

Cissus juttae 의 Callus 增殖과 不定胚의 誘導

尹 義 洙

日本進化生物學研究所

Study of Callus Formation and Adventitious Embryogenesis in Cultured Explants of *Cissus juttae*

Eui Soo Yoon

The Research Institute of Evolutionary Biology, Kamiyoga-2, Setagaya, Tokyo

Abstract

Explants from stem, leaf and root tissue of *Cissus juttae* were placed on MS medium supplemented different combination of 2·4-D, NAA, Kinetin and BA in a factorial experiment. Some callus formed in every treatment, but the best callus growth was on media containing 1.0 mg/l NAA and 1.0 mg/l BA. Formation of adventitious embryos was evident in callus to MS medium supplemented with 0.1 mg/l.

緒 言

Debergh 等 (1981) 은 組織培養을 利用한 增殖을 위하여 作業 內容을 1) 衛生學的 條件下에서의 母株의 增殖, 2) 無菌培養의 確立, 3) 分裂組織의 中心의 誘導와 芽로 의 發達, 그리고 이들의 빠른 繁殖, 4) 芽로부터의 新條의 伸長과, 5) 를 위한 新條의 增殖, 5) 培地內에서의 安全한 植物

形成과 土壤에서의 순응을 위한 純化의 5 過程으로 區分하였다. 특히 3, 4, 5의 段階는 新品種 育成의 目的面에서 볼때, 많은 問題를 가지고 있다. 그중에서도 組織 培養을 하려고 하는 外植物體의 種類와 組織 또는 器官等에 따라 必要로 하는 生長 調節物質의 作用性에 關하여 檢討하지 않으면 안된다. 不定胚의 研究는 當근 (Steward 등 1958), Ranunculus (Kona, 1965),

Table 1. Growth of callus tissue from explant of *Cissus juttae* on MS medium supplemented different combination of 2·4-D, NAA, Kinetin, BA. Data scored at the growth period 50 days. 10 explant per treatment, + little ; ++ moderate ; +++ considerable ; ++++ intense.

Medium	Growth of callus tissue			%Explants with callus		
	stem	leaf	root	stem	leaf	root
2·4-D(1mg/ℓ)+BA(1mg/ℓ)	+++	++++	+++	100	90	85
NAA(1mg/ℓ)+Kinetin(1mg/ℓ)	+++	+++	+	95	90	75
NNA(1mg/ℓ)	++	++	+	95	85	70
2·4-D(1mg/ℓ)	++	+++	+	100	85	85

가지 (山田 1967), 아스파라가스 (Wilmar 1968), Tyrophora indica(Rao 1970), 호박 (Jelaska 1974), 네부르 오렌지 (Kochba 1973), 아라비아 코피(sondahl 1977) 등에서 행하여져 왔으며, 요즘에는 특히, 人工種子의 면에서 많은 연구가 행하여지고 있다. 본 연구에서는 남아프리카의 原産으로 多肉性 鑑賞植物인 *Cissus juttae*를 利用하여 組織培養에 의한 新品種의 育成과 人工種子의 基礎的 研究를 行하였다. 특히 Callus의 形成과 不定胚의 誘導에 對한 成長 調節物質의 作用性에 對한 檢討를 目的으로 하였다.

材料와 方法

*Cissus juttae*의 잎, 줄기, 뿌리의 3部分을 採取하였다. 採取한 外植體는 水道水로 잘 씻고, 75% 에칠알콜로 1分間 消毒한 後, 바로 滅菌水로 3回 씻었다. 10%

안티호르민으로 15分間 消毒한후, 滅菌蒸溜水로 3回 洗淨하였다. 外植體의 크기는 1cm정도의 크기로 잘라 培養瓶 1개에 1개씩을 正置法으로 置床하였다. Callus 形成과 Callus의 生長條件을 조사하기 위하여 Murashige와 Skoong(MS, 1956) 培地를 基本으로 하여 glucose 4%를 添加하였다. 여기에 植物生長調節物質로써 NAA, 2·4-D, Kinetin, BA를 1mg/ℓ씩 單獨 또는 組合하여 培地 作成時에 添加하였다. 그 組合은 表 1에 表示하였다. 또한 Callus로부터의 증식상태를 알아보기 위해 表 2와 같은 組合으로 培地를 作成하였다. 培地는 0.1~1.0N水酸化나트륨 또는 鹽酸을 利用하여 pH6.3으로 調節하였다. 培地容器는 3.0×6cm의 平底 培養瓶을 使用하여 約 10 ml의 培地를 注入하였다. 이들은 120℃, 1.2 kg/cm의 條件下에서 15分間 滅菌하였다. 培養은 溫度 27℃±2℃, 照度 2,000 Lux, 照明時間 24時間의

Table 2. Growth (fresh and dry weight in mg) of callus tissue from callus tissue of *Cissusus juttae* on Ms medium supplemented with different combination of 2·4-D 1mg/l, NAA 1mg/l, Kinetin 1mg/l, BA 1mg/l. Each figure represents the mean of 10 replicates. Growth period 50 days.

Medium	fresh weight			Dry weightf		
	initial	final	growth value	initial	final	growth value
NAA+Kinetin+BA	233.7 ± 23.71	10402.7 ± 1747.56	44.59 ± 2.871**	19.8 ± 2.01	744.3 ± 60.03	37.33 ± 2.987**
NAA+Kinetin	172.30 ± 18.95	2880.3 ± 195.62	16.84 ± 1.217	14.6 ± 1.61	244.6 ± 16.62	16.56 ± 1.091
NAA+BA	176.0 ± 15.18	8530.7 ± 745.43	48.34 ± 2.406**	14.9 ± 1.27	417.6 ± 36.50	28.03 ± 1.283*
NAA	180.3 ± 13.36	6268.3 ± 295.00	34.86 ± 1.877*	15.3 ± 1.13	357.4 ± 16.82	23.48 ± 1.257**
2·4-D+Kinetin+BA	377.0 ± 59.96	7022.0 ± 521.95	18.76 ± 1.828	32.0 ± 5.08	246.2 ± 18.30	7.81 ± 0.812
2·4-D+Kinetin	263.7 ± 29.62	6989.3 ± 388.46	26.71 ± 2.192*	22.3 ± 2.53	287.4 ± 15.96	13.02 ± 1.123*
2·4-D+BA	375.7 ± 22.45	4867.7 ± 233.92	12.98 ± 0.741	31.7 ± 1.90	201.8 ± 9.68	6.37 ± 0.389
2·4-D	344.0 ± 25.68	2919.3 ± 295.37	8.47 ± 0.485	28.9 ± 2.15	156.0 ± 15.56	5.39 ± 0.341
Kinetin+BA	349.0 ± 34.90	7608.0 ± 438.92	22.10 ± 1.284	29.3 ± 2.93	448.1 ± 25.86	15.35 ± 0.906*
Kinetin	260.7 ± 14.65	2652.7 ± 135.26	10.18 ± 0.308	21.9 ± 1.25	229.1 ± 11.10	10.46 ± 0.310
BA	512.7 ± 58.38	10692.0 ± 1103.44	20.98 ± 1.151	43.1 ± 4.94	216.8 ± 22.38	5.04 ± 0.272

* significant at 5 % level. ** significant at 1% level.

Table 3. Effect of shoot bud formation in callus cultures of *Cissus juttae* on MS medium supplemented with different concentration of 2·4-D 1mg/ℓ, NAA 1mg/ℓ, Kinetin 1mg/ℓ, BA 1mg/ℓ. Each figure is a mean of 10 replicates. Growth period 50 days.

Treatment	%cultures with adventitious embryo	Total No of adventitious embryo	Av.No.of adventitious embryo culture
NAA + Kinetin + BA	30	16	5.33
NAA + Kinetin	90	253	28.11
NAA + BA	70	71	10.14
NAA	80	> 300	> 100
2·4-D-Kinetin-BA	0	0	0
2·4-D-Kinetin	0	0	0
2·4-D-BA	0	0	0
2·4-D	0	0	0
Kinetin-BA	50	24	4.80
Kinetin	70	153	21.86
BA	70	128	18.28
Hormon free	0	0	0

條件下에서 行하였다. 照明에는 白色 螢光灯을 使用하였다. 實驗은 1處理區 10個體의 外植體를 供試하였다. 置床 50日後, 葉, 莖, 根에서의 Callus 形成상태를 調査한 후, NAA(1mg/ℓ)와 Kinetin(1mg/ℓ)를 添加한 培地에서 形成된 Callus를 利用하여 置床 50日後의 Callus의 成長과 不定胚의 誘導의 상황을 檢討하였다.

結 果

Callus의 形成은 置床 후 3週日째 부터

시작되었다. 培養 50日後의 莖, 葉, 根로부터의 Callus 形成狀況을 表1에 나타내었다. 莖으로부터의 Callus 形成이 가장 좋았던 것은 NAA와 Kinetin을 各各 1mg/ℓ를 첨가한 區이고, 葉에서는 2·4-D와 BA를 各各 1mg/ℓ 첨가한 區, 根에서는 NAA와 Kinetin 그리고, 2·4-D를 單獨으로 1mg/ℓ 添加한 區였다. 表1에서 보듯이 葉, 莖, 根의 組織으로 부터의 Callus의 形成을 綜合적으로 比較하여 보면, 莖와 葉에서는 2·4-D와 BA, NAA와 Kinetin을 1mg/ℓ씩 添加한 區사이에 別

차가 없었다. 그러나, 根에서는 2·4-D와 BA를 1mg/ℓ씩 첨가한 區가 다른區보다도 높은 Callus를 形成하였다. 또한 Callus의 形成은 뿌리보다는 잎이나 줄기를 사용하는 것이 좋은 결과를 나타내었다.

組織切片을 사용한 Callus 誘導의 培地에서는 어느 培地에서도 不定胚, 不定根 또는 組織의 再分化는 보여지지 않았다.

Callus의 色은 NAA를 첨가한 培地에서는 綠色을, 2·4-D를 첨가한 培地에서는 黃白色을 나타내었다. NAA와 Kinetin을 1mg/ℓ씩 첨가한 배지에서 얻어진 Callus를 利用하여 Callus의 증식(生重量과 乾燥重量)을 調査한 결과, 表2에서 보여지듯이, NAA를 포함하는 培地에서 눈에 보이는 增殖促進 效果가 보여졌다.

NAA 1mg/ℓ만을 單獨으로 포함하는 區를 예로 볼 경우 生重量에서는 置床때의 약 180mg에서 6,268mg으로, 乾燥重量에서는 약 15mg에서 357mg으로 增加하였다. 또한 NAA 1mg/ℓ에 Kinetin과 BA를 함께 1mg/ℓ씩 첨가한 區가 건조중량, 생중량에 있어서 가장 많은 증식을 보였다. 2·4-D, Kinetin, BA를 각각 單獨으로 1mg/ℓ를 포함하는 區에서의 Callus 증식촉진 效果는 현저하게 낮았으며 특히, 2·4-D에는 BA를, NAA에는 Kinetin을 첨가한 區가 낮은 증식효과를 나타내었으며, NAA에는 BA를, 2·4-D에는 Kinetin을 첨가한 區에서 Callus 증식에 촉진효과를 나타내었다.

Callus의 色은 어느區에서든 NAA를 포함하는 培地에서는 綠色을, 2·4-D를 포함하는 培地에서는 黃白色이었다.

繼代培養한 Callus로부터 不定胚의 再分化가 보여졌다. 不定胚의 再分化는 NAA 1mg/ℓ를 單獨으로 포함하는 區에서 繼代後 3週째부터 分化가 보여졌다. NAA 1mg/ℓ를 單獨으로 포함하는 培地에서 再分化된 不定胚의 數는 셀수 없을 정도로 많았다(表3). 生長調節物質을 포함하지 않는 培地와 2·4-D를 포함하는 培地에서는 不定胚의 再分化는 보여지지 않았다. 不定胚의 再分化가 보여진 培地에서도 生長調節物質을 포함하고 있는 상태에서는 胚以外의 組織이나 器官의 分化는 없었다.

考 察

*Cissus juttae*의 組織片을 培養하여, Callus의 形成과 Callus의 成長 및 器官分化에 미치는 生長調節物質의 影響에 관하여 실험을 행한 結果, 葉, 莖, 根 어디에서나 NAA 또는 2·4-D를 첨가함으로써 Callus의 형성이 가능하지만 특히 葉이나 莖을 사용하는 것이 效果의임을 알았다.

NAA는 Callus의 形成은 물론 Callus의 生長에도 좋은 결과를 보인다. 2·4-D의 경우는 Callus의 形成에는 높은 영향을 미치지만, 일단 形成된 Callus의 成長에는 별 效果가 없음이 밝혀졌다. 또한 NAA에는 BA를 2·4-D에는 Kinetin을 첨가하는 것이 Callus의 成長증식에 영

향이 있음으로 보아 NAA와 BA, 그리고 2·4-D와 Kinetin 사이에는 상호작용 관계가 있는 것 같다. 또한 토마토 또는 아스파라가스 (Wilmar 1968)와 마찬가지로 *Cissus juttae*의 조직의 배양에는 Cytokinin을 포함하지 않는 배지에서 Callus의 형성 및 증식은良好하였다. NAA에 BA를 첨가 했을때의 生重量, 乾燥重量은 NAA 單獨보다 增加하지만, NAA에 Kinetin을 첨가하면 生重量, 乾燥重量 모두가 NAA 單獨보다 낮아졌다. 그러나, NAA에 BA와 Kinetin을 同時에 첨가하면 生重量은 NAA에 BA를 첨가한 때보다 적지만, 乾燥重量은 높은 數値를 나타냈다. 이것은 表 3에서 보여지듯이 Kinetin가 NAA와 함께 할때 不定胚의 形成 또는 치밀한 Callus 形成에 효과가 있지만 BA는 반대로 억제 효과의 효과를 나타내는 것으로 생각되어진다.

不定根과 莖은 Callus에서 직접 形成되어지는 것이 보통이지만, Callus에서 不定胚가 形成되어진 報告는 많지 않다.

Sondal과 sharp(1977)는 *Coffea arabica*의 Callus를 使用하여 生長調節物質이 들어있지 않는 배지에서 不定胚를 形成시켰다. Jelasca(1974)는 Pumpkin의 外植體에서 NAA와 IBA(Indol-3-butyl acid)를 포함하는 배지에서 不定胚를 形成시켰다. 또한 *Citrus sinensis*는 IAA와 Kinetin이 胚의 形成과 生長에 영향이 있음이 報告되어 있다 (Kochiba and Spigel-Roy, 1977), Konar와 Na-

taraja(1969)는 *Ranunculus sceleratus*의 Callus가 CM(coconut milk)를 포함하는 배지에서 不定胚가 形成되어지는 것을 報告하였다.

本 研究에서 *Cissus juttae*는 NAA가 不定胚의 形成에 효과가 있으며 不定胚를 生長調節物質이 들어있지 않은 배지에 續代培養하였을 때, 不定胚에서 다른 不定胚가 增殖되어지는 것이 확인되었다. 또한 2·4-D가 不定胚의 形成에 抑制的으로 작용하는 것은 다른 報告에서와 마찬가지로 本 실험에서도 확인되어졌다. *Cissus juttae*의 Callus에서 不定胚에는 다른 器官이 形成되어지지 않음은 Rao and Naraynswamy(1972), Moyer and Gustine(1984)의 報告와 비슷하였다. 따라서 不定胚에서 다른 기관의 형성에 대한 배지와 Hormone의 효과가 앞으로 研究되어져야 할 것으로 思料된다.

引用文獻

- DEBERGH, P. C and L. J. MAENE. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Sci. Hortic.* 14:335-345.
- JELASKA, S. 1974. Embryogenesis and organogenesis in pumpkin explants. *Physiol. Plant.* 31:257-261.
- KOCHBA, J and P. SPIEGEL-ROY. 1973. Effect of culture media on embryoid formation from ovular

- callus of 'Shamouti' orange *Citrus sinensis*. Z. Pflanzenzücht. 69:156-162.
- KOCHIBA, J and P. SPIGEL-ROY 1977. The effects of auxins, cytokinins and inhibitors on embryogenesis in habituated ovular callus of the 'Shamouti' orange *Citrus sinensis*. Z. Pflanzenphysiol. 81:283-288.
- KONAR, R. N and K. NATARAZA 1965. Experimental studies in *Ranunculus sceleratus* L. Development of embryos from the stem epidermis. Phytomorphology. 15:132-137.
- KONAR, R. N and K. NATARAZA 1969. Morphogenesis of isolated floral buds of *Ranunculus sceleratus* L. in vitro. Acta. Bota. Neerl. 18:680-699.
- MOYER, B. G and D. L. GUSTINE 1984. Regeneration of *Coronilla varia* L. (crownveatch) plants from callus culture. Plant Cell Tissue Organ Culture. 3:143-148.
- RAO, P. S and S. NARAYASWAMY 1972. Morphogenic investigation in callus culture of *Tilophora indica*. Physiol. Plant. 27:171-276.
- SONDAHL, M. R and W. R. SHARP 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Z. pflanzenphysiol. 81:395-408.
- STEWART, F. C., M. O. MAPES and K. MEARS 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. Am. J. Bot. 45:705-708.