

뽕나무 花芽의 器內培養에 있어서 生長調節物質이 器官分化에 미치는 影響

南 鶴 祐·文 在 裕*·金 浩 樂

農村振興廳 蠶業試驗場·*서울대학교 農科大學

Effects of Plant Growth Substances on Organ Regeneration from *in vitro* Cultured Flower Buds of Mulberry (*Morus alba* L., *Morus bombycis* Koidz.)

Hack Woo Nam, Jae Yu Moon* and Ho Rak Kim

Sericultural Experiment Station, R.D.A. *College of Agriculture, Seoul National University.

Summary

Flower buds of the mulberry(*Morus alba* L., *Morus bombycis* Koidz.) were cultured under different conditions such as basal media, and various concentrations of plant growth substances. Effects of the culture conditions on growth of the buds and organ regeneration were investigated and the results obtained are as follows:

Murashige and Skoog(M.S.) medium was more effective on budding and growth of female (Keomseolppong) and male(Kaeryangppong) flower buds isolated directly from branches, compared to Greshoff & Doy(G.D.) and Wolter & Skoog(W.S.) media. The growth of the female buds was promoted at higher concentration of benzyl amino purine(BAP) i.e., 2.0ppm.

The female and male buds cultured after cutting for seven days showed better growth than those without cutting treatment. The females and the males bloomed to form healthy stigmas and anthers, respectively, when cultured on M.S. media containing high Kinetin with low concentration of indole acetic acid(IAA).

緒 論

木本植物의 組織培養은 植物의 遺傳의 改良, 植物로 부터 藥用成分이나 天然物質의 生産, 無病株 增殖, 有用한 遺傳資源의 保存 및 苗木의 大量增殖에 이용할 수 있다. 특히 관행방법에 의한 번식이 어려운 경우, 이를 조속히 增殖하는 수단이 되고 藥과 花粉培養에 의한 半數體와 異倍體, 突然變異體 誘導, 種(屬)間 交雜 및 細胞融合에 의한 雜種 生産等 器內育種에 應用할 수 있는 可能性이 점차 增大되어 가고 있다.

組織培養에 관한 研究는 대부분 草本植物에서 많은 進展을 보이고 있으며 木本植物에서도 비교적 많은 種

類가 器官을 誘導하는 結果를 얻고 있다(Sommer等, 1975; Coleman 및 Thorpe, 1977; Verhagen 및 Winton, 1977; Cheak 및 Cheng, 1978; Favre, 1977; Bychenkova 및 David, 1978).

뽕나무에 있어서는 關等(1972, 1973)이 花器培養에 대하여 實驗하였으며 최근에는 Ohyama 및 Oka(1981)와 金等(1985)이 胚培養에서 再分化 結果를 밝히고 있을 뿐이다. 關等(1972)은 뽕나무의 雌花器 培養에 있어서 培地의 種類와 添加하는 Auxin의 適正濃度를 실험하였으며 關等(1973)은 雄花器 培養에 있어서 雌花器 培養 실험에서 실시하였던 것과는 달리 다른 種類의 培地를 사용하였으며, 添加되는 生長調節物質의 種類도 Auxin 系統이 아닌 Cytokinin 系統을 添加하여

培養한 結果 各各 다른 傾向을 나타내었다.

이와 같이 組織培養에 있어서 培養材料와 培地의 種類 및 培養 環境條件이 分化 및 生長에 미치는 영향이 크다.

따라서 本 研究은 뽕나무의 花芽의 器內培養을 통하여 培地 種類와 Cytokinin 및 Auxin의 濃도가 各 器官의 生長 및 分化에 미치는 영향을 究明하는데 目的이 있다.

材料 및 方法

雌花芽를 갖고 있는 劍雪甞(*Morus bombycis* Koibz.) 과 雄花芽를 갖고 있는 改良甞(*Morus alba* L.)의 枝條를 發芽前인 4月 下旬에 채취한 후, 枝條에서 직접 分離한 花芽 또는 30°C 挿床에서 7日間 挿木한 후, 分離한 花芽를 70% ethyl alcohol에 2~3秒間 沈漬한 後 Harasol(6% Sodium hypochlorite) 4倍液에 20分間 표면 소독을 하였다. 이후 殺菌水로 3회 洗滌한 後 Murashige and Skoog(M.S.), Wolter and Skoog(W.S.), Greshoff and Doy(G.D.) 培地에 培養하여 가장 알맞는 培地를 選定하였으며, benzyl amino purine(BAP), Kinetin 및 Indole acetic acid(IAA)의 濃도를 달리한 M.S. 培地에서 花芽의 發芽率, 花穗의 크기 및 健全柱頭率을 조사하였다.

各 培地에는 3%의 sucrose를 넣고 0.1N NaOH 및 HCl을 사용하여 pH 5.6으로 調整하였으며 0.8% bactor agar를 넣은 後 120°C에서 20分間 高壓滅菌하였다.

培養器는 90mm 직경 plastic Petri dish를 사용하였으며 溫度 27°C, 照度 2,000lux(cool-white fluorescent illumination)와 16時間 光週期 條件下에서 培養하였으며 試驗材料는 各 處理別 20個體, 3反復으로 하여 遂行하였다.

結果 및 考察

1. 培地 種類 및 Cytokinin의 效果

種類가 다른 基本 培地(表 1)에 劍雪甞(♀)과 改良甞(♂)의 花芽를 각각 培養하고 4週後에 發芽率과 花穗의 生長을 비교한 結果, Fig. 1 및 2에서 보는 바와 같이 M.S. 培地가 G.D.나 W.S. 培地보다 發芽率 및 花穗의 生長이 良好하였다.

또한 濃도를 달리한 BAP를 添加한 M.S. 培地에서 培養한 경우 0.5ppm부터 發芽率 및 花穗의 生長이 증가하여 2.0ppm에서 最高值를 나타내었고 이후 급격

히 감소하여서(Fig. 3) BAP의 濃도가 2.0ppm인 경우 花芽의 發芽 및 生長이 가장 촉진되고 있음을 示唆하고 있다.

2. 挿木處理한 花芽의 生長

枝條에서 分離한 花芽(♀:劍雪甞, ♂:改良甞)를 M.S.+2.0ppm BAP 培地에 직접 置床한 경우와 30°C 挿床에서 7日間 挿木한 後, 分離한 花芽를 동일한 培地에 置床한 경우를 비교 검토한 結果 Fig. 4에서 보는 바와 같이 劍雪甞(♀) 및 改良甞(♂) 모두 30°C 挿床에서 7日間 挿木하여 분리한 花芽를 M.S.+2.0ppm BAP 培地에 置床하고 4週間 培養한 區가 發育이 良好하였다.

品種別로 花芽의 發育狀態를 보면 劍雪甞(♀)의 花

Table 1. Composition of nutrient media.

Unit: mg/l

Components	Medium	M.S.	G.D.	W.S.
MgSO ₄ ·7H ₂ O		370	250	764
CaCl ₂ ·2H ₂ O		440	150	—
KNO ₃		1,900	1,000	170
KCl		—	300	140
Na ₂ SO ₄		—	—	425
(NH ₄) ₂ SO ₄		—	200	—
NH ₄ NO ₃		1,650	—	50
KH ₂ PO ₄		170	—	—
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O		—	—	425
FeSO ₄ ·7H ₂ O		27.8	27.8	—
MnSO ₄ ·H ₂ O		—	10.0	—
MnSO ₄ ·4H ₂ O		22.3	—	9
KI		0.83	0.75	1.6
CoCl ₂ ·6H ₂ O		0.025	0.25	—
ZnSO ₄ ·7H ₂ O		8.6	3.0	3.2
CuSO ₄ ·5H ₂ O		0.025	0.25	—
H ₃ BO ₃		6.2	3.0	3.2
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O		—	90	35
Na ₂ HPO ₄		—	30	—
Na ₂ -EDTA		37.3	37.3	—
Na ₂ M ₂ O ₄ ·2H ₂ O		0.25	0.25	—
Fe-EDTA		—	—	5.5
Sucrose		30,000	20,000	20,000
Glycine		2	—	—
Inositol		100	10	10
Nicotinic acid		0.5	0.1	—
Pyridoxine-HCl		0.5	0.1	0.1
Thiamine-HCl		0.1	1.0	—
Agar		5.6	5.6-5.7	5.7
pH		8,000	7,000	10,000

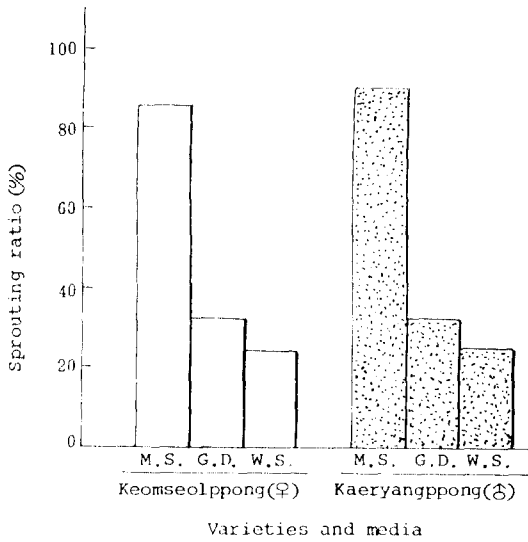


Fig. 1. Difference among media in sprouting ratio of flower buds cultured for four weeks.

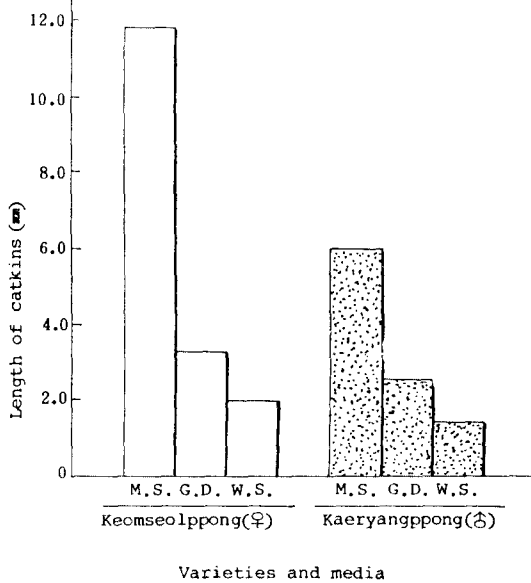


Fig. 2. Difference among media in growth of flower buds cultured for four weeks.

芽를 직접 置床한 區는 花穗의 生長이 매우 低調한 發育을 나타내었으나 插床에서 7日間 插木한 後에 置床한 花芽는 時日이 經過에 따라서 급격히 旺盛한 發育을 보였다.

改良뽕 (♂)의 경우도 插床에서 插木한 後에 置床한 花芽가 直接 置床한 花芽보다 發育이 良好한 것으로 나타났다.

以上の 結果에서 插木한 後에 M.S.+2.0ppm BAP

培地에 置床한 花芽에서 雌雄花穗의 差異를 檢討해보면 雄花보다는 雌花가 外的인 處理 效果에 민감한 反應을 보여서 生育이 促進되었으며 培地條件에서 花穗의 生長보다는 插木의 處理條件下에서 花穗의 生長이 良好하였다 (Fig. 5 및 6).

3. 生長調節物質의 濃도가 雌花穗의 生長에 미치는 影響

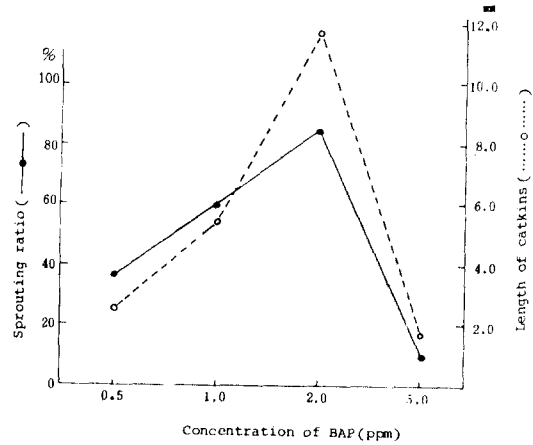


Fig. 3. Sprouting ratio and length of catkins of female flower buds cultured in various concentrations of BAP. Basal medium: M.S. Culture period: four weeks.

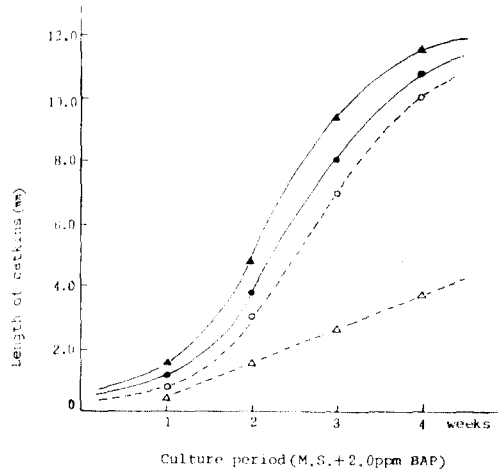


Fig. 4. Difference in catkin growth between flower buds cultured with and without cutting treatment for a week.

—▲—: Cutting treatment (Keomseolppong; ♀)
 —●—: Cutting treatment (Kaeryangppong; ♂)
○.....: Control (Kaeryangppong; ♂)
△.....: Control (Keomseolppong; ♀)

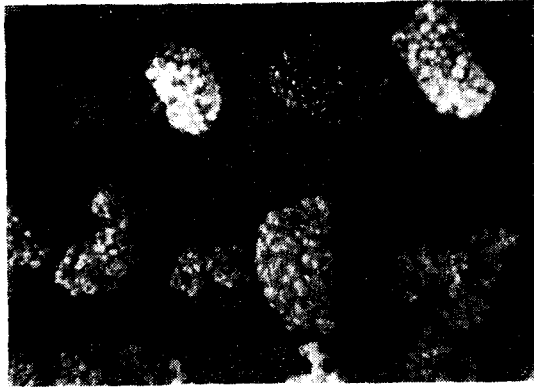


Fig. 5. The formation of catkins derived from female and male flower buds cultured for four weeks.



Fig. 6. The formation of catkins derived from male flower buds cultured for four weeks.

가. Kinetin 및 IAA 농도가挿木 雌花穗의 生長에 미치는 影響

30°C의 挿木에서 7日間 挿木하여 發育시킨 後 花芽를 分離하여 濃도를 달리한 Cytokinin(0~5.0ppm)과 Auxin(0~2.0ppm)을 混合하여 添加한 M.S. 培地에서 3週間 培養한 後 花芽의 發育過程을 檢討한 結果 表 2에서 보는 바와 같이 Kinetin 1.0ppm 處理에서 花穗의 長이가 12.7mm로서 生長이 良好한 것을 제외하고는 Kinetin 濃도와는 큰 關係없이 IAA 1.0 및 2.0ppm에서 花穗의 發育이 良好하였다. 이 結果는 關等(1972)이 本 試驗과 基本培地는 다르지만 Nitsch 培地에 IAA 2.0ppm을 添加한 것이 花穗의 生長에 適正한 濃도가 된다고 하였으며 Kinetin은 開花에 有效하지 않다는 報告와 一致하다고 본다.

나. Kinetin 및 IAA 농도가挿木 雌花穗의 開花에 미치는 影響

위와 같은 방법으로 처리하였을 경우 置床 2週後의

Table 2. Effect of concentrations of Kinetin and IAA on the growth of catkins from cultured female buds after a cutting treatment for a week.

IAA (mg/l)	Kinetin(mg/l)				
	0	0.5	1.0	2.0	5.0
0	—	10.1	12.7	5.0	6.0
0.1	7.0	10.5	8.4	7.8	6.5
0.5	7.8	8.4	9.1	10.6	7.5
1.0	10.1	10.2	10.4	10.5	11.8
2.0	13.2	12.4	12.0	11.7	9.3

* The length(mm) of catkins collected at the end of three weeks in culture.

Table 3. Effect of concentrations of Kinetin and IAA on the flowering of cultured female buds after a week of cutting.

IAA (mg/l)	Kinetin(mg/l)				
	0	0.5	1.0	2.0	5.0
0	—	21.6	21.0	6.5	2.0
0.1	3.8	18.8	13.0	8.3	2.0
0.5	3.0	2.5	2.0	18.8	7.0
1.0	16.3	17.0	18.0	18.7	9.8
2.0	20.7	19.0	18.7	18.6	13.3

* The number of female flowers per catkin collected at the end of two weeks in culture.

Table 4. Effect of concentrations of Kinetin and IAA on the growth of catkins of cultured male after a week of cutting.

IAA (mg/l)	Kinetin(mg/l)				
	0	0.5	1.0	2.0	5.0
0	—	6.5	6.8	6.8	6.8
0.1	7.5	7.1	6.1	5.3	6.1
0.5	7.8	8.8	9.2	9.9	8.1
1.0	6.8	6.8	8.1	5.5	8.1
2.0	8.3	5.4	8.7	10.1	8.4

* The length(mm) of catkins collected at the end of three weeks in culture.

雌花穗當 開花數는 表 3에서 보는 바와 같이 Kinetin 0.5, 1.0 및 5.0ppm을 單獨 處理하였을 경우에 花穗當 開花數가 많았으며 Kinetin濃도의 變化에 關係없이 IAA 1.0 및 2.0ppm에서 開花數가 많았다.

이 結果는 花穗의 生長과 花穗當 開花數와 같은 傾向을 나타내었다.

伊藤(1960)은 蘭의 培養에서 Nitsch 培地에 Auxin 및 Vitamin을 더 添加하였을 경우 稔性的 向上을 報告한 바 있어서 Auxin은 開花에 매우 有效하다고 思料된다.

4. 生長調節物質의 濃度가 雄花穗의 生長에 미치는 影響

雄花도 雌花와 마찬가지로 30°C의 挿床에서 7日間 挿木하여 發芽시킨 후 花芽를 分離하여 濃度を 달리한 Cytokinin(0~5.0ppm)과 Auxin(0~2.0ppm)을 混合하여 添加한 M.S. 培地에서 3週間 培養한 後 花芽의 發育過程을 檢討한 結果 表 4에서 보는 바와 같이 Kinetin 1.0~2.0ppm과 IAA 1.0~2.0ppm의 混合 添加한 培地에서 花穗의 生長이 良好하였다. 이 結果는 關等(1973)이 Kinetin 1.0~2.0ppm을 含有한 White培地에서 花穗의 生長이 良好하다는 報告와 一致하나 高濃度 IAA의 添加에 의하여 더 促進됨을 示唆한다고 본다.

5. Cytokinin 및 Auxin의 濃度別 柱頭 및 藥의 形成比率

育種적인 면에서 雌芽의 健全한 柱頭形成 및 雄花의 健全한 藥의 形成이 가장 重要하다. 이 實驗은 30°C 挿木에서 7日間 挿木하여 發育시킨 花芽를 分離하여 3週間 培養한 경우 Fig. 7 및 8에서 보는 바와 같이 雌花는 Kinetin 2.0ppm 및 IAA 0.5ppm을 混合 添加한 M.S. 培地에서 開花되어 健全한 柱頭가 形成되었으며

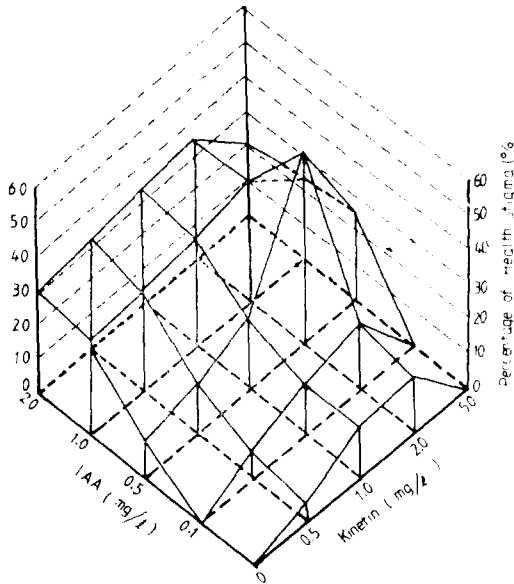


Fig. 7. Effects of concentrations of Kinetin and IAA on formation of healthy stigmas derived from female flower buds cultured for three weeks.

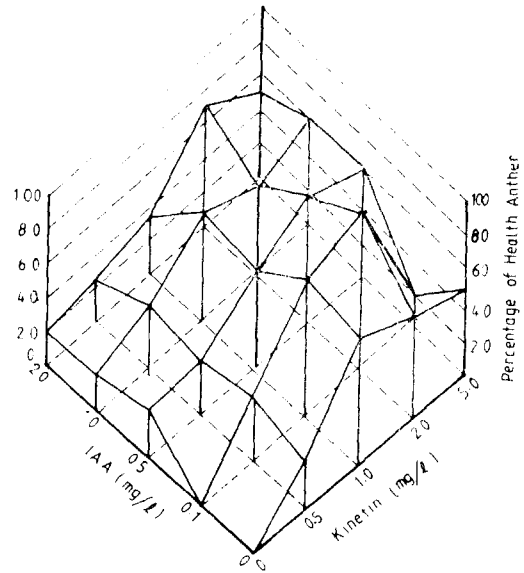


Fig. 8. Effect of concentrations of Kinetin and IAA on formation of healthy anthers derived from male flower buds cultured for three weeks.

雄花는 Kinetin 2.0ppm 및 IAA 0.1ppm 濃度에서 開花되어 健全한 藥을 얻을 수 있었다. 즉, 雌雄花의 開花 및 柱頭와 藥의 形成을 위하여는 高濃度 Kinetin과 低濃度 IAA가 要求됨을 示唆하고 있다.

摘 要

뽕나무의 花芽의 器內培養을 實施할 경우 培地種類 및 生長調節物質의 濃度가 各 器官의 生長 및 分化에 미치는 影響을 調査한 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. Murashige and Skoog 培地는 Greshoff and Doy 및 Wolter and Skoog 培地에 비하여 雌雄花芽의 生長에 良好한 效果를 나타내었으며 雌花의 成長은 2.0ppm BAP 濃度에서 良好하였다.

2. 雌花 및 雄花의 花芽를 가지고 있는 挿穗를 7日間 挿木하여 發芽시킨 후 培養한 區가 挿木을 하지 않고 直接 置床한 區보다 花芽의 發育이 良好하였다.

3. 高濃度 Kinetin과 低濃度 IAA를 混用 添加한 M.S. 培地에서 生長이 良好하여 開花되었고 健全한 柱頭 및 藥을 얻을 수 있었다.

引 用 文 獻

Abbott, A.J. (1977) Propagating temperate woody

- species in tissue culture. *Sci. Hort.* 28, 155-162.
- Biondi, S., and T.A. Thorpe (1981) In "Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture" (T.A. Thorpe., ed.) Academic Press. New York, 1-2.
- Bychenkova, E.A. and A. David (1978) Callus formation and organogenesis in tissue of leaves of *Populus balsamifera* L. Cultivated *in vitro*. *Sov. Plant Physiol.* 25, 216-222.
- Cheak, K.T., and T.Y. Cheng (1978) Histological analysis of adventitious bud formation in cultured Douglas fir cotyledon. *Am. J. Bot.* 65, 845-849.
- Coleman, W.K., and T.A. Thorpe (1977) *In vitro* culture of western red cedar (*Thuja plicata* Donn.). I. Plantlet formation. *Bot. Gaz. (Chicago)*.
- David A.E., S.R. William, and E. Christopher (1981) Growth and behavior of cell cultures (Embryogenesis and organogenesis). In *Plant Tissue Culture. Method and Applications in Agriculture* (T.A. Thorpe, ed.) Academic press, 45-113.
- Esau, K. (1977) *Anatomy of Seed Plants* (2 nd. ed.), 183-197. Jahn Wiley and Sons.
- Favre, J.M. (1977) Premiers résultats concernant l'obtention *in vitro* de néoformations caulinaires chez la Vigne *Ann. Amélior. Plant.* 27, 151-169.
- Feder, N., and T.P. O'Brien (1968) *Plant Microtechnique: Some Principles and New Methods.* *Amer. J. Bot.* 55, 123-142.
- Geeta, K. Patel, V.A. Bapat, and P.S. Rao (1983) *In vitro* culture of *Morus indica*: Plant regeneration and fruit formation in axillary bud culture. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 111. S., 465-468.
- Hoagland, D.R., and D.I. Arnon (1938) University of California Agricultural Experiment Station Circular, 34.
- Katagiri, K., and T. Nishiguchi (1986) Interspecific difference on adventitious shoot formation in mulberry tissue cultures. *J. Seri. Sci. Japan.* 55, 79-80.
- Kim, J.H., S.K. Lee, and Y.W. Chun (1981) Mass propagation of tree species through *in vitro* culture. I. Bud culture of *Populus alba* X *P. glandulosa* F. *Res. Rep. Inst. For. Gen. Korea.* 17, 57-64.
- Kim, H.R., K.R. Patel, and Thorpe (1985) Regeneration of mulberry plantlets through tissue culture. *Bot. Gaz.* 144, 335-340.
- Murashige, T., and F. skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- Ohyama, K., and S. Oka (1981) *In vitro* initiation of adventitious buds and its modification by high concentration of benzyladenine in leaf tissues of mulberry (*Morus alba*). *Can. J. Bot.* 59, 68-74.
- Ohyama, K., and S. Oka (1982) Multiple shoot formation from mulberry (*Morus alba* L.) hypocotyle by N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea. *Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, Plant Tissue Culture,* 149-150.
- Oka, S. (1985) *In vitro* culture of isolated buds and organ formation in mulberry. *Bull. Sericul, Exp. Sta.* 29, 47-852.
- 岡成美, 大山勝夫 (1974) クワの芽の分離培養に関する研究. I. 冬芽からの莖葉展開および器官形成に及ぼす生長物質の影響, *日蠶雑* 43(3), 230-235.
- 岡成美, 大山勝夫 (1975) クワの芽の分離培養に関する研究. II. 培養腋芽からの莖葉展開に及ぼす生長物質の影響, *日蠶雑* 44(6), 444-450.
- 岡成美, 大山勝夫 (1978) クワの芽の分離培養に関する研究. III. 冬芽からの莖葉展開におよぼす寒天濃度, pHおよび糖の影響, *日蠶雑* 47(1), 15-20.
- Patel, K.R., H.R. Kim, and T.A. Thorpe (1986) Plantlet formation in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.) by tissue culture methods. *For. Ecol. Manage.* 15, 147-160.
- 農村振興廳 (1982) 作物組織培養 技術確立에 關한 研究, 産學協同 '82-11, 7-11.
- 關博夫, 武田正男, 目黒和雄 (1972) 桑樹の花器培養について. I. 桑樹 雌花器の培養, *日蠶雑* 41(3), 181-186.
- 關博夫, 武田正男, 中村全夫 (1973) 桑樹の花器培養について. II. 桑樹 雄花器の培養, *日蠶雑* 42(5), 368-374.
- Seki, H., M. Takeda, and T. Yamaguchi (1974) Studies on the callus culture of the mulberry tree. (II). The callus culture of the embryo and endosperm of the mulberry seed. *J. Seri. Sci. Japan.* 43, 487-491.
- Sommer, H.E., C.L. Brown, and P.P. Kormanik (1975) Differentiation of plantlets in long leaf pine (*Pinus palustris* Mill.) tissue cultured *in vitro*. *Bot. Gaz. (Chicago)*. 136, 196-200,

Von Arnold, S., and T. Eriksson (1981) *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. Can. J. Bot 59, 870-874.

Winton, L.L., and S.A. Verhagen (1977) Shoots from

Douglas-fir cultures. Can. J. Bot. 55, 1246-1250.

Wolter, K.E., and F. Skoog (1966) Nutritional requirement fo fraxinus callus cultures. Amer. J. Bot. 53, 263-269.