

수종 식물호르몬이 양란의 Somatic embryo 분화에 미치는 영향(I)

鄭 忠 德

Hormonal Control of Somatic Embryo Development from Cultured cell of *Cymbidium janette*

Choong-duk, Chung

Summary

The effect of indoleacetic acid, kinetin and gibberellin on the development 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 development.

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

With 10^{-6} M IAA+ 10^{-5} M kinetin promoting a large number of protocorm formation, but these are completely undifferentiated protocorm.

The results demonstrated that gibberellin can effectively control somatic embryo development, kinetin and indoleacetic acid effect on cell division.

서 언

본 실험은 전보 (Chung, 1982)에 이어 식물생장촉진 호르몬인 IAA, Kinetin, Gibberellin이 식물의 조직배양세포에서 Somatic embryo의 형성 및 분화에 미치는 영향을 밝히려 한다. Indoleacetic acid는 식물체 내에서 Bandurski (1977) 등의 보고에 따르면 free IAA, esterified IAA, peptidyl IAA 등의 상태로 존재하며 in vitro에서 hypocotyl의 생장촉진(Terry 1982, Vanderhoef 1981)에 관여 한다는 최근의 보고가 있다. 또는 Cytokinin은 세포분열 및 Embryo 형성을 촉진(Helgeson, 1968)한다고 알려졌으며 Gib-

berellin은 Hypocotyl의 신장촉진(Stuart 1977, Jacobs 1965, Junttila 1982, Silk 1975) 등에 작용하며 IAA의 농도 과다치리로 인한 신장억제 현상을 보상하는 효과가 있다는 보고(Rapoport 1978, Masheshwari, 1980)도 있다. 또한 식물의 조직배양을 통한 Embryo의 발생에 미치는 식물생장호르몬의 영향에 관하여는 Helgeson(1968)이 담배 배양조직의 Shbot 형성에 미치는 영향, Aung(1978), Nyman(1981), Gledie(1983) 등이 도마도, 소나무 가지 등에서 kinetin, IAA, NAA가 Shoot, Bud, 뿌리, Embryo의 형성에 관여 한다는 발표가 있었다.

이상의 보고에서는 식물체 조직마다 작용효과를 일으키는 호르몬의 농도가 다르며 효과도 차이가 있다.

따라서 본 실험은 양란의 Embryo 형성 및 개체 분화에 최적한 호르몬의 농도규명과 Somatic embryo의 형성에 미치는 영향을 조직배양 및 Embryo 형성방법 (Martin 1977, Fujimura 1979, Guha 1966, Vasil 1981, 1982, Locy 1983, Kang 1979, 1980, Chung 1982, Wernicke 1980)을 이용하여 조사 하였다.

실험재료 및 방법

실험재료

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

실험방법

가. Callus 제작

양란의 생장점을 분리하여 10% Calcium hypochlorite로 5분간 소독한 후 무균수로 씻어 MS한천배지에 이식하여 25 ± 1℃ 항온기(삼화기기 Model IB 121)로 암조건에서 Callus를 유도하여 이것을 15일마다 계대배양 시킨 후 사용하였다.

나. 배양액의 조성

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

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

Treatment	Combinations of hormones
A	10 ⁻⁶ 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

다. Stock 및 Suspension Culture

1) Stock

한천배지에서 배양한 Callus를 호르몬의 전력을 없게 하기 위해 호르몬을 첨가하지 않은 액체배지에서 RPM 120의 진탕배양기(국제이화학기기 Model. SH)로 15일씩 3회 반복 계대배양한 후 Stock으로 사용하여 가능한 동시성(Fujimura, 1979)의 protocorm이 형성 되도록 하였다.

2) Suspension Culture

각 시험구 별로 200ml의 Erlenmeyer flask에 배지를 100ml씩 넣고 Stock Suspension으로 부터 protocorm을 넣는다. 이것을 RPM 120의 진탕배양기에서 25 ± 1℃의 명조건에서 배양한다.

3) Agar Culture

Suspension Culture와 같이 200ml의 Erlenmeyer flask에 배지를 100ml씩 넣고 Stock suspension으로 부터 protocorm을 넣어 25 ± 1℃의 명조건에서 항온기에서 배양한다.

생육조사 및 분석방법

대조구에 대한 호르몬 처리구의 생육과 한천배양배지에 대한 액체배양지의 생육조사는 4 반복수로 배양 4일마다 protocorm 수의 증가로 측정하였으며 somatic embryo의 생장 및 분화는 그림으로 나타 내었다.

결과 및 고찰

Table 2와 Fig 1은 한천배지에서 배양시킨 양란 protocorm의 수의 변화로 본 생육상이다. 대조구의 경우 배양 후 24일까지 protocorm수가 증가되는 경향을 보이며 배양 24일 이후 증가는 보이지 않았다. 가장 왕성한 증가를 보인 시기는 배양 후 8일 이내였으며 배양 28일 후 protocorm 수는 처음 보다 1.41배

증가되었다. 한편, 대조구에 대한 호르몬 처리구의 protocorm 수의 증가는 뚜렷하나 ($p < 0.01$) 호르몬 처리구간에는 유의성을 나타내지 않았으며 호르몬 처리구의 경우 배양 28일 후 1.51~1.58배의 증가를 보였다. 한천배양 결과에서 보면 fig. 3의 1과 같이

protocorm의 크기와 수의 증가보다는 Shoot 및 뿌리를 형성하는 개체분화의 경향을 나타내는 것을 알 수 있으며 배양 12일 후 호르몬 처리구의 Shoot는 약 3mm로 자랐으며 배양 28일 후 6.7mm가 되었다. 또한 배양 2개월 후에는 fig. 4의 2와 같이 분화가 되었다.

Table 2. Effect of IAA, Kinetin, GA₃ on differentiation of *Cymbidium janette* in agar media culture

Treatment	No. of protocorm / Initial no. of protocorm						
	4	8	12	16	20	24	28(day)
A. Kinetin+GA ₃	1.25 ± 0.02	1.34 ± 0.03	1.41 ± 0.03	1.47 ± 0.01	1.51 ± 0.03	1.51 ± 0.03	1.51 ± 0.03*
B. IAA+GA ₃	1.34 ± 0.12	1.37 ± 0.15	1.43 ± 0.16	1.50 ± 0.16	1.53 ± 0.16	1.58 ± 0.19	1.58 ± 0.19*
C. IAA+Kinetin	1.37 ± 0.07	1.43 ± 0.07	1.48 ± 0.07	1.49 ± 0.07	1.51 ± 0.06	1.51 ± 0.06	1.51 ± 0.06*
D. IAA+Kin.+GA ₃	1.40 ± 0.21	1.43 ± 0.21	1.47 ± 0.21	1.51 ± 0.22	1.51 ± 0.22	1.55 ± 0.22	1.55 ± 0.22*
E. Control	1.10 ± 0.04	1.22 ± 0.03	1.28 ± 0.06	1.33 ± 0.08	1.34 ± 0.08	1.41 ± 0.04	1.41 ± 0.04

1. Each result, represents the average frequency (±SE) of the four replicates of each treatment.
* Significantly different from control at 1% level.

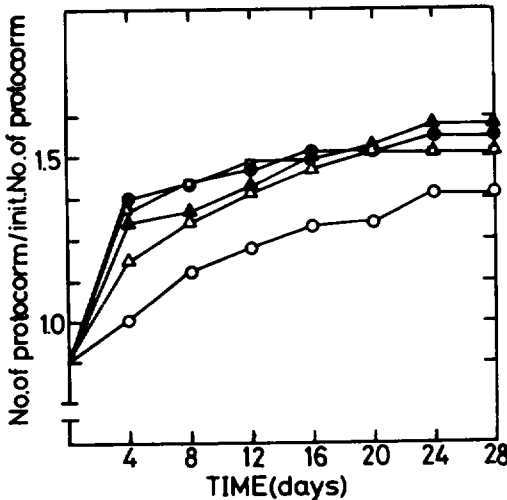


Fig. 1. Changes in the number of protocorm by various combinations of hormones in agar culture. Control (○), 10⁻⁶M Kinetin+10⁻⁵M GA₃ (△), 10⁻⁶M IAA + 10⁻⁶M GA₃ (▲), 10⁻⁶M IAA + 10⁻⁶M Kinetin + 10⁻⁶M GA₃ (□), 10⁻⁶M IAA + 10⁻⁶M Kinetin (●).

Table 3 및 Fig. 2는 액체배양매에서 배양시kin 양란의 protocorm 수의 증가를 배양시기별로 본 생육상이다. 대조구의 경우 전 배양기간을 통하여 pro-

tocorm 수가 증가하는 경향을 보였으며 배양후 16일부터 24일 사이에 왕성한 증가 경향을 나타내었다. 배양 28일 후 2.38배의 증가가 되어 한천배양시 1.41배 보다 높았다. 대조구에 대한 호르몬처리구의 protocorm 수의 증가는 배양 28일 후 2.71배에서 4.45배 사이의 증가를 보여 한천배양에서의 결과 보다 더욱 뚜렷하며 10⁻⁶M IAA + 10⁻⁵M GA₃, 10⁻⁵M Kinetin + 10⁻⁵M GA₃, 10⁻⁶M IAA + 10⁻⁵M Kinetin + 10⁻⁵M GA₃ 처리구간에는 뚜렷한 차이를 나타내지 않았으나 10⁻⁶M IAA + 10⁻⁶M Kinetin 처리구의 경우 배양 4일 이후 대조구 및 다른 호르몬 처리구에 비하여 protocorm 수의 증가가 가장 높았으며 배양 28일 후 4.45배가 되었다. 이것은 Fig. 3의 2와 Fig. 5의 D에서 보는 바와 같이 10⁻⁶M IAA + 10⁻⁶M Kinetin + 10⁻⁵M GA₃ 처리구는 개체분화가 왕성하게 일어나서 protocorm 수의 증가가 잘 이루어지지 않은 결과와 좋은 대조를 이루며 IAA 및 Kinetin이 식물체내에서 Callus 형성에 관여한다는 Locy(1981)의 보고와는 같으나 Amasino(1982)가 Shoot 형성에 IAA와 Kinetin이 효과적이라는 보고와는 다르다. 양란에서 IAA + GA₃+Kinetin 처리구의 분화현상과 IAA+GA₃ 처리구 및 Kinetin+GA₃ 처리구의 일부 protocorm의 분화 현상으로 볼때 GA₃가 양란에서 Shoot 및 Root 의

Table 3. Effect of IAA, Kinetin, GA₃ on differentiation of *Cymbidium janette* in suspension culture

Treatment	No. of protocorm/Initial no. of protocorm						
	4	8	12	16	20	24	28(day)
A. Kinetin+GA ₃	1.15 ± 0.03	1.30 ± 0.03	1.47 ± 0.05	1.97 ± 0.13	2.43 ± 0.31	2.88 ± 0.19	2.88 ± 0.19
B. IAA+GA ₃	1.22 ± 0.05	1.47 ± 0.14	1.78 ± 0.26	1.84 ± 0.24	2.39 ± 0.29	2.71 ± 0.42	2.71 ± 0.42
C. IAA+Kinetin	1.26 ± 0.09	1.89 ± 0.11	2.46 ± 0.18	2.75 ± 0.26	3.16 ± 0.37	4.07 ± 0.60	4.45 ± 0.43
D. IAA+Kin.+GA ₃	1.26 ± 0.09	1.43 ± 0.09	1.65 ± 0.16	1.87 ± 0.24	2.39 ± 0.30	3.19 ± 0.37	3.25 ± 0.35
E. Control	1.04 ± 0.01	1.16 ± 0.04	1.28 ± 0.05	1.38 ± 0.05	1.56 ± 0.05	2.26 ± 0.12	2.38 ± 0.12

1. Each result, represents the average frequency(±SE) of the four replicates of each treatment.
2. Significant difference at 5% level between treatments control and A, control and B, control and C, control and D, C and A, C and B, C and D.

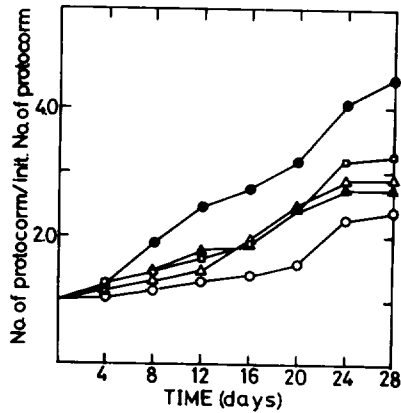


Fig. 2. Changes in the number of protocorm by various combinations of hormones in suspension culture. Control (○), 10⁻⁵M kinetin + 10⁻⁵M GA₃(△), 10⁻⁶M IAA + 10⁻⁵M GA₃(▲), 10⁻⁶M IAA + 10⁻⁵M kinetin + 10⁻⁵M GA₃(□), 10⁻⁶M IAA + 10⁻⁵M kinetin(●).

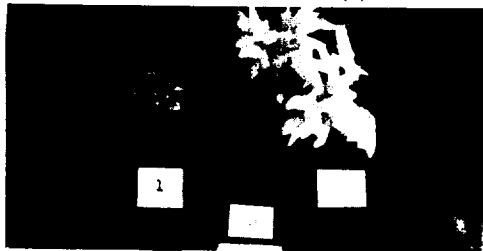


Fig. 3. Germination of embryos and formation of plantlet in agar culture(1) and suspension culture(2) on MS medium + 10⁻⁶M IAA + 10⁻⁵M kinetin + 10⁻⁵M GA₃. The photograph was taken 28 days after culture.



Fig. 4. Germination of embryos and formation of plantlet in agar culture 60 days after (2) and initial protocorm of cymbidium.

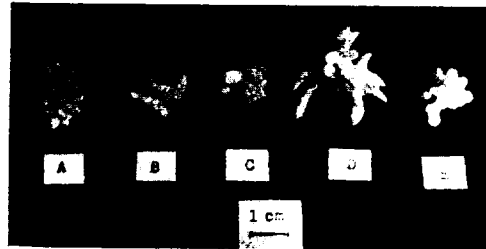


Fig. 5. Effect of hormones combination on development of *Cymbidium janette* somatic embryo grown in continuous light in suspension culture. The photograph was taken 28 days after culture. Comparable embryos grown with 10⁻⁵M kinetin + 10⁻⁵M GA₃(A), 10⁻⁶M IAA + 10⁻⁵M GA₃(B), 10⁻⁶M IAA + 10⁻⁵M kinetin(C),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

형성에 효과적인 영향을 주고있다고 사료된다.

또한 Fig. 3은 $10^{-6}M$ IAA + $10^{-5}M$ Kinetin + $10^{-5}M$ GA₃ 처리시 한천배지 및 액체배양매지에서 배양시킨 protocorm인데 배양 28일 후 한천배지에서는 shoot와 뿌리는 6.7 mm, 2.7 mm로 자랐으며 액체배지에서는 20 mm와 5.3 mm로 자라서 개체분화역시 진탕배양이 현저하다는 것을 알 수 있다.

적 요

양란(*Cymbidium Janette*)을 재료로하여 한천배양 및 진탕배양을 통하여 식물생장촉진호르몬인 IAA, Kinetin, Gibberellin을 조합처리 하여 protocorm 수의 변화와 개체분화등을 조사하여 몇가지 결론을 얻었다.

protocorm 수의 증가는 대조구의 경우 배양 28일 후 한천배양시는 1.41배 증가되었으나 진탕배양시는 2.4배 증가하여 진탕배양 결과가 높았다.

진탕배양에 있어서 protocorm 수의 증가는 $10^{-6}M$ IAA + $10^{-5}M$ Kinetin 처리구의 경우 배양 28일 후 4.45배로 되어 가장 높은 증가를 나타냈다.

개체분화에 있어서 한천배양시는 배양 28일 후 shoot와 뿌리가 각각 6.7 mm와 2.7 mm로 자랐으나 진탕배양시는 20 mm와 5.3 mm로 자라서 진탕배양이 우수하며 특히 $10^{-6}M$ IAA + $10^{-5}M$ Kinetin + $10^{-5}M$ GA₃ 처리구의 경우 뿌리 및 Shoot의 분화가 다른 호르몬조합처리구 보다 잘 되었다.

호르몬 조합처리구 중 GA₃ 처리를 한 시험구에서 분화현상이 빨리 나타나는 것으로 보아 양란의 protocorm 분화에 GA₃가 효과가 있다고 사료된다.

인 용 문 헌

- Amasino, R.M. et al. 1982. Hormonal control of tobacco crown gall tumor morphology. *Plant Physiol.* 69:389-392.
- Aung, L.H. et al. 1978. Hormones and young leaves control development of cotyledonary buds in tomato seedling. *Plant physiol.* 62:276-279.
- Bandurski, R.S. et al. 1977. Concentration of indole-3-acetic acid and its derivatives in plants. *Plant Physiol.* 60:211-213.
- Chung, C.D. 1982. The effect of Various hormones on phosphorus fractions of *Citrus unshiu* Marc. (2). *Cheju National U. J. Natural Sci.* 14:143-149.
- Fujimura, T. et al. 1979. Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Physiol.* 64: 162-164.
- Gledlie, S. et al. 1983. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants and cell suspensions of *Solanum melogena* (egg plant). *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.
- Helgeson, J.P. 1968. The cytokinins. *Science.* 161:974-981.
- Jacobs, W.P. 1966. Effect of gibberellic acid on elongation and longevity of coleus petioles. *Plant Physiol.* 41:487-490.
- Junttila, O. 1982. Gibberellin-like activity in shoots of *Salix pentandra* as related to the elongation growth. *Can. J. Bot.* 60:1231-1234.
- Kang, Y.H. et al. 1980. Studied in Zn metabolism in *Citrus unshiu* Marc. *Kor. J. Plant. Tissue Cul.* 7:1-7.
1979. Induction and formation of callus from several tissue of citrus. *Ibid.* 6:38-42.
- Locy, R.D. 1983. Callus formation and organogenesis by explants of six *Lycopersicon* species. *Can. J. Bot.* 61:1072-1079.
- Martin, S.M. 1977. Growth of plant cell suspension culture with ammonium as the sole source of nitrogen. *Can. J. Bot.* 55:2838-2843.
- Maheshwari, R. 1980. Interaction of gibberellic acid and indole-3-acetic acid in the growth of excised *Cuscuta* shoot tips in vitro. *Plant physiol.* 65:186-192.
- Nyman, L.P. 1981. Auxin-cytokinin interaction in the inhibition, release, and morphology of gametophore buds of *Plagiomnium cuspidatum* from apical dominance. *Can. J. Bot.* 59:750-761.
- Rapoport, E.N. 1978. Role of indole acetic acid and gibberellin in the control of internodal elongation in *avena* stem segment. *Plant Physiol.* 62:807-811.
- Silk, W.K. 1975. Gibberellin response in lettuce hypocotyl sections. *Plant Physiol.* 56:267-272.
- Stuart, D.A. 1977. Role of extensibility and turgor in gibberellin and dark stimulated growth. *Plant Physiol.* 59:61-68.
- Terry, M.E. et al. 1982. Effect of IAA on

- growth and soluble cell wall polysaccharides centrifuged from pine hypocotyl sections. *Plant Physiol.* 69:323-326.
- Vanderhoef, L.N. 1981. Auxin regulated wall loosening and sustained growth in elongation. *Plant Physiol.* 67:146-149.
- Vasil, V. et al. 1981. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultures of *Pennisetum americanum*, and *P. americanum* × *P. purpureum* hybrid. 1982. Characterization of an embryogenic cell suspension culture derived from cultured inflorescences of *pennisetum americanum*. *Amer. J. Bot.* 69:1441-1449.
- Wernicke, W. 1980. Somatic embryogenesis from sorghum bicolor leaves. *Nature.* 287:138-139.