

## 강남콩(*Phaseolus vulgaris* L.) 國內品種의 組織 培養에서 遺傳子型에 따른 Cytokinin 要求性

金 相 九 · 宋 周 鎬  
(서울대학교 自然科學大學 植物學科)

### Genotypic Responses to Cytokinin Requirements in Callus Culture of Korean Varieties of *Phaseolus vulgaris* L.

Kim, Sang-Gu and Ju-Ho Song

(Department of Botany, Seoul National University, Seoul)

#### ABSTRACT

Callus culture of *Phaseolus vulgaris* L. was carried out to examine the ability to grow on cytokinin-free medium. Of the sixteen cultivars of *P. vulgaris*, eight were classified as completely cytokinin-autonomous phenotype and five were found to be cytokinin-dependent phenotype. Intermediate phenotype was shown in three cultivars. Using cv. Palgong and ca 21 as cytokinin-dependent genotypes, the genotype responses to the cytokinin requirements of callus tissue were studied in detail. The callus tissue of cv. Palgong and ca 21 were never habituated in cytokinin-free medium, regardless tissue origin and cytokinin concentration in previous passages. The result suggests that cytokinin dependency of callus tissue of *P. vulgaris* cv. Palgong and ca 21 may be due to inactivation of cytokinin biosynthetic pathway.

#### 緒 論

식물 배양조직을 이용한 細胞學的, 生理學的, 生化學的 및 遺傳學的 연구가 널리 행해지고 있으며 특히 callus조직 生長에 따르는 식물 hormone, cytokinin 대사의 유전적 조절기작을 밝혀려는 연구가 저자 등에 의해 *Phaseolus*속 callus 배양계를 이용하여 進行되었다 (Armstrong *et al.*, 1981; Kim, 1980; Kim *et al.*, 1982; Mok and Mok, 1977; Mok *et al.*, 1978, 1980, 1982). 이에 의하면 강남콩의 callus 生長은 배지에 첨가한 cytokinin의 種類에 따라 차이가 있으며, cytokinin 要求性 정도도 品種에 따라 그 特異性을 나타내고 있다. 이와 같이 강남콩의 cytokinin 요구성 生長양상은 한 쌍의 遺傳子의 지배를 받고 있음이 立證되었다.

본 실험에서는 강남콩 (*Phaseolus vulgaris*) 국내 품종에 대한 callus 組織培養을 수행하여

이 論文은 1983年度 韓國科學財團 研究費에 의하여 기록되었음.

cytokinin 요구성 성장 정도를 밝힘으로써 地理적으로 달리 유래된 강남콩 品種에 있어서 cytokinin 요구성 유전 양상의 존재를 확인하고자 하였다.

### 材料 및 方法

**植物材料 및 試藥.** 강남콩 (*Phaseolus vulgaris* L.)의 국내 품종들은 본 연구실에서 栽培 및 採種하여 4°C 暗所에 보관하면서 실험에 사용하였다. Kinetin (N<sup>6</sup>-furfuryladenine)은 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였으며 picloram (4-amino-2,3,5-trichloropicolinic acid)는 Dow Chemical로부터 기증받았다.

**Callus 培養 培地.** 배지의 조성은 Murashige and Skoog(1962)의 무기 영양소에 유기 영양소로 sucrose (30 g/l)와 myo-inositol (100mg/l)을 첨가하였으며 vitamine으로는 thiamine·HCl (1 mg/l), nicotinic acid (5 mg/l) 및 pyridoxin·HCl (0.5 mg/l)을 넣어 주었다. 처음 callus를 유도할 때와 組織 유지를 위한 배지에는 2.5 μM picloram과 5 μM kinetin을 첨가하였으며 그 외의 실험에서는 연구내용에 따라서 cytokinin의 濃度を 調節하여 첨가하였다. 배지의 pH는 1N NaOH를 使用하여 5.7로 맞추었으며 Difco-bacto agar (8 g/l)를 첨가하여 녹인 뒤 100 ml들이 Erlenmeyer flask에 50 ml씩 나누어 넣고 121°C로 15분간 멸균하였다. Kinetin은 DMSO (dimethylsulfoxide)에 녹여 아직 응고되지 않은 상태의 멸균배지에 첨가하였다. DMSO의 최종 첨가량은 0.05 ml/flask가 되도록 조정하였다 (Schmitz and Skoog, 1970).

**Callus의 Cytokinin 要求性.** 강남콩 種子를 95%(v/v) ethanol로 1분간, 2.5%(v/v) sodiumhypochlorite(Clorox Co.)로 15분간 표면살균한 다음, 멸균 증류수로 3회 洗滌하고 멸균된 100 ml Erlenmeyer flask에 넣어 멸균증류수만 공급하면서 發芽시켰다. 발아 7일 후에 유식물의 下胚軸을 약 1 mm 두께로 잘라서 한 flask당 3개씩 심어 callus를 유도하였다. 유식물체의 부위별에 따른 callus 유도의 차이를 究明하는 實驗에 있어서는 유식물체의 上胚軸, 下胚軸, 뿌리 및 子葉의 절편들을 각각 1 mm 두께로 잘라서 callus 유도의 정도를 실험하였다. 유도된 callus는 21일을 주기로 새로운 배지에 계대배양하였다. Cytokinin의 효과에 대한 실험은 2차 계대배양에서 施行하였으며 cytokinin 要求性에 대한 실험은 cytokinin을 농도별로 처리한 배지에서 계대배양을 한 뒤, 이들 callus를 cytokinin을 넣지 않은 배지에서 계대배양하여 結果를 測定하였다. 모든 실험은 27°C 暗所에서 35일간 培養된 callus의 生體量을 측정하였고 동일 조건의 flask 8개의 평균 생체량으로 결과를 얻었다. 同一한 실험을 2회 이상 실시하여 結果를 확인하였다.

### 結果 및 考察

강남콩 (*Phaseolus vulgaris* L.)의 callus 조직배양을 통하여 品種에 따른 callus 生長과 cytokinin 要求性에 대한 遺傳的 변이양상을 調査하였다. Cytokinin 비요구성 callus 성장 정도를 실험하기 위하여 유식물체의 하배축으로부터 callus를 유도하였을 때 cytokinin을 첨가한 배지에서는 실험에 使用한 모든 品種이 잘 자랐으며 최저 5.3 g/flask (ca 23)에서 최고 26.3 g/flask (CA 22)까지의 성장량을 보였다 (Table 1). 이들 callus를 cytokinin을 첨가하지

Table 1. Genotypic responses of cytokinin-autonomous growth in callus culture of *Phaseolus vulgaris* L.

Cultivars	Average fresh weight (g/flask)*		Genotype for the cytokinin requirement**
	Second passage kinetin (5 $\mu$ M)	Third passage cytokinin-free media	
Damyang	12.5	7.4	CA
Haman	8.4	9.5	CA
Tongyeung	17.0	8.6	CA
11	18.1	5.3	CA
22	26.3	6.4	CA
32	20.8	9.7	CA
14	15.5	16.9	CA
24	22.7	6.0	CA
31	9.6	1.4	Ca
42	14.2	3.5	Ca
34	13.5	3.8	Ca
Palgong	15.9	0.7	ca
21	13.3	0.7	ca
52	10.2	0.4	ca
13	8.3	0.5	ca
23	5.3	0.7	ca

\* Average of eight flasks. Tissues were harvested after five weeks of growth.

\*\* CA: Cytokinin-autonomous phenotype

Ca: Intermediate phenotype

ca: Cytokinin-dependent phenotype

얇은 배지에 계대배양한 결과 cytokinin 要求性 성장 정도에 따라 cytokinin 비첨가배지에 서도 잘 자랄 수 있는 品種(cytokinin-autonomous phenotype), 중간 形質을 나타내는 品種(intermediate phenotype) 및 cytokinin을 반드시 처리했을 때만 자랄 수 있는 品種(cytokinin-dependent phenotype) 등 크게 세 群으로 대별할 수 있었다. 이와 같은 강남콩 품종들의 callus 生長에서 cytokinin 要求性의 차이는 *Phaseolus*屬의 유전적 特性으로 구명된 바 있으며 한쌍의 유전자의 調節을 받고 있음이 보고되었다 (Mok *et al.*, 1980). 본 실험에서 使用한 강남콩들은 국내품종으로서 地理的으로 달리 유래된 강남콩 품종들의 callus 生長에서도 cytokinin 要求性의 차이는 현저하여 cytokinin을 첨가하지 않은 배지에서 자랄 수 있는 能力은 각 품종에 따라 달라, callus가 유래된 品種에 依存함을 알 수 있으며 이 植物의 共通된 cytokinin 대사의 遺傳的 特性으로 結論지을 수 있다.

강남콩의 cytokinin 비요구성 發達 정도는 cytokinin 비요구성 callus 조직 生長에 있어서 전처리시 배지에 첨가한 cytokinin의 농도에 따라 다음 계대배양에서 cytokinin 비요구성 生長의 정도가 달라, 前 배양시에 cytokinin의 농도가 callus 生長의 最適 농도에서 떨어질수록, 즉 저농도 혹은 고농도에서 生長할수록 다음 계대배양시 cytokinin 비요구성 조직으로의 전환 정도가 높아진다 (Kim, 1980; Kim *et al.*, 1982; Capelle *et al.*, 1983), 따라서

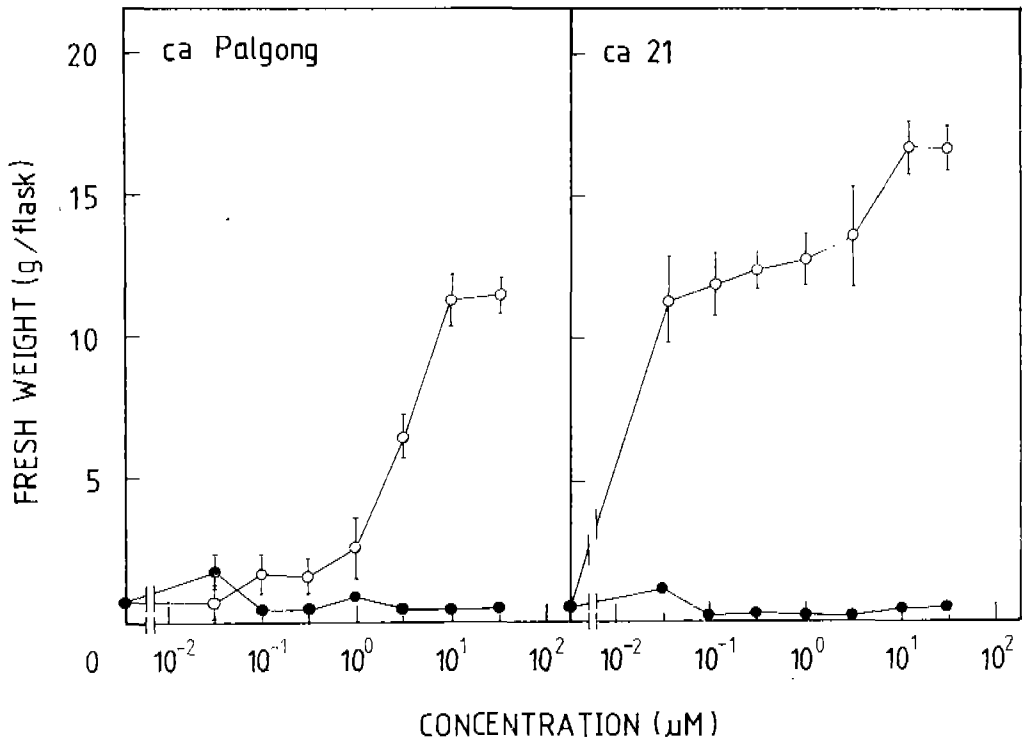


Fig. 1. Effect of cytokinin concentrations in previous passage for the development cytokinin autonomy in callus culture of *Phaseolus vulgaris* L. Kinetin treated (-o-) in second passage and kinetin-free medium (-●-) in third passage.

cytokinin을 배지에 첨가했을 때만 자랄 수 있는 품종(팔공, ca 21, ca 52, ca 13 및 ca 23)이라 하더라도 前처리시에 cytokinin의 농도를 變化시킬 때 다음 계대배양에서 cytokinin 비요구성 생장의 가능성을 배제할 수는 없다. 그래서 cytokinin 요구성 유전형 품종중 2종 즉, 팔공과 ca 21을 선정하여 前처리시의 cytokinin 농도에 따른 cytokinin 비요구성 生長 정도를 調査하였다. 전처리시에 각기 다른 cytokinin 濃度에서 자란 callus 組織 절편을 cytokinin 비첨가 배지에 옮겨 심어 비요구성 조직생장의 정도를 보면 (Fig. 1), 품종 팔공 및 ca 21 遺傳子型 공히 前처리때의 cytokinin 농도에 따른 生長 정도에 관계없이 다음 계대배양의 cytokinin 비첨가 배지에서 callus 生長이 進行되지 않았다.

Cytokinin 비요구성 生長이 식물체의 부위에 따라서 영향을 받을 수 있는지의 여부를 조사하기 위해 7일간 發芽된 유식물체의 上胚軸, 下胚軸, 뿌리 및 子葉의 절편들을 각각 2.5  $\mu$ M picloram과 5  $\mu$ M kinetin을 첨가한 배지에 심어서 callus를 유도하였다. Callus의 生長量은 품종 팔공 및 ca 21 공히 부위에 따른 callus 生長 정도가 비슷하였으며, callus의 生長상태도 양호하였고 최고 生長기에는 연한 황색을 띠었다 (Table 2). 유식물체의 부위에 따른 callus의 cytokinin 비요구성 정도를 실험하기 위하여 부위별로 유도된 callus들을 cytokinin을 첨가하지 않은 培地에 옮겨 callus 生長 정도를 測定한 結果, 품종 팔공 및 ca 21 공히 전혀 生長을 보이지 않았다. 따라서 품종 팔공과 ca 21 callus의 경우는 유전적으

Table 2. Influence of tissue origin on the cytokinin requirements of *Phaseolus vulgaris* callus tissue

Genotype	Plant part	Fresh weight(g/flask)*	
		5 $\mu$ M Kinetin	Kinetin-free
ca Palgong	Epicotyl	11.0	0.5
	Hypocotyl	11.2	0.5
	Cotyledon	8.3	0.2
	Root	10.5	0.4
ca 21	Epicotyl	16.0	0.7
	Hypocotyl	15.5	0.4
	Cotyledon	12.3	0.4
	Root	13.5	0.3

\* Average fresh weight of eight flasks were determined after a culture period of five weeks.

로 cytokinin 要求性 遺傳子型으로 固定되었음을 알 수 있으며 이와 같은 cytokinin 대사의 특징은 callus가 식물체의 어느 부위에서 유도되었건 간에 관계없이 유전자형 特異性を 보였다. 즉 품종 팔공과 ca 21 callus 培養을 위해서는 exogenous cytokinin 첨가에 의해서만 조직 유도가 가능함을 보여주었다. 이와 같은 結果는 강남콩 품종 담양 callus 조직이 전처리시의 cytokinin 농도에 관계없이 다음 계대배양에서 cytokinin 비요구성 生長을 보인 결과 (Kim *et al.*, 1982)와는 대조를 이루는 것이다. 그러나 cytokinin 要求性を 달리하는 이들 遺傳子型 사이에 생화학적 차이점은 分明하지 않다. Soybean이나 담배의 cytokinin 비요구성 callus 조직들에 있어서 endogenous cytokinin의 생산이 보고된 바는 있지만 (Dyson and Hall, 1972; Einset and Skoog, 1973; Miura and Miller, 1969) 이 結果는 cytokinin 비요구성 조직이 cytokinin 合成 증가와 관련이 있는지, endogenous cytokinin을 不活性化로 전환시키는 정도에 問題가 있는지는 不明치 않다. 또한 이들 種의 cytokinin-dependent callus 조직의 endogenous cytokinin 생산에 關係서는 보고된 바가 없다. 이상의 結果로 볼 때 cytokinin 要求性的 차이는 강남콩 (*Phaseolus vulgaris* L.)의 국내품종 callus 조직배양에 있어서도 再確認할 수 있었으며 이들 cytokinin 요구성을 달리하는 callus 조직들이 endogenous cytokinin 合成의 차이에 기인하는지의 여부는 확실치 않고 앞으로 구명되어야 할 과제로 남는다고 하겠다.

### 摘 要

강남콩 (*Phaseolus vulgaris* L.) 국내품종 16종의 callus 배양을 통하여 cytokinin 要求성에 대한 生長 양상을 研究하였다. 실험에 使用된 국내 품종들 중에서 cytokinin 비요구성 生長을 나타낸 것이 8가지, cytokinin 要求性 生長을 보인것이 5가지였으며 3가지의 중간형이 나타났다. 이 結果로부터 강남콩의 cytokinin 要求성에 대한 유전자형의 존재를 확인할 수 있었다, 또한 cytokinin 要求性 生長의 대표적 遺傳子型으로 품종 팔공 및 ca 21을 선택하여 前처리의 cytokinin 농도를 달리하고 다음 계대배양에서 cytokinin autonomy의 발달 정도와 유식물체의 부위에 따른 cytokinin 要求性 실험을 수행한 결과 어느 경우에 있어서나 cytokinin 要求性 生長 遺傳子型으로 남아있었다. 따라서 품종 팔공과 ca 21 callus

조직의 cytokinin 요구성은 이들 조직의 endogenous cytokinin 생합성 과정의 불활성화에 기인하는 것으로 사료된다.

#### REFERENCES

- Armstrong, D. J., S.-G. Kim, M. C. Mok and D. W. S. Mok. 1981. Genetic regulation of cytokinin metabolism in *Phaseolus* tissue cultures. In *Metabolism and molecular activities of cytokinins*. J. Guern and C. Peaud-Lenoel (eds.), pp.97~104. Springer-Verlag, Berlin.
- Capelle, S. C., D. W. S. Mok, S. C. Kirchner and M. C. Mok. 1983. Effect of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of N<sup>6</sup>-(*D*<sup>2</sup>-isopentenyl)[8-<sup>14</sup>C]adenosine in callus tissues of *Phaseolus lunatus* L. *Plant Physiol.* 73 : 796~802.
- Dyson, W. H. and R. H. Hall. 1972. N<sup>6</sup>-(*D*<sup>2</sup>-isopentenyl)adenosine: Its occurrence as a free nucleoside in an autonomous strain of tobacco tissue. *Plant Physiol.* 50 : 616~621.
- Einset, J. W. and F. Skoog. 1973. Biosynthesis of cytokinins in cytokinin-autotrophic tobacco callus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 : 658~660.
- Kim, S.-G. 1980. Control of cytokinin autonomy in *Phaseolus lunatus* callus cultures. Ph. D. thesis. Oregon State Univ., Corvallis, Oregon.
- , J. H. Song and K. W. Lee. 1982. Hormonal effect and cytokinin autonomy in callus culture of *Phaseolus vulgaris* L. *Korean J. Bot.* 25 : 161~168.
- Miura, G. A. and C. O. Miller. 1969. Cytokinins from a variant strain of cultured soybean cells. *Plant Physiol.* 44 : 1035~1039.
- Mok, M. C. and D. W. S. Mok. 1977. Genotypic responses to auxins in tissue cultures of *Phaseolus*. *Physiol. Plant.* 40 : 261~264.
- , ———, and D. J. Armstrong. 1978. Differential cytokinin structure-activity relationships in *Phaseolus*. *Plant Physiol.* 61 : 72~75.
- , ———, ———, A. Rabakoarihanta and S.-G. Kim. 1980. Cytokinin autonomy in tissue cultures of *Phaseolus*: genotype-specific and heritable trait. *Genetics* 94 : 675~686.
- , ———, S. C. Dixon, D. J. Armstrong and G. Shaw. 1982. Cytokinin structure-activity relationships and the metabolism of N<sup>6</sup>-(*D*<sup>2</sup>-isopentenyl)adenosine-8-<sup>14</sup>C in *Phaseolus* callus tissues. *Plant Physiol.* 70 : 173~178.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473~497.
- Schmitz, R. Y. and F. Skoog. 1970. The use of dimethylsulfoxide as a solvent in the tobacco bioassay for cytokinins. *Plant Physiol.* 45 : 537~538.

(1984. 8. 24. 接受)