

가중나무의 形成層 Callus에서 植物體 再分化^{1*}

李相求² · 朴龍求²

Plant Regeneration from Cambium Callus of *Ailanthus altissima* Swingle^{1*}

Sang Goo Lee² and Young Goo Park²

要 約

가중나무(*A. altissima*, heaven tree)의 形成層 組織에서 callus을 誘導하여 植物體를 再分化시키는데 必要한 諸要因을 調査하였다.

callus 誘起가 가장 좋은 培地 組合은 MS 基本培地에 2,4-D 1.0 mg/l와 BAP 0.1 mg/l를 添加한 組合 이었으며, 誘起된 callus의 增殖도 같은 組合에서 좋은 結果를 얻었다. callus에서의 재분화는 MS 基本 培地에 2,4-D 0.01mg/l와 BAP 0.5 mg/l 添加한 組合 培地에서 平均 5.0개의 줄기를 얻어서 가장 높은 분화율을 관찰할 수 있었다. 재분화된 줄기를 1/2 MS 基本培地에 移植하였을때 전부 發根되었으며, 發根된 植物體는 pot로 移植하여 活着시켰다.

ABSTRACT

The stem segments of *Ailanthus altissima* were cultured on the Murashige & Skoog's medium(1962) supplemented with 0.1 mg/l BAP and 1.0 mg/l 2,4-D for callus induction and proliferation.

Shoot primordia were observed as greenish regions on the surface of yellow-brown calli about 8 weeks after culture. Shoot primordia were selected and transferred to the MS media containing various combination of BAP and 2,4-D. Among these combinations the shoot primordia cell clusters on the medium added to 0.5 mg/l BAP and 0.01 mg/l 2,4-D exhibited the highest number of shoot formation. These shoots were successfully transferred on the solid MS medium with no growth regulators for the rootings.

Key words : *Ailanthus altissima*, cambium callus, shoot primordia, regeneration

Abbreviations : BAP(6-benzylaminopurine), 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid), 2ip(N-isopentenylaminopurine)

緒 論

林木의 組織培養 研究는 여러 分野 즉 優良 林木의 大量增殖, 有用 遺傳子 導入에 依한 形質轉

換(Steffen *et al.*, 1986; Jordan and McHughen, 1988), 突然變異體 誘起 (Ingram and Macdonald, 1986; Douglas, 1976), 原形質間 融合에 依한 體細胞 雜種體 創出 (Vardi *et al.*, 1987; Grosser *et al.*, 1988a; 1988b) 등에 많은

¹ 接受 1989年 10月 10日 Received on October 10, 1989

² 慶北大學校 林學科 Dept. of Forestry, Kyungpook National University, Daegu, Korea.

* 本 研究는 慶北 大學校 遺傳工學 研究所 研究費에 依해 이루어진 것임.

成果를 올리고 있다. 이러한 커다란 發展의 基礎가 되는데 必要한 것은 目的 植物의 脫分化 및 再分化 技法를 確立하는 것이다. 林木의 組織培養에 依한 脫分化 및 再分化에 對한 成敗는 樹種에 따라 큰 差異를 나타낸다. 一般적으로 一年生 草本植物보다 永年生인 木本植物에서는 再分化率이 매우 낮은 것이 많다. 또한 闊葉樹는 針葉樹보다 脫分化 組織에서 再分化가 쉽게 이루어지는 것으로 알려져 있다.

포푸라(Park and Son, 1988; Russel and McCown, 1986), 느릅나무(Sticklen *et al.*, 1986), 자작나무(Ahuja, 1984), 오동나무(齊藤, 1976), 참죽나무(崔 等, 1986) 등의 闊葉樹 callus에서 再分化에 對한 報告가 있으며, 針葉樹에서는 테다 소나무(Mott and Amerson, 1981), *Pinus contorta* (Patel and Thorpe, 1984)와 스트로브 잣나무(Kaul and Kochhar, 1985)의 callus에서 再分化가 報告된 바 있다.

一年生 草本植物에 비해 永年生 木本植物의 脫分化와 再分化가 어려운 것으로 알려져 있는데 이들 細胞 代謝 및 細胞內 蓄積物質의 差異等 生理機作이 다르기 때문인 것으로 推定하고 있다(朴, 1986).

本 研究은 오래전에 中國에서 導入되어 우리나라 全國 各處에 分布하며 脊簿地에서도 生育이 旺盛하고, 街路樹와 家具材로 널리 利用되며 公害와 耐病性이 強해 綠陰樹로도 脚光을 받고 있을 뿐만 아니라 最近 生藥的 價値가 있다고 알려진(Anderson *et al.*, 1986; 1987) 가중나무(*Ailanthus altissima*)에 對해 脫分化 및 再分化에 미치는 諸要因들을 調査하였다. 本 研究의 目的은 有用 林木의 再分化와 脫分化에 對한 基礎資料를 얻는 데 있다.

材料 및 方法

本 實驗에 使用된 材料는 慶北大學校 校內에 自生하는 약 20餘年生 野外個體의 當年生 가지를 6월에 採取, 흐르는 水돛물에서 2時間 정도 水洗하여 70% Et-OH로 1分間 消毒한 後 滅菌水로 3回 水洗하였다. 다시 1% 차아염소산나트륨(NaClO)으로 10분간 消毒하고 滅菌水로 2回 水洗, 1% 과산화수소수(H₂O₂)로 10분간 消毒한 後

다시 滅菌水로 5回 水洗하였다. 消毒된 試料는 表皮를 벗겨낸 다음 形成層을 包含한 組織을 약 1cm 크기로 잘라 2,4-D와 4가지 cytokinin 즉 BAP, zeatin, 2ip, kinetin을 濃度別로 組合한 MS 基本培地에 置床, 26±1°C에서 暗狀態로 4週間 培養하여 callus를 誘起하였다. 배양培地는 MS 基本培地에 sucrose 30 g/l, 한천 7.5 g/l, pH는 한천을 넣기전 5.6으로 調整한 後 121°C에서 15분간 滅壓 蒸氣殺菌하였다. 모든 實驗은 3反復 實施하고 callus 誘起程度는 培養 4週後 肉眼에 의한 觀察로 그 結果를 나타내었다.

誘起된 callus는 繼續的인 生長量을 調査하기 위하여 生重量을 測定하여 같은 組合의 培地에 4주동안 26±1°C, 培養室內에서 약 2,500 lux 정도의 螢光을 1일 16시간 照射한 곳과 暗狀態下에서 培養하였다. 誘起된 callus의 生重量 200~250 mg을 2,4-D(0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l)와 4가지 cytokinin (BAP, 2ip, zeatin, kinetin; 각각 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l)을 組合한 MS 基本培地에 移植하여 培養 3주후에 callus 生重量을 調査하였다. 增殖된 callus는 3주 後의 生長量에서 처음 接種時의 生重量을 減한 나머지를 計算하여 生長量을 調査하였다.

增殖된 callus는 줄기의 分化를 위해 auxin의 含量을 낮추고 反面에 cytokinin의 含量을 增加시킨 組合 培地에 옮기어 줄기의 分化率을 調査하였다. 增殖된 callus를 약 100 mg정도씩 떼어 MS 基本培地에 BAP 單用 또는 2,4-D의 含量을 낮추고 BAP의 濃度를 높인 培地가 든 三角 flask에 3단편씩 移植하여 光照射 下에서 배양한 뒤 8주후에 형성된 줄기의 數를 조사하였다. 그리고 分化된 줄기는 發根을 위해 MS 基本培地와 1/2 MS 培地에 移植하여 發根을 誘導하였다.

結果 및 考察

가중나무(*A. altissima*)의 當年生 가지를 消毒하여 얻은 形成層 組織을 2,4-D와 4가지 cytokinin을 濃度別로 組合한 MS 基本培地에 置床한 結果 4週 後에 表 1과 같았다. callus는 2週 後부터 서서히 誘起되기 始作하여 4週 後에는 大部分의 置床 材料에서 誘起程度의 差異가 確實하게 나타났다.

Table 1. Influence of 2,4-D and various cytokinins on callus formation from the cambium of *A. altissima* cultured *in vitro* for 4 weeks

Growth regulators(mg/l)			Callus		Induction*	
2,4-D	Cytokinin	BAP	2iP	Zeatin	Kinetin	
0.0	0.0	-	-	-	-	
	0.1	+	+	-	-	
	0.5	-	-	-	-	
	1.0	-	-	-	-	
	2.0	-	-	-	-	
0.1	0.0	-	+	+	-	
	0.1	+	++	+	+	
	0.5	+	+	+	-	
	1.0	+	+	+	-	
	2.0	-	+	-	+	
0.5	0.0	- + - (f)**	+-	++	+	
	0.1	++	++	++	+	
	0.5	+++ (s)	++	-	++	
	1.0	+++ (c)	++	-	-	
	2.0	++	-	-	-	
1.0	0.0	+ - + (f)	- -	+++ (f)	+	
	0.1	+ - + - (f)	- - - (f)	+++ (s)	++	
	0.5	+ - + (s)	+ - + (f)	++	++	
	1.0	+++ (c)	+++ (s)	++	++	
	2.0	++	++	+	+	
2.0	0.0	++	++	+ - + (f)	+	
	0.1	++	+-	+-	+	
	0.5	+	+	+	+-	
	1.0	++	++	+	-	
	2.0	+	+	+	-	

*Visual estimation : - no response, + little, +- moderate, - + - good, + + + excellent
 **f : friable, s : semi-rigid, c : compact

表1에서 보는 것과 같이 2,4-D나 cytokinin이 전혀添加되지 않은 比較區에서는 callus가 거의 誘起되지 않았으며, 또 cytokinin 單用 處理區에서도 callus가 誘起되지 않거나 誘起정도가 상당히 貧弱하게 나타났다. 반면에 2,4-D와 cytokinin을 組合한 培地에서는 比較區나 cytokinin 單用 處理區 보다 callus 誘起 狀態가 좋았는데 2,4-D의 含量이 增加하고(0.1, 0.5, 1.0mg/l), cytokinin의 含量이 減少할수록(1.0, 0.5, 0.1 mg/l) callus 誘起가 良好한 것으로 나타났다. 그러나 2,4-D의 含量이 높은 處理區(2.0mg/l 以上)에서는 callus 誘起狀態가 좋지않은 것으로 나타났다.

本 實驗에서 가장 良好한 callus 誘起를 나타낸 組合은 2,4-D 1.0mg/l와 BAP 0.1 mg/l의 組合으로서 callus가 매우 柔軟하며 밝고 軟한 노란색을 띠었다. 本 實驗의 觀察 結果 2,4-D의 含量이 增加함에 따라 callus가 柔軟하고 밝은 色을 띠는

反面 cytokinin의 含量이 增加할수록 callus가 딱딱하고 어두운 色을 띠었다.

Suezawa 等(1988)이 Kiwifruit의 callus 배양에 있어서 2,4-D를 使用하였을 境遇 callus가 물기가 많고 부드러우며 그리고 柔軟하고 부서지기 쉬운 反面 NAA를 使用하였을 경우에는 乾燥하고 단단하며 그리고 작은 덩어리가 생겼다고 報告한 바 있는데 이는 本 研究의 結果와 비슷하다. 또한 현사시나무(Park and Han, 1986; 朴과 孫, 1988), 양황철나무(Park and Son, 1988), 버드나무(朴等, 1989) 등에서도 cytokinin인 BAP나 zeatin 보다 auxin인 2,4-D가 많이 첨가된 培地에서는 callus 생장이 훨씬 빠르며 成長 樣相도 좋게 나타나서 本 研究와 같은 結果를 나타냈다.

置床 4주 後 誘起된 callus의 生重量 200~250 mg을 再分化 培地에 移植한지 3주 後에 callus의 生長量을 調査한 結果는 그림 1, 2, 3, 4와 같다.

이들 그림에 나타난 것과 같이 callus의 增殖은

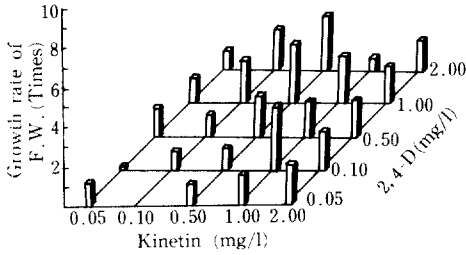


Fig. 1. Effect of kinetin and 2,4-D on callus growth of heaven tree cultured in vitro for 3 weeks

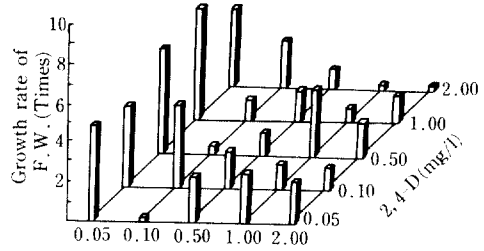


Fig. 2. Effect of zeatin and 2,4-D on callus growth of heaven tree cultured in vitro for 3 weeks

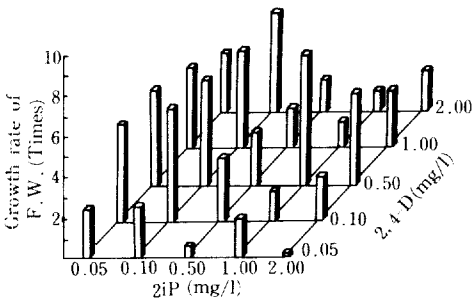


Fig. 3. Effect of 2ip and 2,4-D on callus growth of heaven tree cultured in vitro for 3 weeks

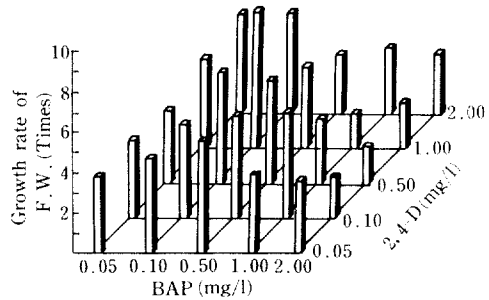


Fig. 4. Effect of BAP and 2,4-D on callus growth of heaven tree cultured in vitro for 3 weeks

2,4-D와 BAP 組合에서 比較的 良好한 反應을 나타냈는데 그중 제일 좋은 反應을 나타낸 組合은 callus 誘起組合과 同一한 2,4-D 1.0 mg/l BAP 0.1 mg/l에서 배양 4주 후에 처음 생중량의 약 6배에 達하는 增殖率을 나타냈다(그림 4).

반면에 2,4-D와 kinetin의 組合(그림 1)에서는 callus 生長이 매우 不良하였으며, zeatin 組合(그림 2)에서는 zeatin 濃도가 0.05 mg/l 일때 大體的으로 callus 生長이 良好하였다. 그리고 2ip 組合(그림 3)에 있어서도 2ip의 濃도가 0.05 mg/l와 0.1 mg/l 일때 callus 生長이 양호하였다. 그러나 各各의 cytokinin 濃도가 1.0 mg/l 以上인 培地에서는 callus의 生長이 매우 不良함을 觀察할 수 있었다.

한편 callus의 暗培養下에서 生長量을 調査한 結果는 光照射 下에서의 生長量과 거의 差異가 없었으나 增殖速度가 약간 빠르며 光狀態 下에서의 callus 색깔이 밝고 軟한 노란색인데 비해 暗狀態에서 배양한 callus는 밝고 透明하였다(그림 5). 그러나 Suezawa 等(1988)은 Kiwifruit callus 배양에 使用된 auxin 뿐만 아니라 培養條件(暗 培

는 明培養)에 따라 callus의 生重量이 다르다고 報告하였다. 이는 본 연구 結果와 다르며 수중에 따른 生理反應의 차이에 起因된 것으로 推定된다.

增殖된 callus를 再分化 培地로 移植한 後 약 6週가 지나서부터 形態形成이 일어나기 始作하였다. 增殖된 callus로부터의 形態形成은 처음에 부드럽고 부서지기 쉬운 軟한 노란색의 callus가 漸次 딱딱해지면서 녹색을 띠거나, 褐色을 띠면서 줄기原基가 發生하기 시작하였다(그림 6). 이러한 사실은 體細胞胚 形成 callus는 生長이 低調하고 callus 內 細胞의 結合狀態가 組密하다(Lupotto, 1983; Armstrong and Green, 1985)는 特徵과 一致한다.

그리고 줄기의 原基는 漸次로 生長하여 줄기 生長點과 葉原基를 形成하면서 줄기원기 發生 後 약 3주 後에 完全한 줄기形態로 자랐다(그림 7). 또한 줄기형성은 한개의 줄기 原基로부터 한개의 줄기가 形成되는 것과 한개의 줄기 原基에서 여러개의 줄기가 형성되는 것을 觀察할 수 있었다. 형성된 줄기를 동일한 조합의 培地로 繼代培養해 주었을 때 많은 수의 줄기를 形成하였다(그림 8).

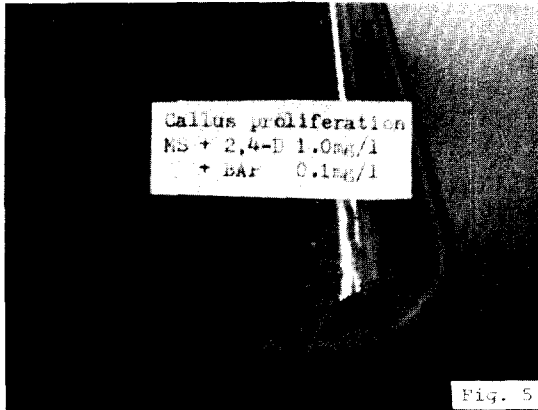


Fig. 5

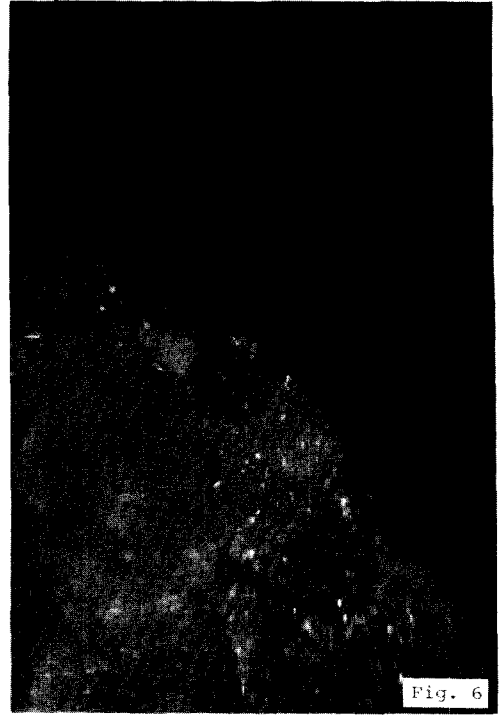


Fig. 6



Fig. 7

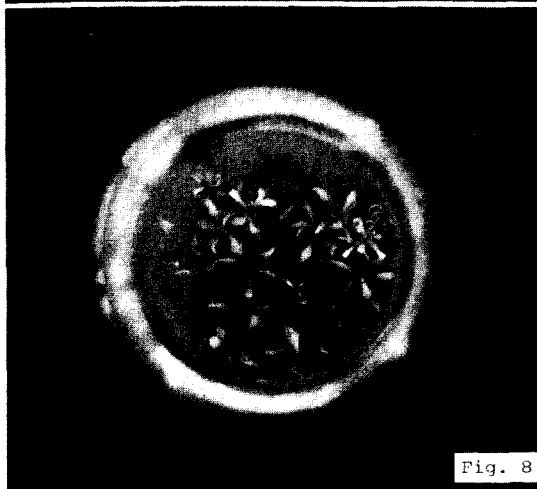


Fig. 8

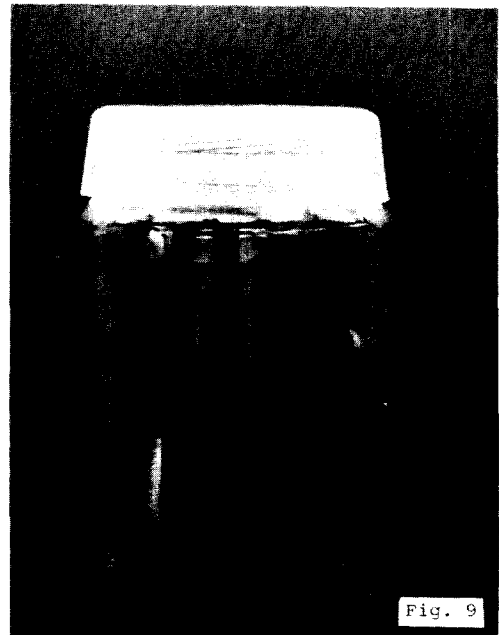


Fig. 9

Fig. 5. Proliferated callus on MS medium with BAP 0.1 mg/l + 2,4-D 1.0 mg/l

Fig. 6. Protruded shoot primordia (arrow) from the callus surface (x 12.5)

Fig. 7. Further development of shoot primordia (x 31.5)

Fig. 8. Formation of multiple shoots

Fig. 9. Regeneration of whole plantlet on MS + BAP 0.5 mg/l, 2,4-D 0.01 mg/l

Table 2. The number of shoots derived from callus cultured on MS medium with different concentrations of 2,4-D and BAP for 8 weeks

Growth Regulators(mg/l)		Number of Shoots(Mean±SE)
2,4-D	BAP	
0.00	0.10	2.0±0.58*
	0.25	2.7±0.89
	0.50	3.4±1.45
	0.75	2.3±0.33
	1.00	2.3±1.45
0.01	0.10	—**
	0.25	2.7±0.67
	0.50	5.0±1.15
	0.75	4.0±0.58
	1.00	2.0±0.34

* Each value represents the mean±SE of 3 replications

**no response

이러한 줄기의 형성에 있어서 植物 生長 調節物 質의 效果에 對한 結果는 表 2에 나타나 있다. 이 결과에서 보면 줄기의 형성은 2,4-D 0.01 mg/l와 BAP 0.5 mg/l일때 平均 5.0개의 줄기가 發生하였으며, 2,4-D와 BAP가 高濃度로 (各各 0.5 mg/l, 2.0 mg/l 이상) 添加된 培地에서는 전혀 形態形成이 觀察되지 않았다. 포루라의 再分化 경우 2,4-D와 cytokinin를 複合處理한 것보다 BAP 단독 처리에서 좋은 結果를 얻었다고 보고(朴과 孫, 1988)한 바 있는데 이는 樹種間에 差異가 심함을 알 수 있다.

한편 形成된 줄기가 一定한 크기(약 2 cm) 이상이 되었을때 이 줄기를 MS 基本培地와 1/2 MS 培地에 移植한 뒤 약 2주 後부터 置床된 모든 줄기에서 發根이 始作되었다(그림 9).

MS 基本培地와 1/2 MS 培地에 移植한 植物體는 培地間 差異없이 100% 發根되었다. 發根된 器內苗는 培養室에서 1개월간 배양한 후 vermiculite와 perlite를 40:60으로 配合한 土壤에 移植하여 適當한 溫度와 濕度を 維持 시켰을때 계속 生長하였다. 뿌리가 잘 발달된 植物體는 pot에 移植하여 完全한 活着苗를 얻을 수 있었다.

引 用 文 獻

1. Ahuja, M.R. 1984. *In vitro* induction of organogenesis in juvenile and mature beech.

Silvae Genetica 33(6) : 214-242.
 2. Armstrong, C.L. and C.E.Green. 1985. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and involvement of L-proline. *Planta* 164 : 207-214.
 3. Anderson, L.A., C.A.Hay, M.F.Roberts and J.D.Phillipson. 1986. Studies on *Ailanthus altissima* cell suspension cultures - Precursor feeding of L-[methylene- 14 C] tryptophan and L-tryptophan. *Plant Cell Reports* 5 : 387-390.
 4. Anderson, L.A., M.F.Roberts and J.D. Philipson. 1987. Studies on *Ailanthus altissima* cell suspension cultures - The effect of basal media on growth and alkaloid production. *Plant Cell Reports* 6 : 239-241.
 5. 崔龍義·呂邑東·蘇雄永. 1986. 참죽나무 (*Cedrela sinensis* Jess) 줄기의 切片 callus로부터 體細胞胚 形成과 植物體 再生. 植物組織培養學會誌 13 : 61-70.
 6. Douglas, G.C. 1986. Effects of gamma radiation on morphogenesis and mutagenesis in cultured stem explants of poplar. Pages 121-128 in *Nuclear Techniques and In Vitro Culture for Plant Improvement*. [eds., IAEA (International Atomic Energy Agency), Vienna]. Proceeding of A Symposium, Vienna, 19-23 August 1985, Jointly Organized by IAEA and FAO
 7. Grosser, J.W., F.G.Gmitter, Jr., and J.L. Chandler. 1988a. Intergeneric somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* cv. Hamlin and *Poncirus trifoliata* cv. Flying Dragon. *Plant Cell Reports* 7 : 5-8.
 8. Grosser, J.W., F.G.Gmitter, Jr., and J.L. Chandler. 1988b. Intergeneric somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species *Citrus sinensis* and *Severinia disticha*. *Theor. Appl. Genet.* 75 : 397-401.
 9. Ingram, D.S. and M.V.Macdonald. 1986. *In vitro* selection of mutants. Pages 241-258 in *Nuclear Techniques and In Vitro Culture for Plant Improvement*. [eds., IAEA (International Atomic Energy Agency), Vienna]. Proceeding of A Symposium, Vienna, 19-23 August 1985,

- Jointly Organized by IAEA and FAO
10. Jordan, M.C. and A. McHughen. 1988. Transformed callus does not necessarily regenerate transformed shoot. *Plant Cell Reports* 7 : 285-287.
 11. Kaul, K. and T.S.Kochhar. 1985. Growth and differentiation of callus cultures of *Pinus*. *Plant Cell Reports* 4 : 180-183.
 12. Lupotto, E. 1983. Propagation of embryogenic culture of *Medicago sativa* L. *Z. Pflanzenphysiol.* 111 : 95-104.
 13. Mott, R.L. and H.V. Amerson. 1981. A tissue culture process for the clonal production of loblolly pine plantlets. *North Carolina Agr. Res. Service Tech. Bull. No. 271* : 1-14.
 14. Murashige, T. and F.Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.
 15. 朴龍求. 1986. 林業과 biotechnology. 韓國 農業科學 協會. '86 農業科學 심포지움 pp. 79-102.
 16. Park, Y.G. and K.H.Han. 1986. Isolation and culture of mesophyll protoplasts from *in vitro* cultured *Populus alba* x *P. glandulosa*. *Jour. Korean For. Soc.* 73 : 33-42.
 17. Park, Y.G. and S.H.Son. 1988. *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis from punctured leaf of *Populus nigra* x *P. maximowiczii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 15 : 95-105.
 18. 朴龍求·孫聖鎬. 1988. 현사시나무 器內배양 葉肉組織에서 分離된 原形質體 培養 및 植物體 再分化. 韓國林學會誌 77(2) : 208-215.
 19. 朴龍求·申東逸·李相求. 1989. 버드나무 (*Salix koreensis*) 懸濁培養 細胞의 代謝 產物. 韓國 林學會誌 78(2) : 198-208.
 20. Patel, K.R. and T.A.Thrope. 1984. *In vitro* differentiation of plantlets from embryogenic explants of lodge pole pine(*Pinus contorta* Dough. ex Loud). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 3 : 131-142.
 21. Russel, J.A. and B.H.McCown. 1986. Culture and regeneration of *Populus* leaf protoplasts isolated from non-seedling tissue. *Plant Science* 46 : 133-142.
 22. 齊藤 明. 1976. 키리와 포플라 葉肉組織 からの 프로플라스트의 分離. 日林誌 58 : 301-305.
 23. Steffen, A., T.Eriksson and O.Schieder. 1986. Shoot regeneration of mesophyll protoplasts transformed by *Agrobacterium tumefaciens*, not achievable with untransformed protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* 72 : 135-140.
 24. Sticklen, M.B., S.C.Domir and R.D.Lineberger. 1986. Shoot regeneration from protoplasts of *Ulmus* x 'Pioneer'. *Plant Science* 47 : 29-34.
 25. Suezawa, K., W.Matsuta, M.Omura and S. Yanaki. 1988. Plantlet formation cell suspensions of Kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planch. var. *chinensis*). *Scientia Horticulturae* 37 : 123-128.
 26. Vardi, A., A. Breiman and E.Galun. 1987. *Citrus* cybrids : production by donor-recipient protoplast fusion and verification by mitochondrial-DNA restriction profiles. *Theor. Appl. Genet.* 75 : 51-58.