

수종 식물호르몬이 양란의 Somatic embryo 분화에 미치는 영향(II)

鄭 忠 德

Hormonal Control of Somatic Embryo Development from Cultured Cell of *Cymbidium janette*. (II)

Chung Choong-duk

Summary

The effect of indoleacetic acid, kinetin and gibberellin on the development and differentiation of somatic embryo from cultured cell of *Cymbidium janette* were observed. The results obtained from the present work are as follows;

As compared with control, hormonal treatment brought about promoted level of a number of protocorm and embryo differentiation.

With 10^{-6} M IAA + 10^{-5} M kinetin promoting the formation of meristematic tissue on the all surface of embryo, but these are completely undifferentiated protocorm.

Differentiation of somatic embryo, when treatment with various combinations of hormones were tested, the maximal differentiation was observed with 10^{-6} M IAA + 10^{-5} M kinetin + 10^{-5} M GA₃ in suspension culture.

The results demonstrated that gibberellin can effectively control differentiation of plant organ, kinetin and IAA effect on cell division.

서 론

본 실험은 전보 (Chung, 1984)에 이어 식물 생장촉진 호르몬인 IAA, kinetin, gibberellin 이 양란의 조직배양 세포에서 somatic embryo 형성 및 shoot, root, xylem의 분화에 미치는 영향을 밝히려 한다. suspension culture를 통하여 embryo의 형성에 관한 보고는 Vasil (1981, 1982) 등이 *Pennisetum americanum* 을 재료로 2,4-D처리를 않은 상태에서 IAA와

kinetin 처리시에 embryo의 형성을 조사 하였으며, Gleddie(1983)등은 *Solanum melongena*에서 NAA 처리시에 최대수의 embryo의 형성이 이루어졌으며 cytokinin은 embryo의 형성을 저해하나 shoot의 형성은 촉진한다는 보고가 있고, Aung(1978)등은 *Lycopersicon esculentum*에서 GA₄, GA₇ 등을 처리하여 cotyledonary bud의 형성저해 실험을 하였고 토마토의 벗겨진 줄기에서 IAA 및 kinetin에 의한 shoot형성 촉진 실험을 한 바 있으며 cytokinin에 의한 xylem fiber의 형성이 유도

된다는 보고 (Aloni, 1982)도 있다. 그외에 *Lycopersicon species*에서 callus 형성과 shoot 및 root의 형성에 IAA와 kinetin이 처리된 배지에서 효과가 있다는 실험결과 (Locy, 1983)도 있으며, Vasil(1984) 등은 옥수수를 조직배양을 통해 2,4-D처리하여 embryo 및 개체 분화까지 유도하였다. 기관분화에 대한 조직학적 연구에 관하여는 Ronchi(1980), Chlyah (1984) 등이 담배와 베고니아를 재료로 가도관 분화와 근모, 싹, 뿌리의 분화에 대한 보고가 있으며 독당근에서의 싹의 분화 (Owens, 1984)에 대한 실험 보고 등이 있다.

따라서 본 실험은 위의 보고들을 토대로 하여 조직배양 및 embryo 형성 방법 (Fujimura, 1979. Ammirato, 1977. Guha, 1966. Olson, 1981)을 이용하여 양란의 호르몬 조합별 처리에 따른 분화에 미치는 영향을 조직학적인 면에서 조사하였다.

재 료 및 방 법

1. 실험재료

본 실험에서 사용한 양란 callus는 시판중인 *Cymbidium Janette* 'Golden Treasure'에서 1982년 3월 생장점 배양으로 얻어 계속 계대배양 시킨 것이다.

2. 실험방법

1) Callus 제작

양란의 생장점을 분리하여 10% calcium hypochlorite로 5분간 소독한 후 무균수로 씻어 MS 한천배지에 이식하여 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 항온기 (삼화기기 Model IB121)로 암조건에서 callus를 유도하여 이것을 15일 마다 계대배양 시킨 후 사용하였다.

2) 배양액의 조성

기본배지로 MS배지를 사용하였고 각 시험구의 호르몬 농도는 예비실험을 통하여 Table 1과 같이 하였으며 pH는 autoclave 처리 전에 5.7에 0.1N KOH, 0.1N HCl로 맞추었다.

Table 1. The concentration of plant hormones in the MS medium.

Treatment	Combination of hormones
A	10^{-5}M Kinetin + 10^{-5}M GA ₃
B	10^{-6}M IAA + 10^{-5}M GA ₃
C	10^{-6}M IAA + 10^{-5}M Kinetin
D	10^{-6}M IAA + 10^{-5}M Kinetin + 10^{-5}M GA ₃
control	Free of hormones in the MS medium

3) Stock 및 Suspension culture

(1) Stoke

한천배지에서 배양한 callus를 호르몬의 전력을 없게하기 위해 호르몬을 첨가하지 않은 액체배지에서 RPM 60의 진탕배양기 (국제이화학기기 Model; SH)로 15일씩 3회 반복 계대배양한 후 stock으로 사용하여 가능한 동시성 (Fujimura, 1979)의 protocorm이 형성되도록 처리하였다.

(2) Suspension culture

각 시험구 별로 200ml의 erlenmeyer flask에 배지를 100ml씩 분주하고 stock suspension으로 부터 protocorm을 넣는다. 이것을 RPM 60의 진탕배양기에서 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 명조실에서 배양한다.

4) 고정 및 영구프레파라트 제작

조직학적 조사를 위하여 조직을 glacial acetic acid, propionic acid, formalin, formaldehyde, picric acid, calcium chloride를 섞은 고정액으로 고정한 후 alcohol series로 탈수하여 paraffin으로 embedding하였다. 이것을 다시 rotary microtome으로 20 μ m의 두께로 자르고 hemalum과 safranin에 의한 염색(Berlyn, 1976)하여 프레파라트를 제작 관찰하였다.

결과 및 고찰

Fig.1은 액체진탕배지에서 호르몬 처리를 하지 않은 대조구(E)에 대한 호르몬 처리구의 기관 분화와 protocorm의 증가경향을 보여준다. 특히 10^{-6} M IAA + 10^{-5} M kinetin + 10^{-5} M GA₃ 처리구(D)의 경우는 다른 처리구에 비해 shoot 및 root의 형성이 현저하게 잘 이루어지고 있다. 그러나 protocorm의 수의 증가는 뚜렷하지 못하다. 오히려 10^{-6} M IAA + 10^{-5} M kinetin 처리구(C)에서는 D처리구에 비해 개체의 분화는 잘 되지 않으나 protocorm의 수의 증가는 뚜렷하게 나타나서 좋은 대조를 보여주고 있다. 10^{-6} M IAA + 10^{-5} M GA₃를 처리한 경우(B)는 D의 처리구 보다는 떨어지나 다른 처리구 보다는 분화가 잘 되고 있음을 보여준다. 그러나 D의 처리구에서 shoot의 형성결과와 비교하여 보면 크기가 작고 root의 형성은 나타나지 않음을 Fig.1 및 조직학적 결과(Fig. 6, 7, 8, 9)에서 알 수 있었다. 호르몬을 처리하지 않은 대조구의 경우(E)는 분화도 잘 이루어지지 않았으며 protocorm수의 증가도 다른 시

험구에 비해 떨어졌다. 호르몬 처리의 결과는 IAA 및 kinetin이 식물체 내에서 callus 형성에 관여한다는 Locy의 보고와는 같으며 shoot의 형성에 IAA와 kinetin이 효과적이라는 보고(Amasino, 1982)와는 차이가 있다.

Fig.2는 분열조직으로 protocorm이 싸여 있음을 보여주며 특히 대조구 및 10^{-5} M kinetin + 10^{-5} M GA₃, 10^{-6} M IAA + 10^{-5} M GA₃, 10^{-6} M IAA + 10^{-5} M kinetin 처리구의 경우에 대부분이 이런 조직으로 이루어져 있었다. 특징은 세포의 크기가 작고, 특히 protocorm 주위에 치밀한 배열 또는 모여있는 상태로 존재한다. 위의 10^{-6} M IAA + 10^{-5} M GA₃ 처리구의 일부를 제외한 처리구에서는 이런 분열조직으로 이루어져 있으며 분화된 형태는 보이지 않는다.

Fig.3은 10^{-6} M IAA + 10^{-5} M GA₃ 처리구(B)의 일부와 10^{-6} M IAA + 10^{-5} M kinetin + 10^{-5} M GA₃ 처리구의 경우에 많이 있는 bud meristem의 형태이다. bud meristem의 분화와 거의 동시에 leaf primordia의 형성도 되고 있음을 보여주며 이 시기에 물관부와 기공의 일부도 분화되고 있음을 보여주었다.

Fig.4,5는 10^{-6} M IAA + 10^{-5} M kinetin + 10^{-5} M GA₃ 처리구에서 배양 28일 후 분열조직이 더욱 분화된 형태를 보여주는 것인데 10^{-6} M IAA + 10^{-5} M GA₃의 경우는 이와 가깝게 분화된 것은 매우 드물고 나머지 10^{-5} M kinetin + 10^{-5} M GA₃, 10^{-6} M IAA + 10^{-5} M kinetin 및 대조구에서는 전혀 이런 분화는 이루어지지 않았다. 특이한 점은 물관부의 일부가 Fig.3에서 보다 더 shoot apex 쪽으로 분화되었음을 보여주며 이 경우의 핵은 다른 세포의 핵과는 다르게 길이로 신장된 모양을 하고 있다.

Fig.5에서는 덜 분화된 형태이기는 하나 기공들이 일부 보인다.

Fig.6은 10^{-6} M IAA + 10^{-5} M kinetin +

$10^{-5}M$ GA₃ 처리구와 $10^{-6}M$ IAA+ $10^{-5}M$ GA₃ 처리구에서만 볼 수 있었던 뿌리의 분열조직이다. 이것은 Fig.3의 bud meristem과 같이 세포의 크기가 작고 치밀한 배열을 하고 있으며 바깥쪽에는 이미 성숙된 표피 세포들이 싸고 있는 것이 차이가 있다.

Fig.7은 Fig.6 보다 더 발달된 형태의 root primordium을 보여주며 물관부가 거의 성숙된 형태로 보이며 전체가 비교적 큰 세포로 된 표피로 싸여 있는것을 볼 수 있다.

Fig.8은 뿌리가 완전하게 분화된 경우의 세로로 절단한 모양이며 표피와 후각조직이 뚜렷하게 나누어져 있으며 세포의 크기와 핵의 크기가 비교적 크다. 특이한 점은 표피의 밖에 근모가 많이 존재한다는 점이다.

Fig.9는 $10^{-6}M$ IAA + $10^{-5}M$ kinetin + $10^{-5}M$ GA₃ 처리구에서 거의 완전하게 분화된 뿌리부분을 가로로 절단한 모양이다. 전체적으로

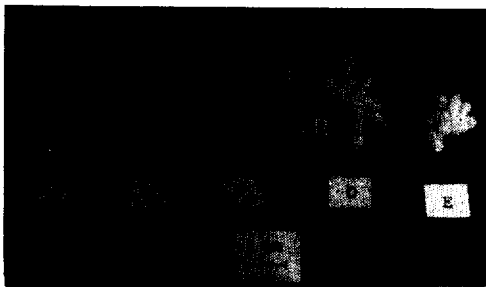


Fig.1. Effect of hormones combination on development of *Cymbidium janelle* somatic embryo grown in continuous light in suspension culture. The photograph was taken 28 days after culture. Comparable embryos grown with $10^{-5}M$ kinetin+ $10^{-5}M$ GA₃(A), $10^{-6}M$ IAA + $10^{-5}M$ GA₃(B), $10^{-6}M$ IAA + $10^{-5}M$ kinetin(C), $10^{-6}M$ IAA + $10^{-5}M$ M kinetin + $10^{-5}M$ GA₃(D), without exogenous hormone(E). Note the addition $10^{-6}M$ IAA + $10^{-5}M$ kinetin + $10^{-5}M$ GA₃(D) gave root(R) and shoot(S).

보아 세포의 크기가 커지고 일부 세포의 핵은 소실된 것도 있다. 내피안쪽에는 물관부와 체관부가 뚜렷하게 구별되어 있음을 볼 수 있다.



Fig.2. Effect of $10^{-6}M$ IAA + $10^{-5}M$ kinetin on the development of *Cymbidium janelle* embryo grown in continuous light in suspension culture. Showing the meristematic tissue(MT) formed on the all surface of early stage of embryo.(X150)

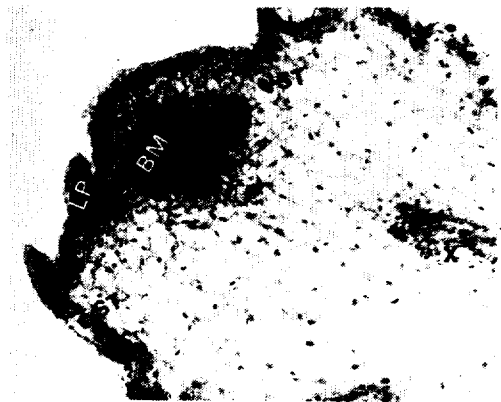


Fig.3. Specimen treated with $10^{-6}M$ IAA+ $10^{-5}M$ kinetin or $10^{-6}M$ IAA+ $10^{-5}M$ kinetin + $10^{-5}M$ GA₃. Showing the bud meristem with two incipient leaf primordia and xylem vessel elements. LP, leaf primordia; BM, bud meristem; ST, stomata; X, xylem vessel elements. (X150)



Fig.4. Specimen treated with 10^{-6} M IAA + 10^{-5} M kinetin + 10^{-5} M GA_3 . Longitudinal section through embryo with shoot primordia. Showing the early stage of shoot apex. LP, leaf primordia; SA, shoot apex; X, xylem vessel elements. (X150)

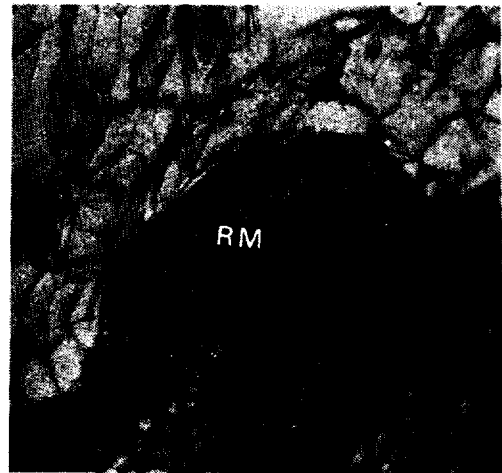


Fig.6. Specimen treated with 10^{-6} M IAA + 10^{-5} M kinetin + 10^{-5} M GA_3 . Showing the root meristem formed from superficial layers of the embryo. RM, root meristem. (X150)

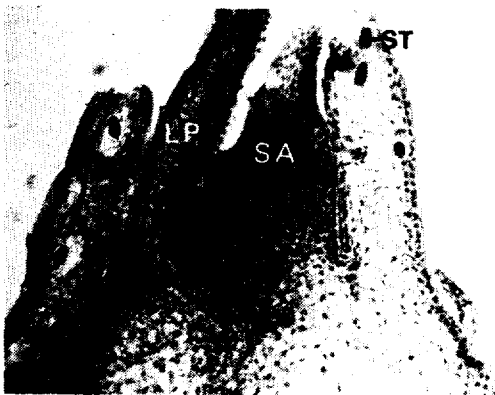


Fig.5. Specimen treated with 10^{-6} M IAA + 10^{-5} M kinetin + 10^{-5} M GA_3 . Longitudinal section through embryo with shoot primordia. Showing the greatly enlarged shoot apex with leaf primordia and stomata. SA, shoot apex; LP, leaf primordia; ST, Stoma. (X150)

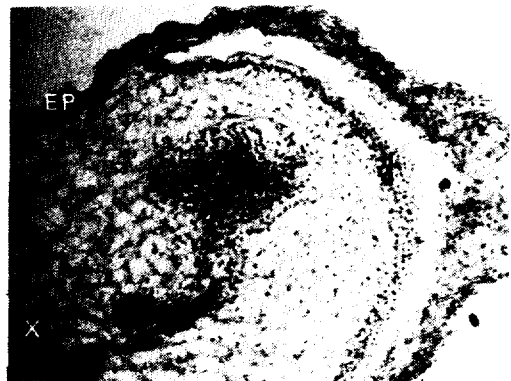


Fig.7. Specimen treated with 10^{-6} M IAA + 10^{-5} M kinetin + 10^{-5} M GA_3 . Showing the greatly enlarged and differentiated root primordium and xylem vessel elements. EP, epidermis; RP, root primordium; X, xylem vessel elements. (X150)

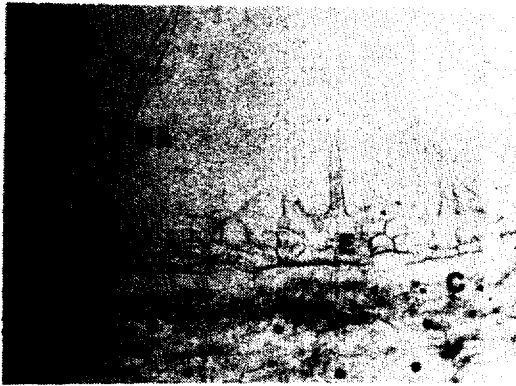


Fig.8. Specimen treated with $10^{-6}M$ IAA + $10^{-5}M$ kinetin + $10^{-6}M$ GA₃. Longitudinal section through embryo with root epidermis. Rh, root hair; E, epidermis; C, collenchyma. (X150)

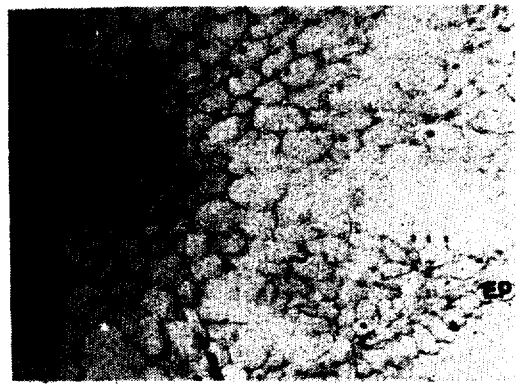


Fig.9. Crosssection through embryo with root epidermis. EP, epidermis; En, endodermis; X, xylem; P, phloem. (X150)

적

양란 (*Cymbidium janelle*)을 재료로하여 식물생장 촉진 호르몬인 IAA, kinetin, gibberellin을 조합처리 한 후 진탕배양하여 개체분화에 미치는 영향을 조사하여 몇가지 결론을 얻었다.

대조구에 비하여 호르몬 처리구의 경우 protocorm 수의 증가와 embryo의 분화가 높았다.

$10^{-6}M$ IAA + $10^{-5}M$ kinetin처리구에 있

요

어서는 생장분열조직이 embryo의 표면을 이루고 있으며 이것은 전혀 분화되지 않은 것이다.

Somatic embryo의 분화는 $10^{-6}M$ IAA + $10^{-5}M$ kinetin + $10^{-6}M$ GA₃처리구에서 root와 shoot 및 물관부의 형성이 현저하다.

이러한 결과로 보아 양란의 배양에 있어서 GA₃는 기관분화에 영향을 주며 kinetin과 IAA는 세포의 증식에 영향을 주고 있다고 사료된다.

參 考 文 獻

- Aloni, R. 1982. Role of cytokinin in differentiation of secondary xylem fibers. *Plant Physiol.* 70:1631-1633.
- Amasino, R.M. *et al.* 1982. Hormonal control of tobacco crown gall tumor morphology. *Plant Physiol.* 69:389-392.
- Ammirato, P.V. 1977. Hormonal control of somatic embryo development from cultured cell of caraway. *Plant Physiol.* 59:579-586.
- Aung, L.H. *et al.* 1978. Hormones and young leaves control development of cotyledonary buds in tomato seedlings. *Plant physiol.* 62:276-279.
- Berlyn, G.P. *et al.* 1976. Botanical microtechnique and cytochemistry. The Iowa State Univ. Press. pp. 24-129.
- Chlyah, A. *et al.* 1984. Histological changes in epidermal and subepidermal cell layers of begonia rex induced to form *de novo* unicellular hairs, buds, and roots. *Bot. Gaz.* 145(1): 55-59.
- Chung, C.D. 1984. Hormonal control of somatic embryo development from cultured cell of *Cymbidium janette*. (I) Che ju National Univ. jour. Natural Sci. 17:189-195.
- Fujimura, T. *et al.* 1979. synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Physiol.* 64:162-164.
- Gleddie, S. *et al.* 1983. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants and cell suspensions of *Solanum melongena* (eggplant). *Can. J. Bot.* 61:656-666.
- Guha, S. *et al.* 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. *Nature.* 212:97-98.
- Lacy, R.D. 1983. Callus formation and organogenesis by explants of six *Lycopersicon* species. *Can. J. Bot.* 61:1072-1079.
- Olson, A.R. 1981. Embryo and endosperm development in ovules of *Papaver nudicaule* after *in vitro* placental pollination. *Can. J. Bot.* 59:1738-1748.
- Owens, J. N. 1984. Bud development in mountain hemlock (*Tsuga mertensiana*). II. Cone-bud differentiation and predormancy development. *Can. J. Bot.* 62:484-493.
- Ronchi, V.N. 1980. Histological study of organogenesis *in vitro* from callus cultures of two *Nicotiana* species. *Can. J. Bot.* 59:1969-1977.
- Vasil, V. 1981. Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Pennisetum americanum*, and *P. americanum* × *P. purpureum* hybrid. *Amer. J. Bot.* 68(6):864-872.
1982. Characterization of an embryogenic cell suspension culture derived from cultured inflorescences of *Pennisetum americanum* (Pearl millet, Gramineae). *Amer. J. Bot.* 69(9): 1441-1449.
1984. Somatic embryogenesis in long-term callus cultures of *zea mays* L. (Gramineae). *Amer. J. Bot.* 71(1):158-161.