點原基는 表皮直下組織에서 더 잘 생기는것 같다.


## 參　考　文　獻


韓昶烈·金文子, 1971. *Solanum nigrum* L.의 葯培養에 關한 硏究 Ⅲ. 육종지, 2 : 73-76.

Kato, H. and M. Takeuchi, 1966. Embryogenesis from the epidermal cells of carrot hypocotyl. Sci. papers Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo, 16 : 245-254.

Kato, H., 1968. The serial observations of the adventive embryogenesis in the microculture of carrot tissue. Sci. papers Coll. Educ. Univ. Tokyo, 18 : 191-197.

Partanen, C. R., 1963. Plant tissue culture in relation to developmental cytology. Intern. Rev. Cytol., 15 : 215-243.

Sacristan, M. D., 1971. Karyotypic changes in callus cultures from haploid and diploid plants of *Crepis capillaris* (L.) Wallr. Chromosoma (Berl.), 33 : 272-283.

Shimada, T. and M. Tabata, 1967. Chromosome numbers in cultured pith tissue of tobacco. Japan. J. Genetics, 42 : 195-201.

Shimada, T., 1971. Chromosome constitution of tobacco and wheat callus cell. Japan. J. Genetics, 46 : 235-241.

Takebe, I., Gudrun Labib and G. Melchers, 1971. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. Naturwissenschaften, 58 : 318-320.

Torrey, J. G., 1959. Experimental modification of development in the root. Symp. Soc. Study Develop. Growth, 17 : 189-222.

Venketeswaran, S. and E. B. Spiess, 1963. Tissue culture studies on *Vicia faba*. Ⅲ. Effect of growth factors on chromosome morphology. Cytologia, 28 : 201-212.

**Explanation of illustration**

Fig. 1. Plantlets arising from the periphery of cultured young leaf.

Fig. 2. A group of plantlets from a single leaf.

Fig. 3. In Ml medium calluses were formed.

Fig. 4. Cross section of young tobacco leaf immediately before inoculation.

Fig. 5. Leaf tissue cultured for 10 days.

Fig. 6. An epidermal cell changing into multicellular body (m).

Fig. 7. Shoot primordia (sp) originated from a single sub-epidermal cell.

Fig. 8. Cells changed to be callus (a), elongated mass with anticlinal divisions (b), or multicellular free bodies (c).