

碩士學位 論文

병꽃나무의 기관분화 및 내생 IAA  
함량에 미치는 Auxin과 Cytokinin의 영향



濟州大學校 大學院  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

生物 學科

宋 灌 筆

1999 年 12 月

# 병꽃나무의 기관분화 및 내생 IAA 함량에 미치는 Auxin과 Cytokinin의 영향

指導教授 許仁玉

송 관 필

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함



송관필의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長

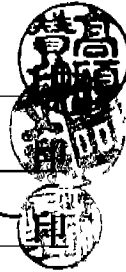
고 석 찬

委 員

김 은 희

委 員

許仁玉



濟州大學校 大學院


1999年 12月

**Effects of Auxin and Cytokinin on the  
Organogenesis and Endogenous IAA Content  
in *Weigela subsessilis***

**Gwan-Pil Song**

(Supervised by professor In-Ok Huh)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF  
SCIENCE



DEPARTMENT OF BIOLOGY  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1999. 12.

# 목 차

|                           |     |
|---------------------------|-----|
| List of Tables            | ii  |
| List of Figures           | iii |
| Abbreviation              | iv  |
| Abstract                  | v   |
| I. 서 론                    | 1   |
| II. 재료 및 방법               | 3   |
| 1. 병꽃나무 종자의 기내발아 및 켈러스 유도 | 3   |
| 2. 켈러스로부터의 기관분화 유도        | 3   |
| 3. 내생 IAA 함량 측정           | 3   |
| III. 결 과                  | 5   |
| 1. 병꽃나무 종자의 부근발아와 켈러스 유도  | 5   |
| 2. 켈러스로부터 기관분화 유도         | 8   |
| 3. 내생 IAA 함량 분석           | 15  |
| IV. 고 찰                   | 17  |
| V. 적 요                    | 20  |
| VI. 참고문헌                  | 21  |

## List of Tables

Table 1. Effects of NAA and BA on organogenesis from *W. subsessilis* internode cultured on WPM medium

Table 2. Effects of NAA and zeatin on organogenesis from *W. subsessilis* internode cultured on WPM medium

Table 3. Effects of NAA and BA on organogenesis from *W. subsessilis* callus cultured on WPM medium

Table 4. Effects of NAA and BA on organogenesis from *W. subsessilis* callus cultured on MS medium

Table 5. Effects of NAA and BA on organogenesis from *W. subsessilis* callus cultured on MT medium

Table 6. Effects of 2,4-D and zeatin on organogenesis from *W. subsessilis* callus cultured on WPM medium

Table 7. Effects of NAA and zeatin on organogenesis from *W. subsessilis* callus cultured on WPM medium

## List of Figures

Fig. 1. Organogenesis from *W. subsessilis* callus cultured on MT medium for 60 days.

Fig. 2. Endogenous IAA contents of *W. subsessilis* callus in different concentration of NAA and BA.

Fig. 3. Endogenous IAA contents of *W. subsessilis* callus in different concentration of 2,4-D and zeatin.



# Abbreviations

BA : Benzyladenine

2,4-D : 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

HPLC : High performance liquid chromatography

IAA : Indol-3- acetic acid

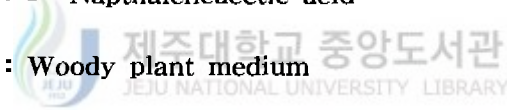
IBA : Indol-3-butyric acid

MS : Murashige and Skoog

MT : Murashige and Tucker

NAA :  $\alpha$  -Naphthaleneacetic acid

WPM : Woody plant medium



## Abstract

This study was done to investigate the effects of culture media and plant growth regulators on the organogenesis and endogenous IAA contents in *Weigella subsessilis* calli. WPM media with auxin and cytokinin were used for callus induction. and WPM, MT and MS media with NAA, 2,4-D, BA and zeatin were used for the organogenesis from calli. Endogenous IAA content were investigated from calli growing in the media for organogenesis.

Callus induction was stimulated in media with 1mg/L NAA and 0.01mg/L zeatin, or 1mg/L NAA and 0.1mg/L BA. Shoot formation from callus was successfully induced just in WPM medium with 1mg/L NAA, and MT medium with 1mg/L NAA and 0.1mg/L BA. For induction of roots from calli, MT medium was more effective than WPM or MS medium. For the induction of roots and shoots, NAA and BA was more effective than 2,4-D and zeatin, respectively. Endogenous IAA content was highest in the callus growing on medium with 0.01mg/L 2,4-D and 0.01mg/L zeatin. Endogenous IAA content increased as the NAA concentration increased, While it decreased as the 2,4-D concentration increased.



# I. 서론

식물의 증식은 실생번식, 접목, 삽목, 조직배양 등으로 이루어지고 있으며, 그 중에서도 목본의 경우는 접목, 삽목 등의 방법에 의존하고 있다. 그러나 이러한 방법으로는 증식시키기 어려운 수종이 많아서 최근에는 조직배양을 통한 증식이 활발하게 이루어지고 있으나(Yadav *et al.*, 1990), 조직배양에 의해 생성되는 식물체들은 형태적, 유전적인 변이가 많이 생기는 문제점이 있다(Baruah and Bordoli, 1989). 그럼에도 불구하고, 식물조직배양기술은 여러 분야에서 널리 이용되고 있으며, 기술의 발달로 인하여 다양한 식물에 형질전환이 가능하게 되었으나(An, 1992), 목본식물은 재분화율이 낮고 수종에 따라 재분화가 용이하지 않아 초본류에 비해 연구가 미비한 실정이다(Lee and Park, 1989). 그러나 근래에 와서는 기내배양을 이용한 목본류의 연구가 활발히 이루어지고 있는데, 초피나무(Song *et al.*, 1991), 왕벚나무(Kim *et al.*, 1993), 유자(Oh *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1995), 노각나무(Choi *et al.*, 1995), 복숭아나무(Jun *et al.*, 1999) 등에서 이루어지고 있다. 위와 같이 목본의 조직배양은 식물생장조절물질의 존재로 가능하며, 이들은 캘러스 유도과 재분화에 결정적인 역할을 담당한다. 식물생장조절물질 중에서 auxin으로는 IAA, NAA, 2,4-D, IBA 등을 0.1 ~ 10mg/L의 농도로 캘러스 또는 세포배양용 배지에 첨가하여 사용하는데, 천연 auxin인 IAA는 매우 불안정하고 생체내의 효소에 의해 쉽게 분해되기 때문에 인공 auxin인 2,4-D가 가장 널리 쓰이고 있다. 그리고 cytokinin은 kinetin, BA, zeatin 등을 0.01~5mg/L의 농도로 주로 사용하며, 주로 단독으로서가 아니라 auxin과 같이 혼용 처리하는데, 캘러스 유도나 세포증식보다는 오히려 조직분화에 중요하며, 혼합 비율은 식물조직의 탈분화, 캘러스 증식, 재분화 등을 지배하며, 그 반응은 식물 종에 따라서는 현저하게 차이가 있다(小島邦彦, 1993).

일반적으로 배지의 cytokinin이 auxin 비율보다 높으면 shoot가 형성되고 비율이 낮으면 뿌리가 형성되며(Paterson, 1983), 식물 종에 따라 내생 호르몬이 배양세포나 조직절편에서 눈이나 뿌리형성을 자극한다(Douglas, 1985). 또한 auxin의 농도가 cytokinin의 안정성과 대사에 영향을 주어 외부에서 첨가한 auxin의 농도가 증가

하면 내생 cytokinin의 농도는 감소하고, auxin의 농도가 감소하면 내생 cytoinin의 농도는 증가한다(Palni *et al.*, 1988). 또 내생 auxin은 캘러스를 유도하고, 줄기로 분화되기 위해서는 분화가 일어나기 전에 cytokinin으로 대체된다(Reynolds, 1986). 내생 auxin의 생합성은 주로 줄기의 정단부나 어린 잎 또는 발육중인 과일에서 일어나며, 이들 조직은 높은 농도의 auxin을 함유하고 있다. 이러한 내생 auxin은 주로 줄기 부위에서의 부정근 발육을 촉진하는 작용을 하며, 캘러스로부터 부정근을 유도시킨다는 것이 밝혀져, 조직배양이나 삼목 등에서 활발히 이용되고 있으며, 식물의 생육과 발육의 여러 단계에 관여하는 호르몬으로서 줄기의 신장, 정아우세, 노화와 기관의 탈리, 발근촉진, 극성발현 등의 현상에 관여한다고 알려져 있다. 또 조직배양에서의 내생 auxin 인 IAA는 팔의 상배측 절편에 있어서 부정근 형성에 효과적이고(Cho, 1973), 인삼과 담배의 경우, 배양 중인 캘러스 조직에서 다른 인돌 화합물보다 많이 함유하고 있으며(Nishio *et al.*, 1976), 강남콩의 배측절편에 있어서 IAA처리가 부정근 형성에 촉진적이다(Cho, 1981). 또한 당근의 조직에서의 내생 IAA 함량과 형태적 관찰에서 캘러스로부터 뿌리의 분화 및 통도요소 등이 형성될 때 IAA 함량이 급격하게 감소한다고 밝혀져 있다(Hwang *et al.*, 1986).

병꽃나무(*Weigela subsessilis*)는 제주도를 비롯한 지리산 등지에서 자생하는 식물로서 꽃이 옛 병의 모양과 비슷하여 이름이 생겼으며, 인동과(*Caprifoliaceae*)에 속하는 낙엽관목으로서 높이가 2~3m이고 잎은 대생하며 엽병이 거의 없다. 꽃은 5월에 피고 황녹색에서 적색으로 변하며 1~2개씩 야생하고 화주에 털이 있다. 열매는 잔털이 있고 길이 10~15mm로서 9월에 익으며 종자에 날개가 있다. 어린 가지에 털이 있고, 잎은 타원형이며 첨두 예저이고 길이 2~3cm로서 양면 세모가 있다(Lee, 1980). 용도로는 꽃이 화려하여 관상용 및 정원수로 많이 식재되고 있으며, 증식은 주로 삼목과 실생번식을 통하여 이루어지고 있지만, 아직까지 조직배양에 따른 증식 방법은 이루어지고 있지 않다.

따라서 본 연구는 목본류인 병꽃나무 줄기를 이용하여 배지 및 식물생장조절물질이 내생 IAA 함량과 기관분화에 미치는 영향을 조사함으로써 대량 증식방법을 설정하고 목본 조직배양에 있어서 기초자료로 삼고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 병꽃나무 종자의 기내발아 및 켈러스 유도

한라산에서 채집한 병꽃나무(*Weigela subsessilis* L. H. BAILEY)종자를 중성세제에서 30분, 70% 에탄올에 30초 침지한 후, 1% 차아염소산나트륨(NaClO) 용액에서 20분간 세척하여 멸균수로 4~5회 세척한 후, 호르몬이 처리되지 않은 WPM(Lloyd and McCown, 1980) 기본배지에 종자 15립씩 치상하여 발아시켰다. 배지는 2%의 설탕, 0.6%의 한천을 첨가하였고, pH는 5.6으로 조정하여 121℃, 1.2기압 고압숙윤 멸균기에서 15분간 멸균하였다.

발아된 유식물체의 절단에서 켈러스를 유도하기 위해 NAA(0~5mg/L), BA(0~5mg/L), zeatin(0~2mg/L)이 처리된 WPM배지에서 25℃, 5000Lux, 16시간 조명 하에서 8주 동안 명배양하였다.

### 2. 켈러스로부터의 기관분화 유도

유도된 켈러스를 1mg/L NAA 와 1mg/L BA 가 처리된 WPM배지에서 켈러스를 계대배양 하였으며, 배지별에 따른 기관분화를 유도하기 위해 MS(Murashige and Skoog, 1962), WPM, MT(Murashige and Tucker, 1969)배지에 0~5mg/L NAA 와 0~5mg/L BA를 단독 또는 혼용처리 하였고, WPM 배지에서는 0~2mg/L 2,4-D 와 0~1mg/L zeatin 그리고 0~1mg/L NAA와 0~5mg/L zeatin을 단독 또는 혼용처리 하여 25℃, 5000Lux, 16시간 조명 하에서 60일 동안 배양하였다.

### 3. 내생 IAA 함량 분석

기관분화에 미치는 내생 IAA의 영향을 조사하기 위해 60일 동안 배양된 켈러스를 이용하여 IAA 함량을 측정하였다. 켈러스 2g을 10ml의 에탄올을 첨가하여 60℃

에서 3~4시간 정도 증탕한 후, 시료로 사용하였다(Hwang *et al.*, 1986). 이 추출된 시료를 Whatman 110 filter paper를 이용하여 여과한 다음 60℃에서 감압 농축하였다. 농축된 추출물에 메탄올 2ml을 넣어 녹인 다음 C<sub>18</sub>-seppak mini column에 통과시킨 후, 이중 10 $\mu$ l을 HPLC(Waters co.)에 주입하였다.

Column은  $\mu$ -bondapak C<sub>18</sub>( $\phi$  3.9mm $\times$ 30cm)을 사용하였고, 이동상으로는 50% MeOH, 유속은 0.8ml/분, 압력은 2500psi로 흘러보내 형광검출기 250nm에서 IAA 함량을 측정하였으며, 표품은 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.



### Ⅲ. 결 과

#### 1. 병꽃나무 종자의 기내발아와 켈러스 유도

병꽃나무 종자는 소독과정을 거쳐 치상한 지 45일 후부터 발아되기 시작하였고, 60일이 지나면서 대부분 발아하였다. 이 병꽃나무 유식물체의 절간을 이용하여 WPM 기본배지에 0~5mg/L NAA와 0~5mg/L BA, 또는 0~1mg/L zeatin을 단용 또는 혼용처리 하여 켈러스를 유도하였다(Table 1, 2).

켈러스는 치상한지 20일 경부터 유도되기 시작하여 60일 경에는 대부분의 처리구에서 유도되었다. 그리고 cytokinin에 관계없이 NAA가 고농도로 갈수록 분화가 잘되었고, 그 중에서도 1mg/L NAA와 0.1mg/L BA 혼용처리구, 1mg/L NAA와 0.001, 0.01mg/L zeatin 혼용처리구가 가장 양호하였다. 또 5mg/L NAA와 0~5mg/L BA 또는 0~1mg/L zeatin 혼용처리구에서도 잘 이루어졌다. 그러나 켈러스의 상태는 흰색이 강하게 나타났고, NAA가 존재하지 않는 처리구에서는 켈러스의 형성이 저조하거나 나타나지 않았다.

Shoot는 BA를 처리하였을 때가 zeatin을 처리하였을 때보다 비교적 양호하였으며, 1mg/L NAA와 0.1mg/L BA 혼용처리구, 1mg/L NAA와 0.001mg/L zeatin 혼용처리구에서 가장 잘 유도되었다. 그러나 NAA 고농도에서는 식물생장조절물질의 종류에 관계없이 분화가 이루어지지 않았다. 뿌리는 전체적으로 분화가 잘 되진 않았지만 1mg/L NAA와 0.01~1mg/L BA 혼용처리구와 1mg/L NAA와 0.1mg/L zeatin이 혼용처리구에서 뿌리의 유도가 양호하였다. 그러나 NAA의 농도가 높아질수록 뿌리 분화가 이루어지기는 하였으나 저조하였다.

Table 1. Effects of NAA and BA on organogenesis from *W. subsessilis* internode cultured in WPM medium

| NAA  | BA   | Callus    |         | Shoots  |         | Roots   |         |
|------|------|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|
|      |      | formation | degree* | rate(%) | degree* | rate(%) | degree* |
| 0    | 0    | 20        | +       | -       | -       | -       | -       |
|      | 0.01 | 20        | +       | 20      | +       | -       | -       |
|      | 0.1  | 20        | +       | 40      | +       | -       | -       |
|      | 1    | -         | -       | 40      | +       | -       | -       |
|      | 5    | -         | -       | 40      | ++      | -       | -       |
| 0.01 | 0    | 20        | +       | 20      | +       | -       | -       |
|      | 0.01 | 100       | ++      | 40      | ++      | -       | -       |
|      | 0.1  | 80        | ++      | -       | -       | -       | -       |
|      | 1    | 40        | +       | -       | -       | -       | -       |
|      | 5    | 40        | +       | 20      | +       | -       | -       |
| 0.1  | 0    | 60        | +       | 20      | ++      | -       | -       |
|      | 0.01 | 80        | ++      | 20      | ++      | -       | -       |
|      | 0.1  | 100       | ++      | 40      | ++      | 60      | +       |
|      | 1    | 20        | +       | 40      | +       | 60      | +       |
|      | 5    | 20        | +       | -       | -       | -       | -       |
| 1    | 0    | 60        | ++      | -       | -       | 80      | ++      |
|      | 0.01 | 100       | ++      | -       | -       | 80      | +++     |
|      | 0.1  | 100       | +++     | 40      | ++      | 80      | +++     |
|      | 1    | 80        | ++      | 20      | +       | 40      | +       |
|      | 5    | 100       | +       | 40      | +       | -       | -       |
| 5    | 0    | 80        | ++      | 20      | +       | 40      | +       |
|      | 0.01 | 80        | +++     | -       | -       | 100     | +++     |
|      | 0.1  | 100       | +++     | -       | -       | 100     | +++     |
|      | 1    | 100       | ++      | -       | -       | 100     | +++     |
|      | 5    | 100       | +++     | -       | -       | -       | -       |

\* - ; none, + ; moderate, ++ ; good, +++ ; very good.

Table 2. Effects of NAA and zeatin on organogenesis from *W. subsessilis* internode cultured in WPM medium

| NAA  | Zeatin<br>(mg/L) | Callus    |         | Shoots  |         | Roots   |         |
|------|------------------|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|
|      |                  | formation | degree* | rate(%) | degree* | rate(%) | degree* |
| 0    | 0                | -         | -       | -       | -       | -       | -       |
|      | 0.001            | 17        | +       | -       | -       | -       | -       |
|      | 0.01             | -         | -       | -       | -       | -       | -       |
|      | 0.1              | 25        | +       | -       | -       | -       | -       |
|      | 1                | 43        | +       | -       | -       | -       | -       |
| 0.01 | 0                | 29        | +       | -       | -       | -       | -       |
|      | 0.001            | 100       | +       | -       | -       | -       | -       |
|      | 0.01             | 33        | +       | 17      | +       | -       | -       |
|      | 0.1              | 43        | +       | 14      | +       | -       | -       |
|      | 1                | 38        | +       | -       | -       | -       | -       |
| 0.1  | 0                | 100       | +       | 17      | +       | -       | -       |
|      | 0.001            | 100       | +       | -       | -       | -       | -       |
|      | 0.01             | 78        | +       | -       | -       | -       | -       |
|      | 0.1              | 88        | +       | 13      | +       | -       | -       |
|      | 1                | 63        | +       | 13      | +       | 25      | +       |
| 1    | 0                | 100       | ++      | -       | -       | 17      | +       |
|      | 0.001            | 100       | +++     | 83      | ++      | 17      | +       |
|      | 0.01             | 100       | +++     | 25      | +       | -       | -       |
|      | 0.1              | 100       | ++      | -       | -       | 25      | +       |
|      | 1                | 57        | +       | -       | -       | -       | -       |
| 5    | 0                | 100       | ++      | -       | -       | -       | -       |
|      | 0.001            | 83        | ++      | -       | -       | -       | -       |
|      | 0.01             | 100       | +++     | -       | -       | -       | -       |
|      | 0.1              | 100       | +++     | -       | -       | -       | -       |
|      | 1                | 100       | ++      | -       | -       | -       | -       |

\* - ; none, + ; moderate, ++ ; good, +++ ; very good.

## 2. 켈러스로부터 기관분화 유도

유도된 켈러스는 1mg/L NAA와 1mg/L BA 혼용처리구에서 180일간 계대배양 하여 증식시켰고, 증식된 켈러스를 이용하여 기관분화를 유도하기 위해 WPM, MS, MT배지에서 0.1~5mg/L NAA와 0~5mg/L BA를 단용 또는 혼용처리 하여 90일 간 배양하였다(Table 3, 4, 5, Fig. 1).

그 결과, 60일이 지나면서 뿌리의 발생이 관찰되었고, 절간 배양과 마찬가지로 NAA가 들어 있지 않은 배지에서는 켈러스가 갈변하였으며, NAA가 처리된 배지에서는 대부분 연한 켈러스로 만 증식함을 볼 수 있었다. 뿌리 분화는 WPM 배지의 1mg/L NAA와 0, 0.1mg/L BA 혼용처리구, MS 배지의 5mg/L NAA와 0.1mg/L BA 혼용처리구, MT배지의 1mg/L NAA 이상 처리구에서 뿌리가 양호하게 나타났다. 그러나, 5mg/L NAA인 경우에는 뿌리의 생육이 다소 억제되는 경향을 보였다. Shoot 분화는 대체적으로 모든 배지에서 저조하였으나, MT 배지의 1mg/L NAA와 0.1mg/L BA 혼용처리구와 WPM 배지의 1mg/L NAA 단용처리구에서 조금 유도되었다.

식물생장조절물질의 종류에 따른 기관분화 양상을 알아보기 위하여 WPM배지에 0~2mg/L 2,4-D와 0~1mg/L zeatin 그리고 0~1mg/L NAA와 0~5mg/L zeatin을 단용 또는 혼용 처리하여 90일간 배양하였다(Table 6, 7). 그 결과 대부분의 처리구에서 분화가 이루어지지 않았지만, 1mg/L 2,4-D 단용처리구에서 shoot가 유도되었고, 1mg/L NAA와 0.01mg/L zeatin 혼용처리구에는 60일 이 경과되면서 뿌리가 유도되기 시작하였다. 그리고 대부분의 처리구에서 켈러스의 증식만 계속되었다.



Table 3. Effects of NAA and BA on organogenesis from *W. subsessilis* callus cultured in WPM medium

| NAA<br>(mg/L) | BA  | Callus    |         | Shoots  |         | Roots   |         |
|---------------|-----|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|
|               |     | formation | degree* | rate(%) | degree* | rate(%) | degree* |
| 0             | 0   | -         | -       | -       | -       | -       | -       |
|               | 0.1 | -         | -       | -       | -       | -       | -       |
|               | 1   | 100       | +       | -       | -       | -       | -       |
|               | 5   | -         | -       | -       | -       | 13      | +       |
| 0.1           | 0   | 25        | +       | -       | -       | -       | -       |
|               | 0.1 | 100       | +       | -       | -       | -       | -       |
|               | 1   | 100       | ++      | -       | -       | -       | -       |
|               | 5   | 50        | +       | -       | -       | -       | -       |
| 1             | 0   | 63        | ++      | 13      | +       | 13      | +       |
|               | 0.1 | 88        | ++      | -       | -       | 13      | +       |
|               | 1   | 100       | ++      | -       | -       | -       | -       |
|               | 5   | 100       | ++      | -       | -       | -       | -       |
| 5             | 0   | 100       | +++     | -       | -       | -       | -       |
|               | 0.1 | 100       | +++     | -       | -       | -       | -       |
|               | 1   | 100       | ++      | -       | -       | -       | -       |
|               | 5   | 100       | ++      | -       | -       | -       | -       |

\* -; none, +; moderate, ++; good, +++; very good.

Table 4. Effects of NAA and BA on organogenesis from *W. subsessilis* callus cultured in MS medium

| NAA<br>(mg/L) | BA  | Callus    |         | Shoots  |         | Roots   |         |
|---------------|-----|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|
|               |     | formation | degree* | rate(%) | degree* | rate(%) | degree* |
| 0.1           | 0   | -         | -       | -       | -       | -       | -       |
|               | 0.1 | -         | -       | -       | -       | -       | -       |
|               | 1   | -         | -       | -       | -       | -       | -       |
|               | 5   | 25        | +       | -       | -       | -       | -       |
| 1             | 0   | -         | -       | -       | -       | -       | -       |
|               | 0.1 | 25        | +       | -       | -       | 13      | +       |
|               | 1   | 38        | +       | -       | -       | 25      | +       |
|               | 5   | 50        | ++      | -       | -       | -       | -       |
| 5             | 0   | 63        | ++      | -       | -       | -       | -       |
|               | 0.1 | 100       | +++     | -       | -       | 38      | ++      |
|               | 1   | 100       | +++     | -       | -       | 25      | +       |
|               | 5   | 100       | +++     | -       | -       | 13      | +       |

\* -; none, +; moderate, ++; good, +++; very good.

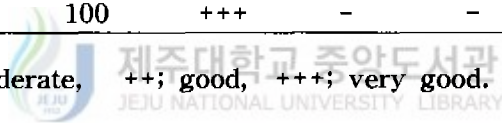


Table 5. Effects of NAA and BA on organogenesis from *W. subsessilis* callus cultured in MT medium

| NAA | BA  | Callus |                   | Shoots  |         | Roots   |         |    |
|-----|-----|--------|-------------------|---------|---------|---------|---------|----|
|     |     | (mg/L) | formation degree* | rate(%) | degree* | rate(%) | degree* |    |
| 0.1 | 0   |        | -                 | -       | -       | -       | -       |    |
|     | 0.1 |        | 13                | +       | -       | -       | -       |    |
|     | 1   |        | 38                | ++      | -       | -       | -       |    |
|     | 5   |        | 25                | +       | -       | -       | -       |    |
| 1   | 0   |        | 13                | +       | -       | 13      | ++      |    |
|     | 0.1 |        | 50                | ++      | 13      | +       | 13      | ++ |
|     | 1   |        | 100               | +++     | -       | -       | 13      | +  |
|     | 5   |        | 63                | ++      | -       | -       | 13      | +  |
| 5   | 0   |        | 13                | +       | -       | 13      | +       |    |
|     | 0.1 |        | 13                | +       | -       | 13      | ++      |    |
|     | 1   |        | 100               | +++     | -       | 38      | ++      |    |
|     | 5   |        | 100               | +++     | -       | 25      | ++      |    |

\* -: none, +: moderate, ++: good, +++: very good.

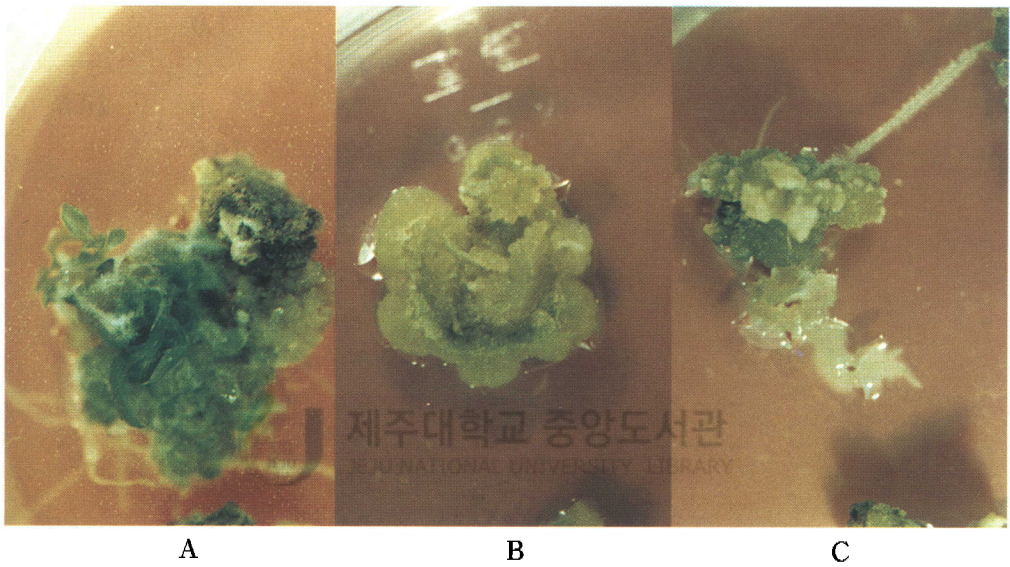


Fig. 2. Organogenesis from *W. subsessilis* callus cultured in MT medium for 60 days.

A: Shoot(0.1mg/L NAA + 1mg/L BA),

B: Callus(1mg/L NAA + 1mg/L BA),

C: Root( 0.1mg/L NAA + 1mg/L BA).

Table 6. Effects of 2,4-D and zeatin on organogenesis from *W. subsessilis* callus cultured in WPM medium

| 2,4-D<br>(mg/L) | Zeatin | Callus    |         | Shoots  |         | Roots   |         |
|-----------------|--------|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                 |        | formation | degree* | rate(%) | degree* | rate(%) | degree* |
| 0               | 0      | -         | -       | -       | -       | -       | -       |
|                 | 0.01   | -         | -       | -       | -       | -       | -       |
|                 | 0.1    | 50        | +       | -       | -       | -       | -       |
|                 | 1      | 63        | +       | -       | -       | -       | -       |
| 0.01            | 0      | 67        | +       | -       | -       | -       | -       |
|                 | 0.01   | 100       | ++      | -       | -       | -       | -       |
|                 | 0.1    | 100       | ++      | -       | -       | -       | -       |
|                 | 1      | 50        | ++      | -       | -       | -       | -       |
| 0.1             | 0      | 75        | +       | -       | -       | -       | -       |
|                 | 0.01   | 100       | ++      | -       | -       | -       | -       |
|                 | 0.1    | 100       | ++      | -       | -       | -       | -       |
|                 | 1      | 100       | +++     | -       | -       | -       | -       |
| 1               | 0      | 100       | ++      | -       | -       | -       | -       |
|                 | 0.01   | 100       | ++      | -       | -       | -       | -       |
|                 | 0.1    | 100       | +       | -       | -       | -       | -       |
|                 | 1      | 100       | +       | -       | -       | -       | -       |
| 2               | 0      | 25        | +       | -       | -       | -       | -       |
|                 | 0.01   | 50        | +       | -       | -       | -       | -       |
|                 | 0.1    | 89        | +       | -       | -       | -       | -       |
|                 | 1      | 50        | +       | -       | -       | -       | -       |

\* -; none, +; moderate, ++; good, +++; very good.

Table 7. Effects of NAA and zeatin on organogenesis from *W. subsessilis* callus cultured in WPM medium

| NAA  | Zeatin | Callus    |         | Shoots  |         | Roots   |         |
|------|--------|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|
|      |        | formation | degree* | rate(%) | degree* | rate(%) | degree* |
| 0    | 0      | -         | -       | -       | -       | -       | -       |
|      | 0.01   | -         | -       | -       | -       | -       | -       |
|      | 0.1    | 50        | +       | -       | -       | -       | -       |
|      | 1      | 75        | +       | -       | -       | -       | -       |
|      | 5      | 100       | +       | -       | -       | -       | -       |
| 0.01 | 0      | 50        | +       | -       | -       | -       | -       |
|      | 0.01   | 75        | +       | -       | -       | -       | -       |
|      | 0.1    | 100       | +       | -       | -       | -       | -       |
|      | 1      | 100       | +       | -       | -       | -       | -       |
|      | 5      | 100       | ++      | -       | -       | -       | -       |
| 0.1  | 0      | 50        | +       | -       | -       | -       | -       |
|      | 0.01   | 100       | +       | -       | -       | -       | -       |
|      | 0.1    | 100       | +       | -       | -       | -       | -       |
|      | 1      | 100       | ++      | -       | -       | -       | -       |
|      | 5      | 100       | ++      | -       | -       | -       | -       |
| 1    | 0      | 75        | ++      | -       | -       | -       | -       |
|      | 0.01   | 80        | ++      | -       | -       | 25      | +       |
|      | 0.1    | 100       | ++      | -       | -       | -       | -       |
|      | 1      | 100       | ++      | -       | -       | -       | -       |
|      | 5      | 100       | +       | -       | -       | -       | -       |

\* -: none, +: moderate, ++: good, +++: very good.

### 3. 내생 IAA 함량 분석

유도된 켈러스에서 기관분화를 유도한 결과(Table 3, 6), 배지 및 호르몬 종류에 관계없이 켈러스 증식이 높게 나타난 반면, 기관분화는 대부분의 처리구에서 극히 저조하거나 일어나지 않았다. 이러한 이유에서 외부 식물생장조절물질이 내생 IAA 함량에 어떻게 영향을 미치는지를 구명하기 위해 WPM배지에 NAA와 BA 그리고 2,4-D와 zeatin 처리구를 대상으로 내생 IAA의 함량을 측정하였다(Fig. 2, 3).

그 결과, NAA와 BA 처리구 보다는 2,4-D와 zeatin 처리구에서 함량이 비교적 높게 나타났다. 그리고 NAA와 BA 처리구 중에서는 5mg/L NAA와 1mg/L BA 처리구에서의 내생 IAA 함량이 22.4 $\mu$ g/g으로 가장 높게 나타났고(Table 3, Fig. 2), 2,4-D와 zeatin 처리구 중에서는 0.01mg/L 2,4-D 단용처리구에서 103.1 $\mu$ g/g으로 가장 높게 나타났다(Table 6, Fig. 3).

식물생장조절물질의 농도에 따른 내생 IAA 함량을 비교해 보면, 2,4-D가 높아질수록 내생 IAA 함량은 낮게 나타난 반면, NAA는 농도가 높을수록 IAA 함량은 높게 나타났다. 또 cytokinin인 경우는 zeatin은 농도가 높을수록 감소하는 경향을 보였지만 1mg/L BA일 때는 내생 IAA 함량이 높게 나타났다가 농도가 증가할수록 감소하였다. 그리고 켈러스의 상태와 내생 IAA 함량의 관계는 내생 IAA 함량이 가장 높게 나타난 0.01mg/L 2,4-D 일 때가 켈러스의 상단부에 녹색이 강하게 나타났으나 크기는 크게 변하지는 않았다. 또 0.1mg/L 2,4-D와 1mg/L zeatin 혼용처리구에서는 켈러스의 발달이 가장 왕성하게 일어나고 연두색의 켈러스가 나타났으나 IAA 함량이 비교적 작게 나타났다. 그리고 NAA와 BA 처리구인 경우는 내재 IAA의 함량이 높게 나타난 5mg/L NAA가 처리된 켈러스는 회백색의 켈러스로 증식되었다.

Shoot분화가 일어난 0.01mg/L 2,4-D 단용처리구에서의 IAA 함량은 다른 처리구에 비하여 매우 높게 나타났다. 그러나 뿌리가 분화한 NAA처리구에서는 대체로 낮게 나타났다.

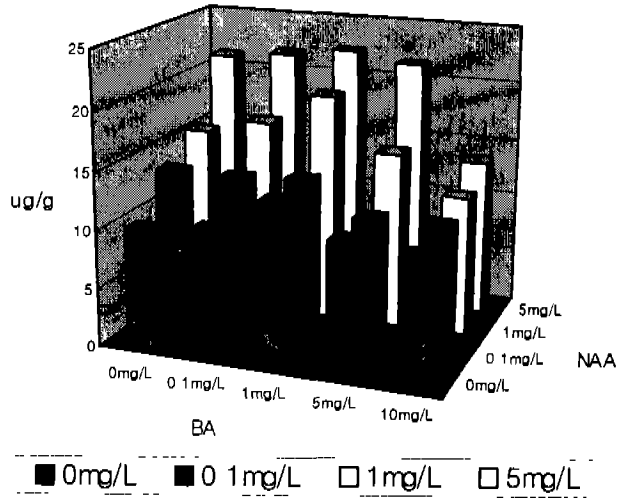


Fig. 2. IAA contents of *W. subsessilis* callus in different concentration of NAA and BA.

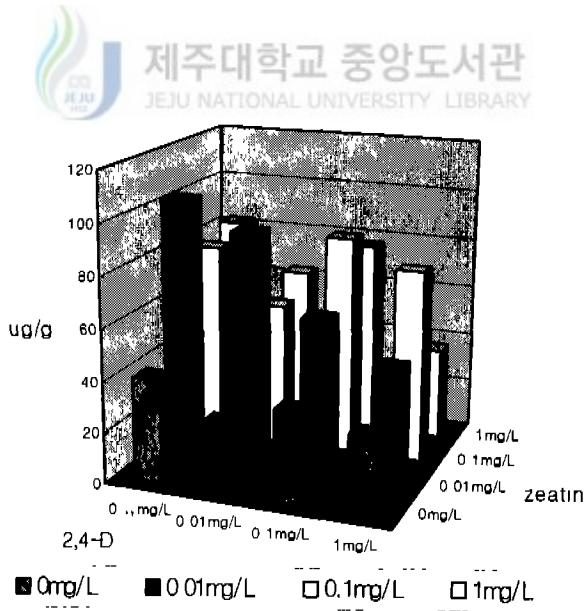


Fig. 3. IAA contents of *W. subsessilis* callus in different concentration of 2,4-D and zeatin.



## IV. 고찰

병꽃나무 절간에서의 켈러스 유도는 cytokinin에 관계없이 auxin이 첨가된 배지에서 양호하였고, auxin이 첨가되지 않은 배지에서는 켈러스가 아주 저조할 뿐만 아니라 증식이 더 이상 진행되지 않았다. 그리고 켈러스에서의 기관분화에서도 유사한 결과를 얻었다. 따라서 유자(Oh *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1995), 황벽나무(Kim *et al.*, 1992a)에서와 같이 auxin이 켈러스 유도 및 증식에 매우 효과적으로 작용하는 것으로 판단된다(Fujimura, 1980). 또 켈러스로부터의 기관분화를 유도하는 실험에서 기관분화 보다는 켈러스의 증식이 더 잘 이루어졌는데 NAA보다 2,4-D 저농도에서 켈러스의 증식이 양호하게 나타났다. 따라서 황벽나무와 같이 NAA보다는 저농도의 2,4-D 처리가 켈러스 증식에 유리한 것으로 판단된다(Kim *et al.*, 1992a).

한편, 병꽃나무 켈러스로부터의 기관분화는 배지에 따라 다른 결과가 나타났는데, WPM과 MT배지에서 줄기의 분화가 이루어졌으며, MT, WPM, MS 배지에서는 뿌리가 유도되었으나 MT배지에서 가장 양호하게 나타났다. 이는 초피나무(Song *et al.*, 1991)나 유자(Song *et al.*, 1991)의 기관분화와 일치하는 것으로, 배지의 무기물과 유기물의 비에서 기인하는 것으로 사료되는데, MS, MT, WPM 배지 조성을 비교해 보면, WPM배지는 MS배지에 비해 무기염류 함량이 0.5배 수준이고, MT배지는 MS배지에 비해 무기염류의 양은 같으나, 비타민류인 Thiamine HCl, Pyridoxine HCl, Nicotine HCl농도가 10배정도 많은데서 유추해 볼 수 있다.

그리고 모든 처리구에서 기관분화는 저조하게 나타났다. 이는 포플러의 극성분화 연구에서 NAA의 농도가 증가할수록 극성분화는 감소하고, 켈러스 형태로 지속되며(Song *et al.*, 1993), 외부에서 auxin을 처리하였을 때 부정아의 형성을 억제되는 것으로 보아(Douglas, 1984), 외부에서 auxin을 처리하는 것이 부정아 또는 기관분화를 억제하는 것으로 생각된다.

식물생장조절물질의 농도에 따른 기관분화와 내생 IAA 함량은 2,4-D인 경우 생장조절물질의 농도가 높아질수록 IAA 함량은 낮아지고 켈러스의 상태도 나빠진 반면, NAA인 경우는 생장조절물질의 농도가 높아질수록 IAA 함량은 높아지고 켈러스의 상태도 양호하였다. 또한 2,4-D는 켈러스 만이 증식되었지만, NAA 처리구에서는

캘러스 및 기관형성이 나타난 것으로 보아, 두 종류 auxin이 식물체내에서 이동과 산화작용에 의한 IAA의 확산과 분해율이 다르기 때문이라고 사료된다(Salisbury and Ross, 1978).

기관분화와 내생 IAA 함량과의 관계는 shoot분화가 일어난 처리구에서의 IAA 함량이 다른 처리구에 비하여 매우 높게 나타났으나, 뿌리가 분화한 처리구에서는 대체로 낮게 나타났다. 그리고 배지에 첨가한 zeatin 농도가 증가함에 따라 IAA 함량은 감소하였다. Shoot분화는 이루어지지 않고 캘러스 증식만 이루어졌다. 이는 cytokinin의 합성이 auxin의 농도와 반비례의 관계에 있고(Palni *et al.*, 1988), 내생 cytokinin의 수준은 외부 유래 cytokinin에 의해 증가되며 줄기가 형성되는 것으로 미루어 볼 때(Douglas, 1984), 포플러의 극성분화 연구에서 약 4일 까지 NAA만 포함된 배지에서 배양을 하다가 BA만 포함된 배지로 옮겨 준 경우 정상적인 배지에서 배양한 것과 차이가 없었고, 5일 이후까지 배양을 했을 경우는 캘러스 형태로 지속된 것처럼 장시간 NAA에 노출된 결과라고 사료된다(Song *et al.*, 1993).

이상의 결과들을 종합해 볼 때, 병꽃나무의 기내배양은 MT, MS, WPM 중 어떠한 배지를 사용하더라도 Thiamine HCl, Pyridoxine HCl, Nicotine HCl과 같은 유기물을 첨가하여 기내증식에 관한 연구가 수행되어야 한다고 사료되며, auxin종류와 처리시간을 다양하게 하여 부정아를 유도시키고, auxin의 처리시간에 따른 내생 IAA 함량과 기관분화 직전에 내생 IAA 함량 조사가 병행되어야 된다고 사료된다.

## V 적 요

본 연구는 병꽃나무 절간을 이용하여 기관분화 및 내생 IAA 함량 변화에 미치는 무기염류 및 식물생장조절물질의 영향을 조사하였다. 캘러스 유도는 auxin과 cytokinin을 처리한 WPM 배지를 이용하였고, 유도된 캘러스로부터의 기관분화는 NAA, 2,4-D 그리고 BA와 zeatin을 처리한 WPM, MS, MT 배지에서 유도하였으며, 이 때 내생 IAA 함량을 측정하였다.

절간에서의 캘러스 유도는 1mg/L NAA와 0.1mg/L BA 그리고 1mg/L NAA와 0.01mg/L zeatin을 혼용처리하였을 때 양호하였다. 그리고 캘러스에서의 shoot분화는 대부분 이루어지지 않았지만, 1mg/L NAA를 처리한 WPM 배지와 1mg/L NAA와 0.1mg/L BA를 혼용처리한 MT배지에서 유도되었다. 뿌리분화는 모든 배지에서 유도되었으며, 그 중에서도 MT배지에서 가장 양호하였다. 식물생장조절물질의 종류에 따른 분화는 NAA가 2,4-D보다 양호하였으며, BA가 zeatin 보다 양호하였다. 생장조절물질의 농도에 따른 내생 IAA의 함량은 0.01mg/L 2,4-D와 0.01mg/L zeatin 처리구에서 가장 높게 나타났고, NAA 농도가 높아갈수록 증가하였다. 그리고 zeatin, BA경우는 일정 농도까지는 상승하다가 급격히 저하됨을 보였다. 기관분화와 내생 IAA 함량과의 관계는 1mg/L NAA가 처리되었을 때 shoot와 뿌리가 형성되었는데 이때 내생 IAA 함량은 15.7 $\mu$ g/g 낮게 나타났다.

## VI. Reference

- An G. H. 1992. Current status and future perspectives of biotechnology using plant tissue culture techniques. *Kor. J. Plant Tissue Culture* 19(2): 55-58.
- Baruah A., Bordoloi D. N. 1989. High frequency plant regeneration of *Cymbopogon martinii* (Roxb.) wats by somatic embryogenesis and organogenesis. *Plant Cell Reports* 8(8): 483-485.
- Cho D. Y. 1973. Inhibition of adventitious root formation on epicotyl of *Azuki* by 6-substituted aminopurine. *Kor. J. Plant Tissue Culture* 1(1): 7-10.
- Cho D. Y., Soh W. Y. 1981. Adventitious root formation from the hypocotyl of *Phaseolus vulgaris*. *Kor. J. Plant Culture* 8(1): 23-26.
- Choi E. G., Park H. B., Kim K. S., Lee Y. E. 1995. Plant regeneration from immature zygotic embryos of *Stewartia koreana* Nakai via somatic embryogenesis. *Kor. J. Plant Tissue Culture* 22(2): 77-81.
- Douglas G. C. 1984. Formation of adventitious buds in stem internodes of *Populus* spp. cultured *in vitro* on basal medium : Influence of endogenous properties of explants. *J. Plant Physiol.* 116: 313-321.
- Douglas G. C. 1985. Formation of adventitious buds in stem internodes of *Populus* hybrid TT32 cultured *in vitro* : Effects of sucrose, zeatin, IAA,

and ABA. *J. Plant Physiol.* 121: 225-231.

Hwang B., Cho D. Y., Hong S. S. 1986. Physiological studies on the formation of hairy root by the *Agrobacterium rhizogenes*. *Kor. J. Bot.* 29(4) : 275-283.

Jun J. H., Chung K. H., Kang S. J., Lee D. K. 1999. Effects of growth regulators on micropropagation of peach *in vitro*. *Kor. J. Plant Tissue Culture* 26(1): 27-30.

Kim C. S., Koh J. G., Cho R. M. 1993. Effects of media, growth regulators and dark treatment on *in vitro* propagation using vegetative buds of *Prunus yedoensis* Matsumura. *Kor. J. Plant Tissue Culture* 20(4): 213-219.

Kim J. H., Goo, G. H., Choi, M. S., Park, Y. G. 1992. Micropropagation and soil adjustment of cork tree through *in vitro* culture. *Kor. J. Plant Tissue Culture* 19(1): 37-42.

Kim S. H., Kim M. W., Kang Y. H., Kang B. G., Lee S. H. 1992. Effects of polyamines on adventitious shoot regeneration from *Populus* leaf segments. *Kor. J. Bot.* 35(1): 17-23.

Lee S. G., Park Y. G. 1989. Plant regeneration from callus of *Ailanthus altissima* Swingle. *J. Kor. For. Soc.* 78: 412-418.

Lloyd G., McCown B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined*

*Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30: 421-427.

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15: 473-487.

Murashige T., Toker D. P. H. 1969. Growth factor requirement of *Citrus* tissue culture *Proc. First Inter. Citrus Symp.* 3: 1155-1161.

Nishio M., Zushi S., Ishii T., Furuya T., Syono K. 1976. Mass fragmentographic determination of indole-3-acetic acid in callus tissue of *Panax ginseng* and *Nicotiana tabacum*. *Chem. Pharm. Bull.* 24(9): 2038-2042.

Oh S. D., Sang W. S., Kim J. S., Park E. H. 1991. *In vitro* micropropagation of yooza(*Citrus junos* sieb. et Tanaka). I. Plant regeneration from callus induced from shoot tip. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 32(1): 87-96.

Park M. H., Chung H. H., Lee S. Y., Kim H. S. 1995. Plant regeneration from zygotic embryo-derived callus in *Citrus Junos* Sieb. *Kor. J. Plant Culture* 22(4): 189-194.

Palni L. M. S., Burch L., Horgan R. 1988. The effects of auxin concentration on cytokinin stability and metabolism. *Planta* 174: 231-234.

Paterson K. E. 1983. Polarity or regeneration in excised leaves of *Crassula argentea*. I. A role of auxin. *Can. J. Bot.* 61: 1058-1063.

- Reynolds T. L. 1986. Somatic embryogenesis and organogenesis from callus cultures of *Solanum carolinense* : Origin and development of regenerated plants. *Amer. J. Bot.* 76: 609-613.
- Smulders M. J. M., Croes A. F., Wullems G. J. 1988. Polar transport of 1-naphthaleneacetic acid determines the distribution of flower buds on explants of tobacco. *Plant Physiol.* 88: 752-756.
- Song J. J., Kim M. W., Lee S. H., Kang B. G., Kang Y. H. 1993. Mechanism of polar differentiation of *Poplar*: Endogenous hormone content and effect of NAA and polyamine on polar differentiation. *Kor. J. Plant Tissue Culture* 20(1): 21-26.
- Song W. S., Oh S. D., Park E. H. 1991. *In vitro* propagation of yooza(*Citrus junos* sieb. et Tanaka). II. Callus induction somatic embryogenesis and plant regeneration from shoot tip and immature ovule. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 32(2): 206-215.
- Song W. V., Oh S. D., Park E. H., Yu S. O. 1991. *In vitro* propagation of *Zanthoxylum piperitum* DC. *Kor. J. Plant Tissue Culture* 18(1): 17-25.
- Yadav U., Lal M., Jaiswal V. S. 1990. *In vitro* micropropagation of the tropical fruit tree *Syzygium cuminii* L. *Plant cell Tissue Organ Culture* 21(1): 87-92.
- 小島邦彦. 1993. 식물조직배양의 영양학. 지구문화사. pp. 57-59.
- 이창복. 1980. 대한식물도감. 향문사. pp. 708.