

組織培養에 의한 國產茶(茶樹)의 增殖에 관한 研究¹

金 在 生²

Studies on the Propagation of Korean Tea-plant by Tissue Culture¹

Jai Saing Kim²

要 約

茶나무의 增殖으로 우리나라의 茶文化과 茶産業發展에 寄與한 目的으로 茶나무의 葯과 잎, 줄기 등을 各器管別로 나누어 組織培養을 實施하였다. 培養材料中 葯은 大概 4分子期에서 小孢子期の 것을 使用하였으며 培地는 modified Murashige and Skoog의 培地를 基本培地로 하여 여기에 NAA와 2,4-D, Y. E., Kinetin等 生長調節物質을 濃度別로 使用하였으며 材料의 取扱은 常法에 따라 滅菌作業과 microtoming, paraffine method 등에 의해 小孢子的 變化狀態와 組織學的인 觀察을 하였고, 잎과 줄기, 뿌리 등은 各各 切片을 만들어 葯과 同一한 方法으로 滅菌作業하여 modified Murashige and Skoog의 基本培地에 接種하여 여기에서 發生되는 callus와 뿌리의 發生狀態를 調查觀察하였는데 그 結果를 要約하면 다음과 같다. 1) 葯에서는 接種한 100個中 M₂培地에서 2n callus인 體細胞性 callus가 30%로서 第一 많이 發生되었다. 2) 뿌리의 發生은 잎에서는 接種한 잎全體의 切片中에서 1.7本(29.5%)이 發生되었으며, 줄기에서는 6.8本(50.2%) 뿌리에서는 2.5本(44.0%)으로서 줄기에서 第一 많이 發生되었다. 3) 줄기의 分化狀態를 節間別로 보면 4節間中 第二節間이 0.61本(8.8%)으로서 第一 많이 發生되었다. 4) callus의 發生傾向을 보면 葯에서는 葯壁에서, 잎에서는 葉脈에서 起源된 것이 第一 많았다. 以上の 結果로 보아 茶나무의 幼苗는 第三節의 줄기로서 組織培養함으로써 더 많은 增殖을 할 수 있을 것이며 아울러 生産費에 對한 努力과 經費도 節減될 수 있을 것이라고 思料된다.

ABSTRACT

In order to contribute to the Korean tea-plant culture and tea industry by means of increasing the production of tea-plants, I have performed the tissue culture of the organs of the anther, leaf and stem.

As for the culture-material, I have used the anther of tea (*Thea sinensis*) at the tetrad uninucleate microspore stage and used medium of modified Murashige and Skoog as the basal medium supplemented with the growth regulators of NAA and 2, 4-D, yeast, kinetin and others at various concentrations.

As for the handling of material, I have followed the common methods of sterilization and microtoming and paraffine imbedding method and observed systematically periodic changes of the microspores in culture.

I have divided the leaf, stem and root into segments and sterilized them and used the modified Murashige

¹ 接受 9月 22日 Received on September 22, 1986.

² 慶尙大學校 農科大學 College of Agri., Gyeongsang National Univ., Jinju, Korea.

and Skoog as the basal medium and observed the differentiation of roots and callus and the results are as follows.

1. In case of anther, I have found $2n$ callus was found in 30 out of 100 segments in M2 medium.
2. The differentiation of roots appeared in 24.5% of total leaf segments cultured and in 50.5% of stem and in 43.9% of root.
3. When the differentiation of stem in different parts was observed, the most frequent differentiation was found in the second part of all the 4 parts.
4. The most frequent formation of callus was noticed from the anther-walls in case of anther culture and from the veins in case of leaf culture.

It is concluded that the seedlings of tea-plant could be multiplied most by means of tissue culture of the second part of the tea-plant stem and reduction in the expenditures of tea-plant propagation was possible through tissue culture.

Key words; tea-plant; tissue culture; callus; rootlet; growth regulator; organ.

緒 論

植物體의 組織培養에 관한 研究는 Haberandt²⁰⁾가 植物의 組織과 器管을 適當한 培養基에 培養하여 繼續成長한다고 하는 報告가 있었던 以來, 많은 研究 陳述에 依하여 callus가 形成되었다든지 形成된 callus에서 幼植物體가 誘導되었다고 하는 報告 등이 있다. 그러나 생긴 callus의 大部分은 모두가 다 體細胞($2n$)由來의 것이 많았고 小孢子(n)의 것은 얻기가 어렵고 힘들었던 것이다. 또한 最近에 와서는 植物體의 組織中 特히 花粉管이나 花粉粒을 特殊培地에 培養하여 haploid plant를 誘起시켰다고 하는 報告 등이 있다. 即, *Brassica oleraceae* × *Alcogroba*의 F_1 花粉에서 callus가 形成¹⁷⁾되었다고 하는 報告가 있는가 하면, Guha and Maheshwari^{3, 4)}는 *Datura innoxia* Mill의 成熟花粉期의 約을 培養하여 半數性의 Embrioid와 半數體를 作出하였으며 中田, 田中^{21, 22)}는 담배의 約培養에서, 또한 新關, 大野^{23, 24)}는 벼의 約培養에서 各各 haploid plant를 獲得하는데 成功하였고 또한 國內에서는 韓⁶⁻¹³⁾ 등이 一年生 草本植物인 *Solanum nigrum*에서 haploid plant를 誘起시키는데 成功한 일이 있다.

이와 같이 約培養에 依하여 haploid plant를 誘起시키기 爲한 國內外 學者들의 關心이 至大하여진 것은 haploid plant만 誘起되면 母系와 同一한 純系를 가장 短時日內에 많은 量의 幼植物體를 急進的으로 增殖시킬 수 있게 되므로 種子나 育苗生産에 對한 時間과 努力 및 經費가 大幅的으로 節減될 수 있어서 여기에 關한 技術開發의 結果는 產業的으로

모아 그 利得이 크기 때문이다.

林木의 組織培養에 의한 增殖方法에는 約培養 外에도 頂芽나 腋芽 등에 依한 直接的인 培養方法과 不定芽의 形成方法, callus에서의 器官의 再分化方法, callus에서의 不定胚의 形成方法 등 5種類의 方法에 依한 增殖方法이 있다.

첫째로 頂芽나 腋芽에 依한 直接培養方法은 苗條體由來의 幼植物體를 作出하여 이 植物體의 節間部位를 切取培養하여 많은 幼植物體를 作出하는 方法이 있으나 林木의 경우 難點이 많다.

둘째로 不定芽의 形成方法은 生長點이나 葉, 枝條 등의 各 組織片을 培養하여 不定芽를 많이 發生시켜서 苗條體由來의 幼植物體를 作出하여 植物體의 節間部位를 切取하여 培養을 계속시킬 수 있는 方法이다.

셋째로 苗條의 形成方法은 生長點이나 葉柄 등을 培養하므로써 많은 苗條의 原基를 形成시켜 不定苗條를 거쳐 幼植物體를 만들어 내는 方法이다.

네째로 callus에서의 器官의 再分化方法 및 植物體의 各 組織에서 callus를 誘導하여 幼植物體를 形成시키는 方法인데 이 方法은 變異를 誘發시키는 難點이 있다.

다섯째로 callus에서의 不定胚 形成方法 및 callus에서 直接 不定胚를 形成시켜 그 不定胚의 培養에 의하여 幼植物體를 作出하는 方法인데 이 不定胚의 形成은 人工種子의 作出에 必要不可缺하다고 하겠다.

以上의 方法中 遺傳的으로 安定된 幼植物體의 增殖方法은 前三者에 依한 方法이라 하겠다.

林木에서는 增殖을 위한 發芽初期의 幼苗나 胚의 培養에 依한 組織을 利用하면 增殖을 容易하게 한다

고 하는 報告도 있다.³⁵⁾

따라서 本 研究은 供試樹種으로서 經濟性이 높다고 생각되는 樹種인 茶나무의 葯과 잎, 줄기, 뿌리 등의 各 器管을 培養하여 半數性 callus 와 半數性 幼植物體를 作出하는데 對한 基礎的인 試驗으로 現下 우리나라의 綠色産業의 가장 重要한 課題의 하나인 鄉土樹種開發과 大單位 經濟林造成으로서의 茶園造成 施策에 寄與할 目的으로 本 研究을 實施하였던 바 몇가지 結果를 여기에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

材料로 使用한 茶나무의 品種은 小葉種 (*Thea sinensis* Linne var. *macrophylla*) 으로서 慶南 泗川 郡所在의 多率寺에서 採種하여 普州市 株樂洞의 南江邊에 播種育苗하였다.

葯은 10 年生의 uninucleate microspore 期에서 late uninucleate microspore 期에 있는 것을 使用하였고 leaf 와 stem, root 等은 樹高 8 cm 内外로 生長한 當年生의 幼苗를 各 器管別로 길이 5mm, 幅 5mm의 길이로 切片을 만들었으며 95% alcohol에 4 秒 동안 浸漬한 即後 calcium hypochlorite에 15 分間 滅菌한 다음 殺菌水로 씻고 乾燥器에서 殺菌한 petri dish 에 無菌操作으로 葯을 抽出하여 準備된 各 100 個의 test tube 內의 medium에다 各 test tube 마다 10 個씩의 葯을 接種하였으며 培地는 Modified Murashige and Skoog Basal medium (Table 1)에다가 Kinetine, 2,4-D, NAA, Yeast 等 4 種의 生長促進物質을 濃度를 달리하여 添加한 것 (Table 2)을 使用하였으며 이것을 HCl 과 NaOH로 調節하여 모두가 pH 6.0이 되게 調整한 것을 使用하였다.

接種한 葯은 25°C의 black chamber 內에서 培養하였고 培養途中의 變化過程은 每日같이 檢鏡觀察을 하였으며 一週 間隔으로 paraffine imbedding method 와 microtoming method paraffine 切片을 만들어 檢鏡하였으며 培養途中 contamination이

Table 1. Modified Murashige and Skoog's medium.

Component	mg/l
NH ₄ NO ₃	1,650.00
KNO ₃	1,900.00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370.00
KH ₂ PO ₄	170.00
Na-EDTA	74.60
FeSO ₄ ·7H ₂ O	56.60
H ₃ BO ₃	6.20
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.30
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10.60
KI	0.83
Ma ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
Glycine	20.00
Nicotinic acid	5.00
Pyridoxine-HCl	5.00
Thiamine-HCl	201.00
Inositol	30,200.00
Sucrose	20,000.00
Agar	8,000.00

Table 2. Formulas of the growth regulators added to the Basic medium (mg/l)

Kinds of medium	Kinetine	2,4-D	NAA	YE.
M1	5	5	—	—
M2	5	3	—	—
M3	5	3	—	5,000
M4	5	—	5	—

생긴 것은 除去하고 새로운 medium에 移植하여 가면서 培養過程을 觀察하였고 leaf 와 stem, root 도 葯과 同一한 方法으로 滅菌作業을 하여 flasco 內의 hormone 을 첨가한 (Table 2), Murashige and Skoog 의 medium에다가 接種 培養하여 callus 와 rootlet 의 分化過程을 觀察하였다.

結果 및 考察

1. 葯培養에 依한 callus 의 分化

培養途中의 小胞子의 變化狀態를 觀察하여 보면

Table 3. Induction of callus from and 2n by each medium

Kinds of medium	No. of anther inoculated	No. of anther callus induced	Species of callus	(%)
M1	100	6	2n	6
M2	100	30	2n	30
M3	100	6	2n	6
M4	100	14	2n	14

Table 4. Induction of rootlet by each organ

Species of organ	No. of segmentes	No. of rootlet by differentiation	Per. of rootlet by differentiation (%)
leaf	100	1.7	29.45
stem	100	6.8	50.15
root	100	2.5	43.95

培養한 1週日頃부터 變化하기 始作하여 約 1個月이 지난 後 藥隔部位에서 callus가 形成되어(Fig. 4A,B) 時日이 經過될수록 肥大하여졌는데(Fig. 2A,B) callus의 形成은 Table 3에서 보는 바와 같이 M₂ 培地에서 第一 次 되었으며 小胞子의 變化 狀態는 約 1個月 前後가 되면 澱粉粒으로 分化되는데 이것은 小胞子が 澱粉花粉(Fig. 1B)으로 分化되기 때문이라고 생각된다.

그런데 여기에서 發生된 callus는 모두가 2n callus였는데 이것은 金¹⁸⁾이 實驗報告한 바 있는 *Prunus armeniaca*의 藥培養에서는 藥腔内部에서 發生된 callus는 n callus였고, 藥隔이나 藥糸에서 發生된 callus는 2n callus였다는 것과 一致되었다.

따라서 여기에서 發生된 callus(Fig. 4A)이기 때문에 小胞子起源이 아닌 體細胞性 callus이므로 haploid plant를 誘起시킬 可能性은 아직 發見되지 않았다.

2. 잎과 줄기 및 뿌리의 切片培養에 의한

뿌리의 分化

Table 4에서 보는 바와 같이 잎과 줄기, 뿌리 등을 各 器管別로 100個씩의 切片을 100個의 Test tube內에 培養하여 보았던 바 約 1個月이 되면 各 器管마다 原基가 되는 callus(Fig. 5)가 發生되었고 2個月 程度가 되면 이 原基를 中心으로 rootlet가 發生되었는데 잎의 原基에서는 供試切片數에 對해 뿌리를 發生시킨 切片數 29.5%에서 1.7本の rootlet가 發生되었고(Fig. 5) 줄기의 原基에서는 發生切

片數의 50.2%에서 6.8本の rootlet(Fig. 6A)가 發生되었으며 뿌리의 原基에서는 發生切片數의 44.8%에서 2.5本の rootlet(Fig. 6B)가 發生되었다.

따라서 이 3種의 器管培養에서는 줄기에서 第一 많은 rootlet가 發生되었으며 그 다음이 뿌리와 잎의 順으로 發生되었었는데 특히 잎에서는 葉肉보다도 葉脈을 中心으로 더 많이 分化되는 特徵이 있었다.

3. 줄기의 節間別 切片培養에 의한

Rootlet의 分化

各 器管別 切片培養 中에서 줄기의 切片培養에 의한 것이 가장 많은 rootlet가 分化됨을 알 수 있었으나 줄기 中에서 어떤 節間의 줄기에서 가장 많은 rootlet가 分化되는가를 알아보기 위해 10年生의 茶나무 줄기를 頂芽부터 세어 다섯 節間을 節間別로 切片을 만들어 培養하여 보았던 바 그 結果는 Table 5에서 보는 바와 같다.

各 Node 別로 100個씩의 切片을 培養하였는데 callus 化率은 第2節(90.9%)>第5節(88.9%)>第3節(87.9%)>第4節(84.9%)>第1節(57.8%)의 順으로서 第2節의 切片에서 제일 많은 callus가 分化되었다.

또한 rootlet의 分化率은 第2節에서 0.61本(27.0%)>第3節에서 0.53本(26.9%)>第5節에서 0.51本(26.0%)>第4節에서 0.50本(24.9%)>第1節에서 0.21本(51.0%)의 順이였었다.

以上과 같은 結果로 보아 節間別로 보면 第2節이 가장 많은 rootlet를 發生시켰었다.

따라서 茶나무는 第二節의 줄기 切片으로 培養하는 것이 보다 더 많은 幼苗를 增殖할 수 있을 것이라고 思料된다.

Table 5. Differentiated percent of callus rootlet by each node

Node	No. of segments	Per. of callus	Per. of rootlet	No. of roots
1	100	57.8	5.10	0.21
2	100	90.9	26.95	0.61
3	100	87.9	26.85	0.53
4	100	84.9	24.94	0.50
5	100	88.9	25.98	0.51

引用 文 獻

1. 足立初雄・田測會清. 1970. 園藝植物의 약培養により 生じた 칼스의起源. 園藝學會. 秋季. 發表要旨. pp. 224-225.

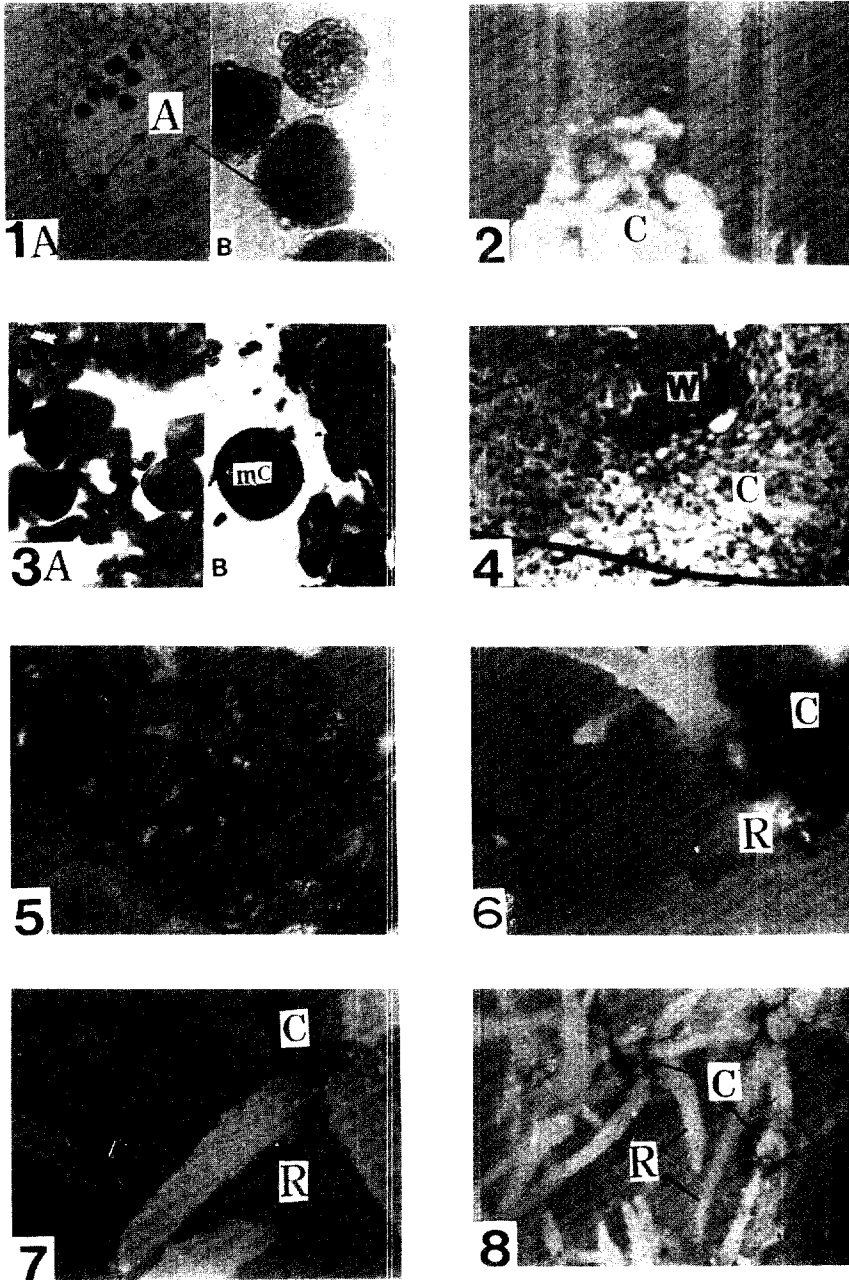


Fig. 1. Cross section of anther (A) and close up of microspores (B).
 Fig. 2. Large callus mass in test tube.
 Fig. 3. Cross section of microspore ungermination and enlargement (A, B; mc).
 Fig. 4. Callus originated microspores (emerging out of anther (A) and microspores derived callus anther wall (W)).
 Fig. 5. The embryoid formation.
 Fig. 6. Rootlet of tea-plant by leaf culture (C; callus, R; rootlet).
 Fig. 7. Rootlet of tea-plant by stem culture (C; callus, R; root).
 Fig. 8. Rootlet of tea-plant by root culture (C; callus, R; root).

2. Deveux, M. 1970. New possibilities for the *in vitro* cultivation of plant cells. *Eurospectro* 9(4): 105-110.
3. Guha, S. and S. C. Maheshwari. 1964. *In Vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204 (57): 497.
4. Guha, S. and S. C. Maheshwari. 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. *Nature* 212 (5057): 97-98.
5. Haberlandt, G. 1902. Kulturversuche mit insolierten pflanzenzellen sit zungeber. *Akad. Viss. Wien. Kl.* 111: 69-92.
6. 韓昶烈. 1969. 藥培養에 관한 研究. 韓國作物學會誌. 7: 161-165.
7. 韓昶烈, 高英瑞, 鄭德教, 金秉煥. 1969. 菜蔬의 藥培養에 관한 研究. (1) 오이의 2倍性 Callus. 韓國園藝學會誌. 6: 25-27.
8. 韓昶烈. 1969. 벼의 藥培養에 관한 研究. 韓國育種學會誌. 1: 1-129.
9. 韓昶烈, 高英瑞, 金文子. 1970. *Nicotiana tabacum*의 藥培養에 관한 研究. 韓國作物學會誌. 8: 117-120.
10. 韓昶烈, 高英瑞. 1970. *Solanum nigrum*의 藥培養에 관한 研究. 韓國育種學會誌. 2: 29-36.
11. 韓昶烈, 黃貞姬. 1970. 벼의 藥培養에 관한 研究. Haploid Callus의 發生 및 分化에 대하여. 護天 李容夏 教授 記念論文集. pp. 71-74.
12. 韓昶烈, 高英瑞. 1970. 벼의 藥培養에 관한 研究. 2. 分化培地에 移植된 Haploid Callus의 發生 및 分化. 韓國植物學會誌 13(3): 17-19.
13. Harn, C. 1971. Studies on anther culture in *Solanum nigrum*. *SABRAO. News letter* 3(1): 39-42.
14. 片山義男, 根井正利. 1964. 植物의 半數性에 관한 研究. 宮崎大學 農學部 育種學 研究室報告. 2: 1-78.
15. 龜谷壽昭. 1967. 花粉からのカルス形成(豫報). 育種 17刷 2: 107.
16. 片山義男, 日向康吉. 1970. *Brassica*의 花粉からの 半數體育成. 日本植物學會誌. 20: 14-19.
17. Kameya, T. and Hinata. 1970. Induction of haploid plants from pollen grains of *Brassica*. *Japan. J. Breeding* 20(2): 82-87.
18. 金在生. 1971. 木本植物의 藥培養에 관한 研究. 韓國林學會誌. 13: 25-39.
19. 前川文夫, 竹内 正, 加藤博文. 1963. 器内培養における胚發生. 植物研究雜誌. 38: 79-104.
20. 村山寛一. 1979. 藥培養で半數體をつくる. 農業及び園藝. 42(6): 971-972.
21. 中田和男, 田中正雄. 1968. 藥の組織培養による花粉からのタバコ幼植物の分化. 日本遺傳學會誌. 43(1): 65-71.
22. 中田和男, 中田正雄. 1968. 花粉の組織培養によるタバコ半數體の育成. 農業及園藝. 43: 685-686.
23. Niizeki, H. and K. Oono. 1968. Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proc. Japan Acad.* 44: 554-557.
24. 新關宏夫, 大野青春. 1968. 藥培養によるイネ半數體の育成. 農業技術. 23: (7)-28.
25. Nishi, T. and S. Mitsuoka. 1969. Occurrence of various ploidy plant from anther and ovary culture of rice plant. *Japan.* 44(6): 341-346.
26. Nisch, J. P. and C. Nitsch. 1969. Haploid plants from pollen Grains. *Science.* 163: 85-87.
27. 西 貞夫, 豊田 努, 大瀨勝次. 1970. ヤく培養の利用に關する研究. 日本園藝學會 春季 研究發表要旨. 166-167.
28. 西 貞夫, 豊田 努, 大瀨勝次. 1970. アブラナ蔬菜のヤく培養に關する研究. 日本園藝試驗 研究年報 2-11.
29. 西 貞夫, 豊田 努, 大瀨勝次. 1970. パラ科蔬菜のヤく培養に關する研究. 日本園藝試驗場 研究年報. 12-16.
30. Sunderland N. and F. M. Wicks. 1969. Cultivation of haploid plants from *tabacco* pollen. *Nature.* 224: 1227-1229.
31. 土井芳憲. 1980. 茶技研. No. 58: 1-9.
32. _____. 1981. 茶技研. No. 60: 1-3.
33. _____. 1983. 茶技研. No. 57: 13-17.
34. _____. 1983. 茶技研. No. 57: 7-11.
35. 齊藤 明. 1986. 組織培養利用による林木のクローン増殖. 林業技術. No. 530: 16-19.
36. Tulecke, W. 1957. The pollen of *Ginkgo*

biloba in vitro culture and tissue formation.
Amer. Jour. Bot. 44 : 602-608.
37. Tulecke, W. 1959. The pollen culture of C.

D. Ra Rue. A tissue from the pollen of
Taxus. Bull. Torrey Bot. Club 86 : 283-
289.