

# 초피나무(*Zanthoxylum piperitum* DC.)의 器內增殖 - II. $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , $\text{KNO}_3$ Casein hydrolysate의 기내 부정배 발생 효과 -

송원섭, 지형준<sup>1)</sup>

순천대학교 원예학과

<sup>1)</sup>서울대학교 천연물과학연구소

## In Vitro Propagation of *Zanthoxylum piperitum* DC.

### - II. Effect of $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , $\text{KNO}_3$ and Casein hydrolysate on Somatic Embryogenesis -

Won-Seob Song and Hyung Joon Chi<sup>1)</sup>

Dept. of Horticulture, Suncheon National Univ., Suncheon 540-742, Korea

<sup>1)</sup>National Products Research Institute of Seoul National Univ., Seoul 110-460, Korea

#### Abstract

Embryogenic callus induced from shoot tip and leaf segment of *Zanthoxylum piperitum* for producing somatic embryogenesis and plant regeneration were cultured in vitro on Murashige and Tucker's (MT) medium treated with casein hydrolysate  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$  and plant growth regulator. The most effective somatic embryogenesis was observed in the medium added by two fold  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ (3300mg/l)+2, 4-D 0.1mg/l and  $\text{KNO}_3$ (3800mg/l)+2,4-D 0.1mg/l. Also, MT medium supplemented with casein hydrolysate 700mg/l added by 2, 4-D 0.1mg/l were effective in obtaining somatic embryos from embryogenic callus. The effect of MT medium supplemented with casein hydrolysate without 2, 4-D was lower than that with 2, 4-D for the formation of somatic embryos.

Key words : *Zanthoxylum piperitum*, somatic embryogenesis, plant regeneration.

#### 緒 言

天然의 自然狀態에서 植物의 不定胚 發生은 모두 胚珠組織의 각 細胞에서 不定胚, 有性胚, 無性胚 등이 發生하지만 器內 胚의 發生은 많은 種類의 植物에서 胚를 發生할 수 있는 潛在力을 가지고 있기 때문에 培養條件만 갖추어주면 胚를 發生시킬 수 있다<sup>10,14)</sup>. 또한 器內 胚를 얻기 위하여 조직배양을 할 때 培養材料로서 未熟胚, 胚軸, 珠心組織, 花器등 胚裏에 가까운 部位를 썼을때에 胚發生이 잘된다는 事實은 胚裏에서 자란 未熟胚는 胚發生의 潛在力이 다른 部位의 組織보다 強하기

때문이다. 하지만 最近들어 胚裏의 가까운 組織과 細胞에서 뿐만 아니라 줄기나 잎, 新梢頂端과 잎의 培養 組織片으로부터 embryogenic callus를 誘起하고 이러한 embryogenic callus로부터 不定胚를 發生시키는 適程에 있어 適合한 培養組織 部位의 選定, 織物生長調節物質, 有機物과 炭素原의 添加效果 등을 究明하였으나 embryogenic callus로부터 不定胚를 發生에 있어 2, 4-D, malt extract, 活性炭과 sucrose의 添加 效果의으로 나타났으나 다른 植物生長調節物質과 有機物の 添加效果는 별로 나타나지 않았으므로 培地의 組成을 달리 하거나 다른 有機物을 添加하여 좀더 胚發生을 促進할 수

있는 방법이 필요하다<sup>11,14</sup>).

不定胚의發生에 差異가 나는 原因으로서는 培地 組成에 있어 窒素源, K源, Ca源, 아미노산, 비타민과 鹽類 등의 添加量의 差異에 있다는 報告가 있다<sup>16,17</sup>).

器內 不定胚를 發生시키는 데 많이 사용되는 MS, MT培地는 窒素가 ammonium nitrate 形質로 들어 있기 때문에 많은 植物의 培養細胞에서 胚를 發生시키는데 사용되었다. 窒酸鹽과 還元型 窒素는 세포를 embryogenic하게 하고, 原胚를 誘起시키며, 胚가 성장, 발육하는데 必須적인 것으로 알려져 있는데 Halperin and Wetherell<sup>8</sup>은 野生당근의 培養시 ammonium이 含有된 培地에서는 單細胞들만 나타났다고 報告하였다. 또한 Halperin<sup>9</sup>은 *Nathoscordum fragrans*의 不定胚 發生에서 ammonium과 casein hydrolysate는 窒酸과 glutamine에 비하여 胚發生을 強하게 刺戟한다고 보고하였다.

따라서 본 實驗에서도  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ 와 casein hydrolysate의 添加量을 달리하여 embryogenic callus로부터 器內 胚發生을 促進할 수 있는 方法을 開發하고자 본 實驗을 遂行하였다.

### 材料 및 方法

前報<sup>15</sup>의 實驗에서 2, 4-D 0.5-1.0mg/l를 添加시킨 MT 培地에서 얻어진 non-embryogenic callus와 embryogenic callus를 無菌室의 解剖顯微鏡下에서 分離, 選別하여 前報의 實驗에서 embryogenic callus로부터 不定胚 發生이 가장 良好하였던 2,4-D 0.1mg/l를 添加시킨 MT 培地에  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 의 添加量을 各各 950, 1900, 3800, 5700mg/l로 調節한 培地와 MT 培地에 2,4-D를 添加시키지 않고  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ 의 添加量을 各各 달리한 培地, casein hydrolysate(CH)의 添加量은 各各 100, 300, 500, 700mg/l 添加시킨 MT 培地와 여기에 2,4-D 0.1mg/l를 各各 添加시킨 培地에 置床하였다.

置床用器는 100ml 삼각 플라스크를 使用하였으며 各 處理區당 30개씩 置床하여 2回 反復하였다. 이때 MT 培地에는 8g/l agar와 50g/l sucrose를 添加하였으며 autoclaving前에 pH는 5.7~5.8로

調節하였다.

培養條件은 螢光燈을 光源으로하여 1日 16時間 1500±200lux의 光周期로하여 27±2°C의 培養室에서 培養되었으며 培養 8週後 embryogenic callus로부터 不定胚의 發生과 生育狀態를 調査하였다.

### 結果 및 考察

器內 胚發生에서 auxin以外에 窒素의 形態가 重要한데 還元型 窒素, 특히  $\text{NH}_4^-$ 는 더욱 重要하다.

MT 培地와 2, 4-D 0.1mg/l를 添加한 培地에서 各各  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 의 濃度를 달리하여 前報에서 獲得한 表面이 윤기나고 단단해 보이는 듯한 둥그스름한 embryogenic calus로부터 不定胚 發生에 대한 效果를 調査한 結果, MT培地의 基本 添加量인 1650mg/l를 添加시킨 區에서는 2,4-D가 添加되기 始作하여 培養 5週째 가장 旺盛하게 不定胚가 發生되었는데 培養 7週째 67%, MT基本培地에서는 53%의 不定胚 發生率을 나타내었다(Fig. 1).

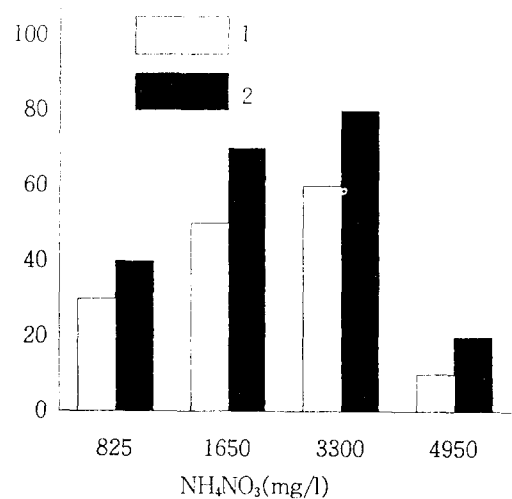


Fig. 1. Effects of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  in MT medium on somatic embryogenesis from embryogenic callus cultured for 7 weeks in *Zanthoxylum piperitum*. (1; MT, 2; MT+2, 4-D 0.1mg/l.)

기본 添加量에 2倍인 3300mg/l를 添加시킨 境遇에서는 2,4-D 添加區에서 77%의 良好한 不定胚

發生을 보인 盤面 MT 基本培地에서는 그보다 低調한 60%의 不定胚 發生을 보였다. 反面에 基本 添加量에 3倍인 4950mg/l를 添加시킨 境遇에는 2,4-D 添加培地나 MT 基本培地 모두 10-20%의 아주 低調한 不定胚 發生을 나타내었으며 基本 添加量의 절반인 825mg/l 添加시킨 境遇에는 2,4-D 添加培地 모두 30-40%의 低調한 不定胚 發生을 보였다.

이러한 結果로 器內 不定胚 發生에 있어  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 의 가장 效果的인 添加量은 基本 添加量의 2倍인 3300mg/l이었으며 이때, 2,4-D를 添加시킨 境遇에 더욱더 效果的이었다는 것을 알 수 있었으며 그 添加量이 많아질수록 2,4-D를 添加에 關係 없이 不定胚 發生에 非效果的이었다. 또한 MT 基本 培地와 2,4-D 0.1mg/l를 添加시킨 培地에  $\text{KNO}_3$ 의 添加量을 各各 달리하여 培養한 結果 MT 培地에  $\text{KNO}_3$ 의 基本 添加量인 1900mg/l를 添加시킨 境遇에는 MT 基本培地나 2,4-D 添加培地나 2,4-D 添加培地 모두 43-45%의 中間정도의 不定胚 發生을 나타낸 盤面 基本 添加量의 2倍인 3800mg/l 添加시킨 培地에서는 MT 基本培地와 2,4-D 添加培에서 67-70%의 比較的 良好한 發生을 나타냈으나 3800mg/l보다 많은 5700mg/l 添加區의 境遇는 MT 基本培地나 2,4-D 添加培地 모두 7-13%의 아주 低調한 不定胚가 發生되었다 (Fig. 2).

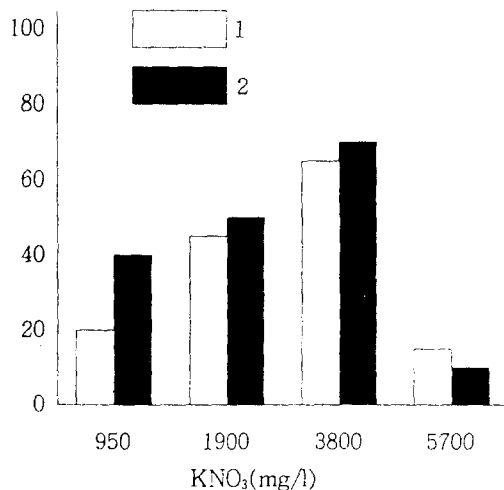


Fig. 2. Effects of  $\text{KNO}_3$  in MT medium on somatic

embryogenesis from embryogenic callus cultured for 7 weeks in *Zanthoxylum piperitum*. (1; MT, 2; MT+2, 4-D 0.1mg/l.)

이러한 結果로 미루어 볼 때 椒皮나무의 器內 不定胚 發生에 있어 MT 基本培地에  $\text{KNO}_3$ 의 添加量은 基本添加量보다 2倍 添加시키었을 때 MT 基本培地나 2,4-D 添加培地에서 가장 效果的이었다.

Halperin and Wetherell<sup>9)</sup>은 野生 당근의 葉柄으로 부터 誘起된 callus를 培養한 結果 還元型 窒素가 添加된 培地에서만 器內 胚를 發生하고  $\text{KNO}_3$ 만 窒素源으로 하여 誘起시킨 callus는 auxin-free 培地에 옮겨 培養하여도 器內胚를 形成하지 않는다고 報告하였는데 이러한 報告는 本 實驗과 같은 傾向을 나타내었으며, Reinet等의 당근의 callus 培養에서  $\text{KNO}_3$  高濃度 添加에서 還元形 窒素가  $\text{KNO}_3$ 와  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 의 形態로 들어있는 White 培地에서는 器內胚 發生이 低調하여 여기에  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 를 添加하면 不定胚 發生에 아주 效果的이라는 報告가 있다<sup>10,13)</sup>.

本 實驗에서도  $\text{KNO}_3$ 가 添加된 MT 基本培地  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 의 添加量을 基本培地の 2倍까지 添加하였을 때 不定胚 發生에 效果的이었다으며 특히 2,4-D를 0.1mg/l 添加시켰을 때 더욱더 效果的이었다.

器內胚 發生의 培地組成에 있어  $\text{NH}_4^+$ 처럼 效果的인 還元型 窒素도 없지만 CH, CM, glutamine과 alanin等이  $\text{NH}_4^+$ 을 代置할 수 있다는 研究結果들이 報告되고 있어<sup>11,16)</sup> 앞으로 이러한 添加物에 대한 체계적인 實驗이 要求된다.

MT 基本培地와 2,4-D 添加培地에 CH 含量은 100, 300, 500, 700mg/l로 하여 培養한 結果, CH 700mg/l를 添加시킨 区에서 MT 基本培地나 2,4-D 添加培地에서 60-70%의 良好한 不定胚 發生率을 나타낸 反面 添加量이 적어질수록 不定胚 發生率은 떨어졌으며 특히 100, 300mg/l의 적어질수록 添加된 境遇에는 2,4-D 添加培地보다 MT 基本培地에서의 不定胚 發生率이 높았다(Fig. 3).

이러한 實驗結果로 보아 CH 添加區에서는 700mg/l 添加시킨 區에서 不定胚 發生率이 가장 良好하였으며 이러한 不定胚들은 hormone-free 培地에 繼代培養하여 繼代 培養할 境遇에는 培養期間이 길어짐에 따라서 健實한 植物體가 分化되

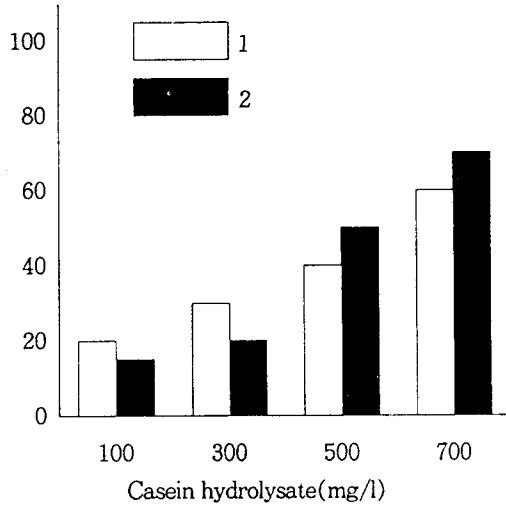


Fig. 3. Effects of casein hydrolysate in MT medium on somatic embryogenesis from embryogenic callus cultured for 7 weeks in *Zanthoxylum piperitum*. (1; MT, 2; MT+2, 4-D 0.1mg/l.)

기도 하였다.

메밀의 未成熟胚로부터 體細胞胚의 발생은 6% sucrose, 0.7% agar, 0.4mg/linositol과 2000mg/l casein hydrolysate를 添加시킨 培地에 良好하였다는 Neskovic等<sup>12)</sup>의 報告처럼 椒皮나무에 있어서도 700mg/l以上の 添加 實驗이 必要하리라 생각되며 CH의 添加量이 많아질수록 2,4-D의 添加效果는 MT 基本培地와 같아질 것으로 推測된다.

또한 papaya의 뿌리를 利用한 組織培養에서 體細胞胚의 發生은 1/2MS배지에 .5mg/l thiamine-HCl, 1.0mg/l pyridoxine-HCl, 5.0mg/l nicotinic acid, 2.0mg/l glycine, 100mg/l myo-inositol, 160mg/l adenine sulfate 그리고 1.0/mg/l와 GA<sub>3</sub> 1.0mg/l를 첨가시키었을 때 더욱더 體細胞胚 發生이 良好하였다는 Chen 等<sup>5)</sup>의 報告와 本 實驗은 相異하였다. 따라서 器內 不定胚 發生에 있어 CH의 添加效果는 植物의 種, 置床組織片의 部位 및 培地의 組成分에 따라서도 달라질 것으로 推定된다.

#### 摘 要

椒皮나무 (*Zanthoxylum piperitum* DC.)의 embryogenic callus로부터 不定胚發生에 있어 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub>와 casein hydrolysate의 添加 效果를 알아 보기 위하여 本 實驗을 實施하였던 바 그 結果는 다음과 같다.

1. 2,4-D 0.1mg/l가 添加된 MT培地에 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>를 3300mg/l 添加시킨 培地에서 不定胚 發生이 가장 良好하였다.

2. KNO<sub>3</sub>를 3800mg/l 添加시킨 境遇에는 MT 基本培地와 2,4-D 0.1mg/l를 添加시킨 培地에서 比較的 良好한 不定胚를 發生시키었다.

3. 2,4-D 0.1mg/l가 添加된 MT 培地에 casein hydrolysate를 700mg/l 添加시킨 境遇에 不定胚 發生이 良好하였으며 2,4-D가 添加되지 않는 培地에서는 不定胚 發生이 低調하였다.

#### 引用文獻

1. Arrillage, I.C. Brisa and J. Segura. 1987. Somatic embryogenesis from hypocotyl callus cultures of *Digitalis obscura* L. Plant Cell Reports. 6(3) : 223-226.
2. Askan, M. P., S. K. O. Hair and R. E. Litz. 1984. *in vitro* plant regeneration from leaf disks of house potato (*Coleus parviflorus*). HortScience. 19(1) : 75-76.
3. Brawale, U. B., H. R. Kerns and J. M. Widholm. 1986. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. Planta. 167 : 473-481.
4. Chaturvedi, H. C. and G. C. Mitra. 1974. Clonal propagation of *Citrus* from somatic callus cultures. HortScience. 9(2) : 118-120.
5. Chen, M. H., P. J. Wang, and E. Maeda. 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cario papaya* L. Tissue culture derived from root explants. Plant Cell Reports. 6 : 348-351.
6. Guha, S. and B. M. Johri. 1966. *in vitro* development of ovary and ovule of *Allium cepa* L. Phytomorpho. 16 : 353-363.

7. gunnar, F. 1971. Growth and organogenesis in tissue cultures of *Allium cepa* var. Proliferum. *Physiol. Plant.* 25 : 436-440.
8. Halperin, W. and D. F. Wetherell. 1965. Ammonium requirement for embryogenesis *in vitro*. *Nature.* 205 : 519-520.
9. Halperin, W. 1970. Embryos from somatic plant cell. *Symp. Intern. Soc. Cell Biol.* 9 : 169-191.
10. 韓旭烈. 1987. 植物이 器內胚 發生과 器內胚의 育種에의 利用. *식물組織培養學會誌.* 第14卷 保育號. 124-126.
11. Ho. W. J and I. K. Vasil. 1983. Somatic embryogenesis in sugarcane(*Saccharum officinarum* L.) 1. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. *Protoplasma.* 118 : 169-180.
12. Neskovic, M., R. Vujicic, and S. Budimir. 1987. somatic embryogenesis and bud formation from immature embryos of buckwheat(*Fagopyrum esculentum* Moench). *Plant Cell Reports.* 6 : 423-426.
13. Reinert, J., M. Tazawa and S. Semenov. 1967. Nitrogen compounds as factors of embryogenesis *in vitro*. *Nature.* 216 : 1215-1216.
14. 宋沅燮. 1989. 柚子の 器內 不定胚 發生에 關한 研究. *圓光大學校 大學院 博士學位論文.* 57.
15. 宋沅燮, 吳成都, 金鎮洙. 1991. 유자나무(*Citrus junos*)의 기내 증식에 관한 연구. III. 기내 부정배에서 발생된 유식물의 자엽, 하배측 및 엽으로 부터의 식물체 재분화. *한국원예학회지* 32(3) : 345-354.
16. 宋沅燮, 吳成都, 朴仁鉉, 劉成吾. 1991. 초피나무(*Zanthoxylum piperitum*)의 기내증식. I. 기내 부정배 발생과 식물체 재분화. *한국식물조직배양학회지.* 18(1) : 17-25.
17. Tisserat, B., E. B. Esan, and T. Murashige. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hort. Rev.* 1 : 1-78.

(접수일 1995.4.10)