

器内培養時 몇가지 生長調節物質이 감자의 生長點 및 莖葉組織片으로부터의 Callus 및 器官分化에 미치는 影響

金忠洙 · 曹在星 · 崔彰烈*

Effects of the Phytohormones on the Organ Differentiation and the Callus Induction from the Meristem Tip and the Segments of the Leaf and Stem of Potato by *in vitro* Culture

Kim, C. S., J. S. Jo and C. Y. Choi*

ABSTRACT

This study was conducted to define the effect of 2,4-D, NAA, Benzyladenine, and basic mediums on the callus induction and the organ differentiation from the meristem tips and the stem and leaf segments of the potato.

Benzyladenine promoted the induction and growth of shoot from the meristem tip of potato but inhibited initiation of roots and induction of callus. At higher concentration of NAA than 0.5 ppm and of 2,4-D than 1.0 ppm the shoots were not initiated but the callus was induced from the meristem.

The callus growth was significantly promoted on the medium containing NAA than 2,4-D. The initiation and growth of the shoots from the potato meristem was significantly increased in the medium containing 2,4-D and BA, or NAA and BA, compared with those containing BA, NAA or 2,4-D alone. The callus was more easily induced from the stem segments than the leaf segments of potato. And the 2,4-D was more effective for the induction and growth of the callus than the NAA.

MS medium diluted its concentration to 1/2 was more suitable for the initiation and growth of the shoots from the potato meristem than the MS standard medium.

For the initiation and growth of the shoots from the potato meristem, the most desirable medium was the diluted MS medium containing 1.0 ppm BA and 0.1 ppm NAA or 0.1 ppm 2,4-D.

緒 言

現在 우리나라 農家의 감자栽培에 있어서 가장 問題視 되는 增收阻害要因中의 하나가 Virus 感染에 의한 種薯退化인 바 現在 우리나라에서는 江原道 大關嶺에 位置하고 있는 高冷地圃場을 中心으로 하여 無病種薯를 生産하여 農家に 普及하고는 있으나 大關

嶺에서 各 栽培農家까지의 種薯運搬에 많은 時間과 經費가 所要될 뿐 아니라 大關嶺의 制限된 面積에서 의 種薯生産으로는 全國의 감자 生産農家를 위한 種薯確保가 不可能하며 또한 大關嶺의 高冷地에서 生産된 種薯라고 해서 完全한 Virus 無病種薯로 認定하기도 어렵다. 따라서 이러한 여러가지 事情을 감안할 때 보다 經濟적이고 간편하며 또한 確實한 無病種薯의 生産 및 普及技術의 開發은 우리나라 農家의 감

* 忠南大學校 農科大學

* College of Agri., Chungnam National Univ., Daejeon 300, Korea.

자 증식배양을 위해 절실히 요구되는 解決되어야 할 課題라 하겠다.

1943年 White⁴⁾는 最初로 TMV에 感染된 토마토 뿌리의 器內培養에 成功하였으며 Virus의 濃度は 根端部位에서 顯著히 낮았음을 報告하였고 Lamasset⁵⁾ 등도 生長點에 가까울수록 Virus의 濃도가 減少됨을 報告한 바 있으며 1952年 Morel과 Martin⁶⁾은 生長點 培養으로 Virus 無病個體를 얻을 수 있을 것이라는 可能性을 示唆하였던 한편 Dahlia의 生長點 培養을 통하여 그들의 假說을 立證한 바 있다.

Kassanis⁷⁾는 1957年 生長點培養을 利用하여 Virus 無病種薯의 育成에 成功하였으며 Bajaj와 Dionne⁸⁾도 PVX 無病個體를 얻기 위해 감자 뿌리의 生長點 培養에 關係 研究하였고 그외에도 지금까지 많은 研究者들이 감자의 Virus 無病個體를 얻기 위해 줄기, 塊莖, 뿌리 및 藥 等の 여러 部位의 培養을 試圖하였으나 바람직한 結果는 얻지 못하였으며 다만 감자의 경우 줄기의 生長點 培養만이 Virus 無病個體 育成에 가장 效果的임이 認定되었다^{3,5,6)}. 또한 줄기의 生長點培養에 있어서 줄기 先端을 0.3mm 以下로 切斷하여 培養할 경우 Virus 無病個體의 確率は 높으나 培養時 生存率 및 器官分化率이 아주 낮으며 0.7mm 以上 되게 切斷培養하면 生存率は 좋으나 Virus 無病個體 出現頻도가 아주 낮다 하였다.

本研究는 生長點培養時 Virus 無病個體의 出現率에 關係는 일단 論議를 留保하고 生長點培養時 培地內에 包含시키는 여러가지 Auxin 및 Cytokinin系 生長調節物質이 器官의 分化 및 生長에 미치는 影響을 分析 檢討하여 生長點에서 目的하는 器官의 分化에 最適한 培地組成을 究明하는 한편 器內培養을 利用한 감자의 大量繁殖 方案 開發을 위한 基礎 情報를 얻고자 遂行되었던 바 몇가지 새로운 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

男爵品種을 供試種薯로 使用하였으며 먼저 種薯를 0.2%의 昇汞水에 5~6分間 浸漬 消毒한 후 健全한 눈을 1~2個 붙인 상태로 切斷하여 蒸氣滅菌器를 使用 滅菌한 모래에 栽植하였으며 栽植이 끝난 후 蒸溜水를 灌水하고 20°C, 2,000Lux의 生長箱에 置床하여 發芽시켰다. 發芽後 莖이 約 4~5cm 자랐을 때 頂端에서 約 2.0cm 程度를 切取하여 10% NaOCl 溶液에 10分間 浸漬 消毒하였으며 浸漬後 滅

菌水로 2回 洗滌하여 Filter paper에 놓고 줄기의 頂端 約 0.7mm를 切斷하여 試驗코저 하는 培地上에 接種한 후 20°C, 2,500Lux의 生長箱에서 培養하였다. 한편 莖斷片으로부터의 Callus 및 器官分化에 미치는 生長調節物質의 影響에 關係 考察實驗에서는 發芽後 莖長이 約 10cm 程度 伸長하였을 때 이를 切取하여 同一한 요령으로 滅菌消毒하고 Filter paper 위에서 莖을 約 5mm 程度로 切斷하여 培地上에 接種하였으며 또한 葉은 約 4mm × 4mm 크기로 절단하여 培地上에 接種하였다.

本實驗에서 使用된 基本培地는 Murashige and Skoog培地로서 Sucrose 30g/l 및 Agar 8g/l를 添加한 固體培地를 만들어 使用하였고 培養容器는 15cm × 1.8cm의 試驗管에 培地를 各各 12cc씩 注入하여 斜面凝固시켰다. 各 實驗에 있어서의 生長調節物質 處理內容은 實驗結果의 表에서 보는 바와 같으며 各 實驗에서의 調査는 Callus 및 뿌리의 分化 및 生長과 莖의 分化 및 生長量을 測定하였다.

結果 및 考察

Benzyladenine (BA)이 감자의 生長點培養時 Callus의 誘起 및 器官의 分化에 미치는 影響은 表 1에서 보는 바와 같다.

Table 1. Effects of BA on the organ differentiation and callus induction from Potato meristem.

BA	Shoot		Root	Callus
	Initiation	Length	Initiation	Induction
Check(mg/l)	100%	3.67 mm	0.0 %	0.0 %
0.5	100	5.78	0.0	0.0
1.0	100	10.63	0.0	0.0
2.0	100	15.24	0.0	0.0

無處理 및 BA處理區에서는 모두 100%의 莖의 分化率을 나타내었으나 뿌리 및 Callus는 전혀 分化 혹은 誘起되지 않았다. BA가 莖의 伸長에 미치는 影響을 보면 BA를 0.5ppm 處理한 區에서는 5.78mm의 莖生長을 보였으며 BA의 濃度を 增加시킴에 따라 莖의 生長은 直線的인 增加를 보였던 바 BA는 감자 生長點培養時 莖의 伸長生長을 促進하는 效果가 顯著함을 認定할 수 있었는데 Murashige와 Skoog⁴⁾는 Kinetin이 감자의 生長點培養에서 莖의 分化 및 伸長에 效果的임을 報告한 바 있고 Wang⁷⁾도 감

자의 生長點培養에 Kinetin 1ppm 添加가 效果의 임을 報告한 바 있는데 本實驗의 結果로 미루어 볼 때 같은 Cytokinin 系 生長調節物質로서 BA도 Kinetin 과 같은 莖의 伸長效果가 認定되는 바 감자 生長點培養에는 Kinetin 代用으로 BA를 使用하여도 效果의 일 것으로 思料된다. 한편 감자 生長點培養時 Callus 의 誘起 및 器官의 分化生長에 미치는 Auxin의 效果는 表 2, 3에서 보는 바와 같다. 먼저 NAA의 器官

Table 2. Effects of NAA on the organ differentiation and callus induction from Potato meristem.

NAA	Shoot		Root	Callus	
	Initiation	Length	Initiation	Induction	Growth
mg/l	%	mm	%	%	mg
Check	100.0	3.67	0.0	NI*	-
0.01	89.5	3.53	10.5	15.8	12.0
0.05	87.0	3.35	17.4	26.1	21.4
0.1	70.6	3.25	47.1	52.9	37.0
0.5	0.0	-	57.1	100.0	47.8
1.0	0.0	-	66.7	100.0	66.5
2.0	0.0	-	59.8	100.0	104.0
4.0	0.0	-	50.0	100.0	118.6

*NI: means not induced

Table 3. Effects of 2,4-D on the organ differentiation and callus induction from Potato meristem.

2,4-D	Shoot		Root	Callus	
	Initiation	Length	Initiation	Growth	
mg/l	%	mm	%		mg
Check	100.0	3.67	0.0	NI*	
0.01	100.0	5.44	0.0	NI	
0.05	100.0	5.79	0.0	NI	
0.1	100.0	6.60	0.0	NI	
0.5	25.0	3.11	0.0		39.4
1.0	0.0	-	0.0		41.7
2.0	0.0	-	0.0		62.2

*NI: means not induced.

分化 및 Callus 誘起에 미치는 影響을 보면 0.1 ppm에서 莖의 分化率이 70.6%로서 0.1 ppm까지는 NAA의 濃度を 높임에 따라 莖의 分化率이 顯著한 減少를 보였고 0.5 ppm 이상의 濃度에서는 莖의 分化가 完全히 抑制되었으며 分化된 莖의 伸長도 NAA 濃度を 높임에 따라 顯著히 抑制되었다. 한편 NAA 無處理區에서는 뿌리의 分化가 전혀 없었으나 NAA 0.01

ppm에서 10.5의 뿌리 分化率을 나타내었으며 1.0 ppm까지는 濃度を 增加시키에 따라 뿌리 分化率이 顯著히 增加되어 1.0 ppm에서는 66.7%의 發根率을 보였으며 그 이상의 濃度增加에서는 發根率이 다시 減少되는 傾向이었다. 한편 Callus는 無處理區에서는 전혀 誘起되지 않았으나 0.01 ppm의 NAA 處理區에서는 15.8%의 Callus 誘起率을 보였고 NAA 濃度を 增加시키에 따라 Callus의 誘起率은 顯著히 높아졌으며 NAA 0.5 ppm 處理區에서는 100% Callus가 誘起되었으며 Callus의 生長量도 NAA의 濃度を 倍加시키에 따라 顯著한 增加를 나타내었다.

그러나 2,4-D를 培地에 添加하였을 경우에는 NAA와 같은 Auxin系 生長調節物質이면서도 그 效果는 顯著히 相異하였던 바 0.1 ppm 處理에서도 莖의 分化率이 100%였으며 0.5 ppm 處理區에서 25% 그리고 그 이상의 濃度에서 莖의 分化가 完全 抑制되었으며 0.1 ppm까지는 오히려 2,4-D 添加量의 增加에 따라 莖의 伸長이 增加되었고 0.5 ppm에서 顯著한 莖伸長 生長의 抑制을 나타내었으며 또한 2,4-D를 添加할 경우 어느 濃度에서도 根의 分化는 전혀 이루어지지 않았다. 또한 Callus는 2,4-D 0.1 ppm까지는 전혀 誘起되지 않았으며 0.5 ppm 이상의 添加區에서는 Callus가 모두 誘起되었는데 Callus의 生長量은 同一한 濃度の NAA에 비해 顯著히 적은 傾向이었다. Wang^{6,7)}은 감자의 生長點培養時 Callus의 誘起를 위해서는 2,4-D 2.0 ppm을 添加하는 것이 가장 效果의 임을 報告한 바 있으나 本實驗의 結果로 미루어 볼 때 Callus의 誘起 및 生長에는 2,4-D 보다는 오히려 NAA가 더욱 效果의 이라 하겠으며 NAA 2.0 ppm 添加가 감자 生長點培養時 Callus의 誘起 및 生長에 가장 適合한 것으로 思料된다. Wang⁷⁾은 감자의 生長點培養時 Kinetin 1.0 ppm과 NAA 0.01 ppm을 添加한 MS培地가 가장 效果의 이라 報告한 바 있는데 本研究에서도 NAA와 BA 그리고 2,4-D와 BA間的 Callus 誘起 및 器官分化에 미치는 交互作用 效果를 究明하기 위하여 BA를 1.0 및 2.0 ppm 그리고 NAA와 2,4-D를 各各 0.01 및 0.1 ppm의 2水準으로 하여 組合處理하였던 바 그 結果는 表 4에서 보는 바와 같다. 먼저 BA와 NAA의 組合處理 結果를 보면 NAA 存在下에서는 BA의 濃도가 1.0 ppm에서 보다 2.0 ppm으로 높았을 때 莖의 分化率이 顯著히 減少되었으며 NAA 單獨處理時는 NAA의 濃度の 增加에 따라 莖의 生長이 抑制되었으나 BA 存在下에서는 NAA 0.01 ppm 때보다

Table 4. Effects of NAA and BA, 2, 4-D and BA on the organ differentiation from Potato meristem.

Treatment	Shoot			Callus		
	mg/l	mg/l	%	mm	mm	
BA	1.0	NAA	0.01	94.7	56.2	4.4
	1.0		0.1	90.5	82.8	6.0
	2.0		0.01	40.9	69.4	4.8
	2.0		0.1	64.7	98.0	7.1
	2.0	2,4-D	0.01	100.0	57.4	4.8
BA	1.0		0.1	100.0	75.2	6.2
	2.0		0.01	51.6	17.1	3.8
	2.0		0.1	90.5	52.6	6.1

0.1ppm 處理時 莖의 生長은 顯著히 增加되었다. 또한 BA 單獨處理時는 전혀 Callus가 誘起되지 않았으나 NAA 存在下에서는 BA 1.0ppm에서보다 2.0ppm에서 Callus의 生長量은 顯著한 增加를 보였다. 한편 BA와 2,4-D의 組合處理에서도 莖의 分化比率은 NAA와 BA의 組合處理에서와 같이 2,4-D 存在下에서는 BA 1.0ppm에서보다 2.0ppm에서 莖의 分化率이 顯著히 減少되었으며 또한 BA 2.0ppm 下에서는 2,4-D 0.01ppm에서보다 0.1ppm에서 顯著히 莖의 分化率이 높았다. 그런데 莖의 生長에 있어서는 BA 存在下에서는 2,4-D의 濃度가 높은 수록 莖의 生長이 促進되었던 바 이는 BA와 NAA의 組合處理에서와 같은 結果였으나 NAA와 BA 組合處理時에는 BA 濃度增加에 따라 莖의 伸長이 增進되었으나 BA와 2,4-D 組合處理時는 BA 1.0ppm 處理區에 비해 BA 2.0ppm 處理區에서 莖의 生長은 顯著히 抑制되었다.

Callus의 生長에 있어서는 BA의 濃度間에 Callus의 生長量의 差異가 認定되지 않았고 BA의 濃度에 관계없이 2,4-D 濃度의 增加에 따라 Callus 生長은 顯著한 增加를 보였다. 이상의 結果를 綜合해 볼 때 2,4-D와 BA 그리고 NAA와 BA間에는 현저한 交互作用이 認定되었으며 특히 莖의 伸長에는 BA의 存在下에서는 NAA와 2,4-D 모두 0.01ppm의 낮은 濃度에서보다는 0.1ppm의 높은 濃度에서 莖의 生長이 促進되었던 바 감자의 生長點培養時 莖의 分化 및 生長을 考慮할 때 BA 1.0 및 NAA 0.1ppm의 組合處理나 BA 1.0 및 2,4-D 1.0ppm의 組合處理가 가장 效果的인 것으로 思料된다.

감자의 莖 및 葉斷片으로부터 Callus 誘起 및 生長

Table 5. Effects of 2,4-D on the Callus induction and growth from Potato stem segment and leaf segment.

2,4-D	Stem segment		Leaf segment	
	Diameter (mm)	Weight (g)	Diameter (mm)	Weight (g)
0.1 mg/l	3.17 e	0.07 d	-	-
0.5	5.83 d	0.18 c	5.00 d	0.12 c
1.0	10.83 a	0.51 a	8.83 b	0.41 b
2.0	9.33 b	0.43 b	10.67 a	0.50 a
4.0	7.67 c	0.14 c	6.83 c	0.14 c

Table 6. Effects of NAA on the Callus induction and growth from Potato stem segment and leaf segment.

NAA	Stem segment		Leaf segment	
	Diameter (mm)	Weight (g)	Diameter (mm)	Weight (g)
0.1 mg/l	4.17 d	0.08 c	5.17 cd	0.05 c
0.5	8.67 b	0.32 a	4.67 d	0.01 c
1.0	8.17 b	0.20 b	6.50 b	0.05 b
2.0	9.83 a	0.30 a	8.83 a	0.21 ab
4.0	7.50 c	0.21 b	6.17 bc	0.24 a

에 미치는 2,4-D와 NAA의 影響을 調査한 結果는 表 5 및 6에서 보는 바와 같다. 2,4-D를 處理할 경우 莖斷片에서는 0.1ppm에서 Callus가 誘起되었으나 葉斷片에서는 0.5ppm에서 Callus가 誘起되기 始作하였고 同一 濃度下에서는 葉片에서보다 莖片에서 誘起된 Callus의 生長이 顯著히 增加되었다. 또한 莖片에서는 1.0ppm 處理時의 Callus 生長이 가장 良好하였고 그 이상의 濃度에서는 漸減되었는데 葉片에서는 2.0ppm 處理時 Callus 生長이 가장 良好하였다. NAA 處理時에도 2,4-D의 경우와 같이 葉片에서 誘起된 Callus보다 莖片에서 誘起된 Callus의 生長이 현저히 優勢하였다. 다만 NAA 處理時에는 2.0ppm 處理區에서 莖片 및 葉片의 Callus가 모두 가장 良好한 生長을 나타내었다. 莖片 및 葉片에서의 Callus 誘起 및 生長에 미치는 NAA와 2,4-D의 效果를 比較해 보면 대체로 莖片 및 葉片에서 모두 NAA보다 2,4-D 處理區에서 Callus의 生長量이 增加되는 傾向을 보였다.

基本培地の 組成이 감자 生長點培養時 莖의 分化 및 生長과 Callus의 誘起에 미치는 影響을 調査하여 最適 基本培地를 究明하고자 Murashige and Skoog 培地와 Blaydes 培地를 中心으로 이들 培地造成中 大量 元素만 添加한 培地와 MS 培地는 그 濃度를 1/2

및 1/4로 稀釋하여 Sucrose 30g 및 Agar 8g을 各各 同一하게 添加하고 또한 BA 1.0 및 NAA 0.1ppm을 各 基本培地에 모두 同一濃度로 添加하였던 바 그 結果는 表 7에서 보는 바와 같이 MS 1/4培地에서 莖의 分化率이 가장 높았고 다음이 MS 1/2培地區였으며 MS 多量要素培地에서의 莖分比率이 가장 낮았다. 分化된 莖의 生長은 MS 1/2培地에서 가장 良好하였다.

Table 7. Effects of Basic medium on the organ differentiation and callus induction from Potato meristem.

Treatment	Shoot		Callus	
	Initiation	Length	Induction	Growth
	%	mm	%	mg
BL	50.0	17.0	100.0	18.0
BL/M	44.0	8.5	100.0	15.2
MS	33.9	8.5	100.0	56.2
MS/M	17.9	30.0	100.0	33.6
MS 1/2	64.7	45.7	100.0	101.5
MS 1/4	66.7	25.0	100.0	74.0

各 培地上에서 모두 Callus는 誘起되었는데 MS 1/2培地上에서 Callus의 生長量은 가장 많았고 다음이 MS 1/4培地였다. 이로 미루어 볼 때 MS 標準培地는 成分의 濃度가 감자 生長點培養에는 높은 것으로 생각되며 이는 MS培地에서보다 成分濃度가 顯著히 낮은 BL培地上에서 莖分化 및 生長率은 높은 點으로서 미루어 감자의 生長點培養時 基本培地로서는 MS培地를 쓸 경우 그 濃度를 1/2로 稀釋하여 使用하는 것이 가장 效果的일 것으로 생각된다.

摘 要

감자의 生長點培養時 基本培地の 種類 및 基本培地에 添加되는 2,4-D, NAA 및 Benzyladenine 이 감자의 生長點으로부터의 器官의 分化 및 生長과 Callus의 誘起에 미치는 影響을 究明하고자 本實驗을 遂行하였던 바 그 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 基本培地中에 Benzyladenine (BA)의 濃度를 增加시킬수록 감자 生長點에서 誘起된 莖의 伸長은 현저히 促進되었으나 BA를 添加한 培地上에서는 根 및 Callus는 전혀 誘起되지 않았다.
2. NAA를 0.5ppm 以上 含有하고 있는 培地上에서는 莖의 分化가 完全히 抑制되었고 모두 Callus가 誘起되었으며 NAA의 濃度를 增加시킬수록 Callus의 生長은 促進되었다.

3. 2,4-D 1.0 ppm 以上 含有하는 培地上에서 莖의 分化가 完全히 抑制되었고 Callus가 誘起되었으며 Callus 生長量은 2,4-D 濃度가 높을수록 많았는데 2,4-D보다는 NAA 添加培地上에서 Callus의 生長量은 顯著的 增加를 보였다.

4. NAA만을 添加한 培地上에서는 莖의 分化 및 生長이 抑制되었으나 BA와 NAA를 組合處理하였을 때는 NAA 0.01 ppm에서보다 0.1 ppm에서 莖의 分化 및 生長이 顯著히 增加되었으며 2,4-D와 BA의 組合處理에서도 같은 傾向이었던 바 BA와 NAA 혹은 2,4-D의 組合處理時에는 莖의 分化 및 伸長이 促進되는 方向으로의 交互作用이 顯著하였다.

5. 葉片보다는 莖片에서 Callus의 誘起 및 生長이 良好하였으며 이들 莖葉組織片으로부터의 Callus 誘起 및 生長에는 NAA 보다는 2,4-D가 더욱 效果的이었다.

6. MS 標準培地보다는 MS培地の 濃度를 1/2로 稀釋하여 培地中の 無機成分 濃度를 低下시킨 培地上에서 거의 莖의 分化 및 伸長이 현저히 促進되었다.

7. 감자 生長點培養時 莖의 誘起 및 生長에는 MS 1/2培地에 BA 1.0 ppm 및 NAA 혹은 2,4-D 0.1 ppm을 添加한 培地가 가장 效果的이었다.

引 用 文 獻

1. Bajaj, Y.S.P. and L.A. Dionne(1966) Virus X free roots from infected potato plants. Am. Potato Jour. 43:384.
2. Kassanis, B.(1957) The use of tissue culture to produce virus-free clones from infected potato varieties. Ann. Appl. Biol. 45:422-427.
3. _____ and A. Varma(1967) The production of virus-free clones of some British potato varieties. Ann. Appl. Biol. 59:447-450.
4. Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj(1977) Plant cell, tissue and organ culture. Springer verlag: 616-646.
5. Wang, P.J. and Y.C. Loo(1973) Elimination of potato viruses by means of shoot-tip culture. Chinese Biosci. 2:19-24.
6. _____ and L.C. Huang(1975) Callus culture from potato tissues and the exclusion of potato virus X from plants regenerated from stem tips. Can. Jour. Bot. 53:2565-2567.

7. _____ (1977) Regeneration of virus-free potato from tissue culture. Plant tissue culture and its biotechnological Application. Springer-Verlag: 386-391.