

培地條件이 뽕나무 冬芽葉片의 不定芽形成에 미치는 影響

成圭秉 · 町井博明* · 金浩樂 · 具泰沅

農村振興廳 蠶絲昆蟲研究所, *日本農業生物資源研究所

Effect of Medium Conditions on Adventitious Bud Formation of Mulberry Winter Bud Leaflet

Gyoo Byung Sung, Machii Hiroaki*, Ho Rak Kim and Tae Won Koo.

National Sericulture and Entomology Research Institute, RDA, Suwon, Korea.

*National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba, Japan.

Abstract

To establish a regeneration system of mulberry through the adventitious bud formation of winter bud leaflet, medium conditions were examined. Adventitious bud formation rate of mulberry winter bud leaflet on the medium containing different concentrations of BA and TDZ as the growth regulators was high on 5mM BA and 0.5mM TDZ. The effect of preculture on the medium containing BA or TDZ was affected not only by the concentration of growth regulators but the duration of preculture. Fructose as carbon source was effective on adventitious bud formation.

Key words : BA, TDZ. adventitious bud formation

緒 論

組織培養技術을 이용하여 여러 생물로부터 分離된 優良遺傳子를 뽕나무에 導入할 수 있게 되면 劃期的인 育種技術이 된다. 그러나 뽕나무의 組織培養은 매우 어려운 캘러스로부터의 植物體의 再分化(Jain等, 1992, Narayan 等, 1989, 遊佐 等, 1989), 葯培養에 의한 半數體의 作出(Lin 等, 1987) 等에 대하여는 成功의 例가 보고되어 있기는 하나 再現性이 缺乏되어 安定的인 再分化系로서 충분치 않다.

또한, 뽕나무의 未熟葉片 培養培養에 의한 花芽의 形成(Machii 等, 1993), 胚로부터의 體細胞胚誘導(Thin等, 1995)는 되었으나, 이로부터의 개체재생에는 이르지 못하고 있으며, 원형질체로부터의 개체재생도 되지 않고 있다.

培養 shoot로부터 캘러스를 거치지 않고 不定芽誘導가 된다는 것이 報告(岡, 大山, 1974)된 以後, 實生의 子葉, 葉(Kim 等, 1985), 未熟胚(常山 等, 1988)로부터도 不定芽를 形成시키는데 성공하고 있다. 뽕나무 冬芽의 不定芽形成에는 種, 品種, cytokinin의 種類 및 濃度, 糖濃度, 培地의 種類, 無機態窒素, 葉齡(片桐 等, 1986, 齊藤 等, 1989, Machii, 1992b, 山ノ内 等, 1993, 齊藤, 1993)等이 影響을 미친다는 것이 報告되어 있다. 冬芽內의 未熟葉를 利用하여 不定芽形成을 시키는 것이 뽕나무 再分化系로서 확립된 유일한 기술이며, 冬芽葉片에의 不定芽形成技術을 利用하여, 人工種子의 作成(Machii, 1992a), 묘목의 大量繁殖技術(齊藤, 1992) 등이 개발되어 있다.

또한, Agrobacterium Ti-plasmid를 利用하여, β-GUS遺傳子의 導入, 發現(Machii, 1990)에 성공하고

Table 1. Effect of BA and TDZ on adventitious bud formation of mulberry winter bud leaflet

BA concentration (μM)	TDZ Concentration (μM)											
	0			0.1			0.5			2.0		
	NEP*	NABF**	%*	NEP*	NABF**	%*	NEP*	NABF**	%*	NEP*	NABF**	%*
0	18	0	0	18	0	0	20	3	15.0	20	1	5.0
1	19	0	0	19	0	0	19	3	15.8	20	1	5.0
5	19	6	31.6	19	6	31.6	20	7	35.0	19	6	31.6
20	20	5	25.0	20	5	25.0	20	6	30.0	19	5	26.3

*; Number of explants planted, **; Number of explants formed adventitious bud, %; Percentage of explants formed adventitious bud. Adventitious bud formation was examined 30 days after planting.

있으나, 形質轉換效率이 낮아 효율을 향상시키기 위하여는 不定芽 形成率을 높일 必要가 있다. 本報에서는 形質轉換效率을 높이기 위한 基礎研究로서 不定芽形成에 미치는 배지조건의 影響을 成長物質을 中心으로 調査하였다.

材料 및 方法

使用한 뽕 品種은 日本 薩 昆蟲農業技術研究所에서 栽培中인 오오유타카(おおゆたか)로 枝條로부터 冬芽를 잘라내어 鱗片을 除去한 後 70%에타놀로 30초, 1% 次亞鹽素酸나트륨液에 20분간 침적하여 表面滅菌 後, 滅菌수로 洗淨한 다음, 크린벤치에서 無菌의 으로 葉片을 摘出하여 배지에 置床하였다.

배지는 MS배지에 fructose 3%, 寒天 8 g/l, 成長 hormone으로서 Thidiazuron(TDZ), 6-Benzyladenine(BA)를 첨가, 121℃에서 20분 高壓滅菌하여 사용하였다. 糖의 종류가 葉片의 不定芽形成에 미치는 影響을 조사하기 위해 sucrose, fructose, maltose, dextrose를 각각 濾過滅菌하여, 高壓滅菌한 MS배지에 3%의 농도로 첨가하였으며, pH는 滅菌前 5.6으로 하였다. MS+BA50 μM 첨가하여 滅菌한 배지를 90 × 15 mm 플라스틱 페트리디쉬에 25 ml씩 分注하여, 뽕나무 冬芽로부터 摘出した 葉片을 10일간 前培養하여 TDZ0.5+BA5 μM을 첨가한 배지에 移植하여 培養하였다. BA와 TDZ의 效果를 밝히기 위하여 TDZ를 0, 0.1, 0.5, 2 μM씩, BA를 0, 1, 5, 20 μM씩 각각 조합하여 첨가한 16종류의 배지에서 배양하였다. 또한 高濃度의 BA 또는 TDZ를 첨가한 배지에서 前培養하여 TDZ 0.5, BA 5 μM을 첨가한 배지에서 배양하여 不定芽를 형성시킨 후, 形成率을 조사하였다. 前培養은 TDZ를 5, 10, 20, 50 μM 또는 BA 20, 50, 100 μM의

7종류, 前培養期間은 3, 6, 10, 15일로 하였다. 培養은 25℃에서 14시간 명, 10시간 암조건으로 하였으며, 不定芽 形成率은 40일간 배양후에, 不定芽數는 60일간 배양후에 조사하였다. 不定芽形成率은 置床葉片中 枯死한 것을 제외한 葉片數當 不定芽를 형성한 葉片의 比率를 百分率로, 不定芽數는 不定芽를 형성한 葉片當의 수를 조사하였다.

結果 및 考察

1. cytokinin의 濃度가 冬芽未熟葉片의 不定芽形成에 미치는 影響

冬芽로부터 未熟葉을 摘出하여 BA 및 TDZ의 濃度를 달리하여 첨가한 배지에 培養하여 각각의 濃度와 不定芽 形成과의 關係를 調査하였다. 그 結果, BA에서는 5 μM의 濃度에서 가장 높은 不定芽形成率을 보였다. BA 0.1 μM이하의 低濃度에서 TDZ를 0.1 μM이하를 첨가한 경우에는 전혀 不定芽形成이 되지 않았으며, 5 μM以上 첨가배지에서도 比率이 낮아졌다. TDZ에서는 0.5 μM의 濃度에서 높았다. 不定芽形成에 대한 TDZ와 BA와의 相互作用에 대하여는 一定한 傾向을 보이지 않았다.(表 1)

한편 高濃度의 BA 혹은 TDZ를 각각 單獨으로 첨가한 배지에서 葉片을 前培養하여, TDZ 0.5+BA 5 μM을 첨가한 배지에 옮겨 培養하여 不定芽形成率을 調査한 結果, BA첨가배지에서의 前處理期間이 6일까지는 길어 질수록 不定芽形成率이 높아졌으나 10일 이상 처리하면 낮아졌다. 濃度와 處理期間과의 關係에 있어서는 20 μM에서 6일간 前處理가 가장 最適이었다. TDZ첨가배지에서는 10일까지는 形成率이 높아졌다(表 2). 그리고 TDZ첨가배지에서 前處理한 경우에는 培養中의 葉片의 基部에 乳白色의 캘러스와

Table 2. Effect of preculture on medium containing high concentrations of cytokinins on adventitious bud formation of mulberry winter bud leaflet.

Concentration (μM)	Preculture duration(days)												
	3			6			10			15			
	NEP*	NABF**	%*	NEP*	NABF**	%*	NEP*	NABF**	%*	NEP*	NABF**	%*	
BA	20	27	6	22.2	25	21	84.0	20	9	45.0	20	8	40.0
	50	24	5	20.8	24	16	66.7	21	14	66.7	20	8	40.0
	100	26	8	30.8	23	15	65.2	20	9	45.0	20	9	45.0
TDZ	5	22	7	31.8	22	7	31.8	19	10	52.6	23	6	26.1
	10	19	6	31.6	20	8	40.0	22	16	72.7	20	5	25.0
	20	20	6	30.0	23	8	34.8	20	8	40.0	20	5	25.0
	50	20	7	35.0	25	7	35.0	19	10	52.6	22	5	22.7

NEP, NABF and % refer to table 1, Adventitious bud formation was examined 30 days after planting.



Fig. 1. Green, transparent structure formation on the base of winter bud leaflet during culture after preculture on medium containing high concentration of TDZ.

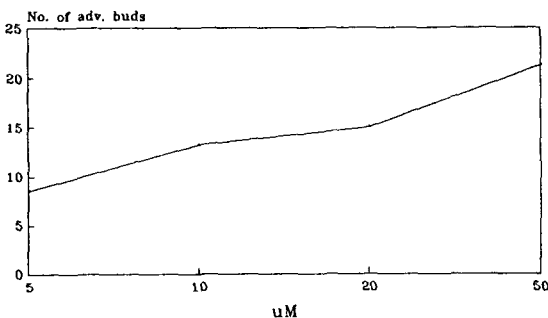


Fig. 2. Effect of concentrations TDZ on the number of adventitious buds. Preculture duration : 10 days, Number of adventitious buds was examined 60 days after planting.

緑色の 透明한 組織이 發生하는 경우도 觀察되었다 (그림 1.) Think等(1994)에 의해서도 高濃度の TDZ

Table 3. Effect of sugars in culture medium on adventitious bud formation of mulberry winter bud leaflet

	No. of explants planted	No. of explants formed adventitious bud	Percentage of explanted formed adventitious bud
Fructose	22	17	77.3
Dextrose	28	20	71.4
Sucrose	25	16	64.0
Maltose	27	0	0

After preculture for 10 days on medium containing BA 50 μM ; cultured on medium containing TDZ 0.5+BA 5 μM . Sterilization was carried out by filter, Adventitious bud formation was examined 30 days after planting.

를 첨가한 배지에서 培養하면 器官狀의 組織發生이 認定되고 있어 이 組織으로 부터의 再分化研究도 필요하다고 생각된다.

TDZ濃度を 달리하여 첨가한 배지에서 10일간 前培養하여 不定芽가 形成된 葉片當 不定芽數는 TDZ의 濃도가 높아질수록 增加하였다(그림 2).

2. 糖의 종류가 不定芽形成에 미치는 影響

뽕나무 冬芽葉片의 不定芽形成에 있어서 炭素源으로서 알맞은 糖을 알기 위하여 MS+BA50 μM 의 배지에 sucrose, fructose, maltose, dextrose 4종류의 糖을 각각 3%의 濃도로 첨가한 배지에 冬芽로부터 摘出した 葉片을 10일간 前培養하여 각각의 糖과 TDZ 0.5+BA 5 μM 를 첨가한 배지에 옮겨 培養한 結果, fructose 첨가배지에서 不定芽形成率이 가장 높았다 (表 3). 이는 岡와 大山(1978)이 뽕나무 冬芽의 分離

培養에 fructose가 效果的이었다고 報告한 바와 같이, 冬芽葉片의 不定芽形成에 있어서도 fructose가 效果的이었다. 이는 糖의 종류에 따라 吸收 혹은 糖代謝에 差가 있기 때문에 보여지며, fructose가 糖代謝에 쉽게 利用된다는 점에 대하여는 柏田(1955)은 흥미 있는 報告를 하고 있다. 그는 뽕나무 枝條에 含有된 遊離糖의 時期的 變化를 조사하여 枝條中の fructose가 秋末부터 冬期에는 增加하나, 봄 崩芽期 및 生育期間中에는 거의 存在하지 않는 것으로 부터 fructose가 가장 良好한 呼吸源으로 說明하고 있다. 배지에 炭素源으로서 첨가한 fructose가 위의 結果와 關聯이 있는 것으로 여겨지나, 糖의 效果에 대하여는 今後 檢討할 必要가 있다.

Maltose첨가 배지에서는 培養期間中 葉片이 綠色을 維持하고 있었으나 不定芽形成은 전혀 되지 않았다.

摘 要

形質轉換效率을 높이기 위한 基礎研究로서 뽕나무 冬芽 未熟葉片의 不定芽形成에 미치는 배지조건의 影響을 調査한 結果는 다음과 같다.

1. 不定芽形成率은 BA 5 μM, TDZ 0.5 μM濃度에서 높았으나 BA와 TDZ의 相互作用에 대하여는 일정한 傾向을 보이지 않았다.

2. 高濃度の BA 혹은 TDZ를 각각 단독으로 첨가한 배지에서 葉片을 前培養한 結果 BA첨가배지에서는 培養期間이 6일까지, TDZ첨가배지에서는 10일까지 培養期間이 길어질수록 不定芽形成率이 높아졌다.

3. TDZ첨가배지에서 前處理한 경우, 葉片基部에 綠色의 透明한 組織이 發生되기도 하였다.

4. 炭素源으로서 fructose가 不定芽 形成에 가장 效果的이었으며, maltose첨가배지에서는 전혀 不定芽가 形成되지 않았다.

引 用 文 獻

Jain A.K. and Datta R.K. (1992) Shoot organogenesis and plant regeneration in mulberry (*Morus bombycis* Koidz) : Factors influencing morphogenetic potential in callus culture. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*. **29** : 43-50.
 柏田豊 (1955) 桑の炭水化物に關する研究(II) 桑條의 遊

離糖의 時期的變化. *日蚕雜*. **24** : 76-79.
 片桐幸逸, 西口達郎 (1986) クワ組織培養における不定芽形成の種間差異. *日蚕雜*. **55**(1) : 79-80.
 Kim Ho-Rak, Kamlesh R. Patel and Trevor A. Thorpe (1985) Regeneration of mulberry plantlets through tissue culture. *BOT. GAZ.* **146**(3) : 334-340.
 Lin shoukang, Jr Dongfeng and Qin Jun (1987) *In vitro* production of haploid plants from mulberry (*Morus*) anther culture. *Scientia Sinica(Series B)* Vol. XXX No. **8** : 853-863
 Machii Hiroaki (1990) Leaf disk transformation of mulberry plant (*Morus alba* L.) by *Agrobacterium* Ti plasmid. *J. seri. Sci. Jpn.* **59**(2) : 105-110.
 Machii Hiroaki (1992a) *In Vitro* growth of encapsulated adventitious buds in mulberry, *Morus alba* L. *Japan. J. Breed.* **42** : 553-559.
 Machii Hiroaki (1992b) Organogenesis from immature leaf cultures in mulberry, *Morus alba* L. *J. seri. Sci. Jpn.* **61**(6) : 512-519.
 Machii Hiroaki (1993) *In vitro* flower-bud formation from immature leaf cultures in mulberry. *J. seri. Sci. Jpn.* **62**(5) : 428-430.
 Murashige, T and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantum.* **15** : 473-479
 Narayan Pretap, S Chakraborty and Rao G Subba (1989) Regeneration of plantlets from the callus of stem segments of Mature plants of *Morus alba* L.. *Proc. Indian natn. sci. Acad.* B55 Nos. **5 & 6** : 469-472.
 岡 成美・大山勝夫 (1974) クワの芽の分離培養に關する研究 I. 冬芽からの莖葉展開および器官形成に及ぼす成長物質の影響. *日蚕雜*. **43**(3) : 230-235.
 岡 成美・大山勝夫 (1978) クワの芽の分離培養に關する研究 III. 冬芽からの莖葉展開および寒天濃度, pHおよび糖の影響. *日蚕雜*. **47**(1) : 15-20.
 齊藤祐行・片桐幸逸 (1989) 冬芽の葉片培養による不定芽誘導. *日蚕雜*. **58**(3) : 197-202.
 齊藤祐行 (1992) 不定芽を利用したクワ大量増殖法. *日蚕雜*. **6**(5) : 46-51.
 齊藤祐行 (1993) クワの未熟葉における不定芽形成と葉齡との關係. *日蚕雜*. **62**(5) : 435-436.
 常山 泉・榎本末南・大山勝夫 (1988) クワの未熟葉における不定芽形成. *日蚕雜*. **57**(3) : 239-240
 Thinh Nguyen Tien and Koitsu Katakiri (1994) Induction of adventitious buds in mulberry leaves by thiazuron. *J. seri. Sci. Jpn.* **63**(6) : 514-516.
 Thinh Nguyen Tien and Koitsu Katakiri (1995) Induction of direct somatic embryogenesis in mulberry embryos cultured *in vitro*. *J. seri. Sci. Jpn.* **61**(1) : 72-74.
 遊左富士雄・渡 四士榮 (1989) 2配 桑實生の葉カルスからの不定芽形成. 東北 薩研究報告. **14** : 59-60.
 山ノ内廣昭・町井博明・片桐幸逸 (1993) クワの葉片からの不定芽形成に對する培地中無機態窒素の影響. *日蚕雜*. **62**(2) : 145-151.