

세포조직배양계에서 재생된 식물의 발생 및 형태학적 다양성

(Developmental and Structural Diversity of Regenerated
Plants in Cell and Tissue Cultures)

소 응 영

전북대학교 자연과학대학 생물학과

I. 서 론

고등식물의 세포는 수정란 뿐만이 아니라 대부분의 체세포가 전능성을 가지고 있는 것이 고등동물세포와 다른 가장 뚜렷한 특징이다. 따라서 시험관안에서 배양중인 식물의 체세포에 알맞은 조건을 갖춰주면 조직 또는 기관분화를 거쳐서 완전한 개체로 재생될 수 있다.

오늘날 첨단과학으로 각광을 받고있는 식물생명공학은 궁극적으로 식물세포의 전능성을 이용해야되는 학문분야이기 때문에 전능성은 넓은 의미에서 식물생명공학의 기초를 이루고 있다. 식물세포의 전능성 발현은 학문연구뿐만이 아니라 산업적으로 실용화에 이어지고 있으며 관상용 난동 유용식물의 대량증식 및 무병주 식물생산이나 육종상 중요한 반수체 식물의 생산등을 보기로 들 수 있다(Debergh and Read, 1991). 또한 배양세포로부터 체세포배를 이용한 인공종자생산 및 형질전환 세포로부터 식물체재생등도 실용화에 접근해 가고 있다(Redenbaugh *et al.*, 1991; Ritchie and Hodges, 1993). 식물배양세포 또는 기관배양으로부터 2차대사산물의 생산도 넓은 의미에서 대사수준의 전능성의 발현이라고 볼 수 있다(Komamine, 1991).

이와같이 식물생명공학은 식물세포의 전능성이라고 하는 기능을 이용하게 되지만 전능성의 발현과정에서 분화 및 발생에 대한 이해가 아직껏 충분하다고는 볼 수 없다. 많은 식물의 세포를 시험관안에서 배양하여 식물체로 재생시켜내고 있으나 이와같이

얻어진 식물이 자연상태에서 자란 식물과 같이 구조 및 기능상으로 건전해야 이용가치가 있을것이지만 실제에는 그렇지 못한 경우도 적지 않다. 이미 실용화되고 있는 유용식물의 대량증식 과정에서도 형태상으로 이상구조의 개체가 나오는 문제점과(Lim and Hoffman, 1991) 인공종자의 재료로 쓰이는 체세포배도 식물체재생울에 현저한 영향을 미치는 이상구조의 배가 형성되는 문제등을(Soh *et al.*, 1991) 해결하려면 식물세포의 분화에 대한 분자수준의 연구뿐만이 아니라 발생학적인 또는 형태학적인 연구도 역시 필요할 것이다.

그러므로 이 논문에서는 식물세포의 분화 전능성에 관한 몇가지 예를 소개하고 체세포배의 구조적 변화 및 재생식물체의 이상구조현상등의 발생에 대한 형태학적인 문제점을 논의 하고자 한다.

II. 본 론

1. 식물세포의 전능성

식물세포의 분화 전능성의 발현은 단세포배양 수준에서(Nomura and Komamine, 1985), 또는 원형질체 및 그 융합체에서도 입증되었다(Kim *et al.*, 1993). 최근에는 많은 형질전환식물의 배양세포로부터 식물체 재생이 이루어지고 있다(Ritchie and Hodges, 1993). 그러나 아직도 배양세포로부터 식물체 재생이 잘 일어나지 않거나 아주 까다로운 경우가 있으므로 여러 식물의 종, 품종 또는 조직 기관별로 분화 전능성의 발현에 차이가 있으며 세포의 배양중에 변이가 일어나는 등의 문제가 남아있다.

배양세포로부터 식물체를 얻으려면 체세포배 발생을 거치는 경우와 기관분화를 유도하는 길이 있다. 먼저 기관분화 과정은 담배의 수로부터 유조직을 배양하면서 사이토키닌 :옥신의 농도 비율을 달리하면 경엽부(shoot)와 뿌리의 분화가 유도 되고 이어서 식물체의 재생이 일어날 수 있다(Skoog and Miller, 1957). 이와같은 사이토키닌 및 옥신이 기관분화를 유도하는 기작은 잘 알려져 있지않으나 식물배양세포에 호르몬 처리를 하면 새로운 mRNA 및 단백질이 활발히 합성되는 것으로 보아 호르몬에 의한 유전자 발현이 일어나면서 기관분화가 유발된다는 것을 알 수 있다(Howell, 1993).

캘러스로부터 부정아가 비교적 쉽게 분화되는 예로서 구기자의 접합자배 배양의 경우를 들 수 있다. 접합자배를 0.01 mg/L 2,4-D 및 0.5 mg/L Zeatin 이 첨가된 MS배지에서 배양하면 자엽조직은 캘러스의 유도가 다른 조직에서 보다 빈약하게 일어나지만 유도된 캘러스로부터는 녹색반점이 나타나면서 부정아의 분화가 더 활발하게 일어난다(Fig. 1-5, Lee *et al.*, 1992). 조직배양으로 부터 식물체를 재생시키려면 먼저 경엽부를 분화시키고 이를 부정근 유도 배지로 옮겨서 뿌리를 발생시키는 순서에 따르면 식물체를 쉽게 얻을 수 있다. 이때 뿌리를 유도하기 위하여 고농도의 IBA 에 잠시 침적시키는 처리가 효과적일 수 있다(Agarwal *et al.*, 1992). 그런데 캘러스 형성을 거치지 않고 직접 부정아가 분화될 수 있으면 배양중에 변이가 일어날 위험을 피할 수 있다(Malik and Saxena, 1992).

은행나무의 미숙 접합자배를 발생 단계별로 0.5 mg/L BAP 및 0.1 mg/L NAA 가 첨가된 MS 배지에서 배양하면 심장형배의 자엽부위에서 부정아가 캘러스를

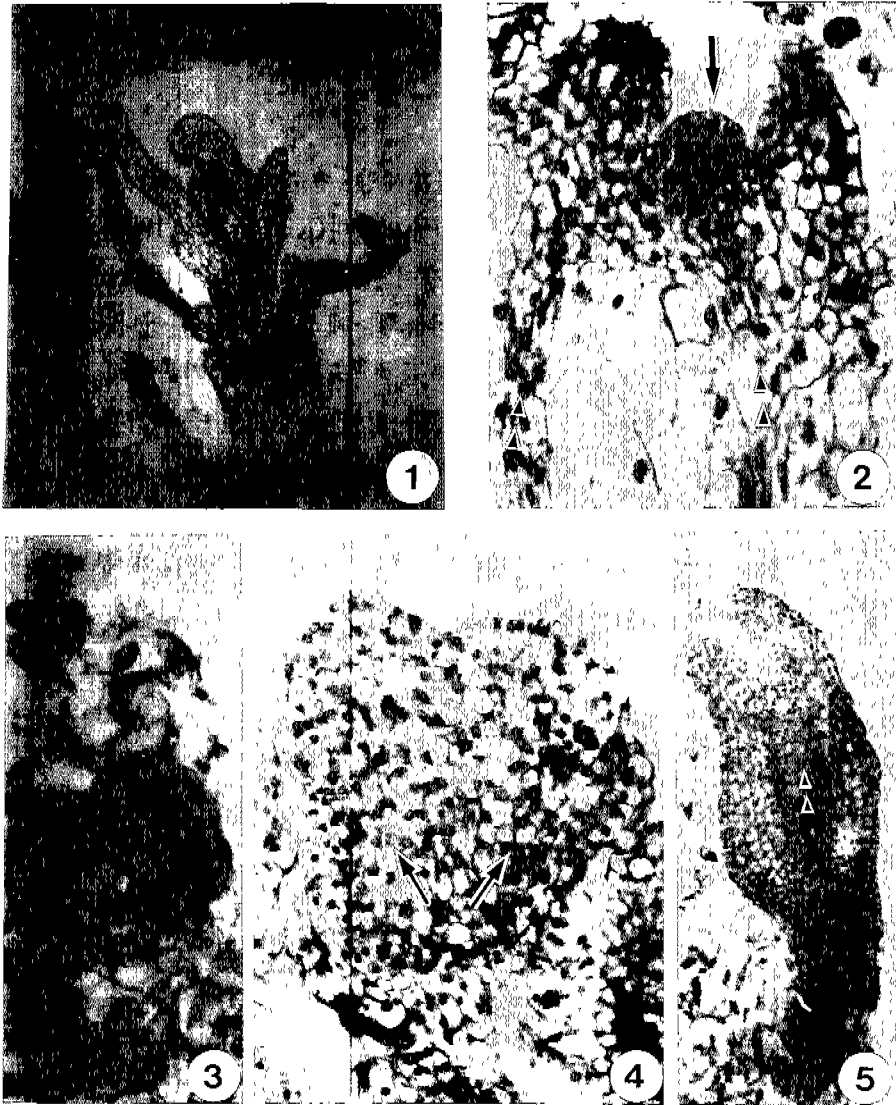


Fig. 1-5, Longitudinal sections of shoot from callus cultures of *Lycium chinense* Mill.(1) and it's apex showing apical meristem(arrow) and procambium(arrow heads, 2). The sections of somatic embryos are at globular stage(3), heart-shaped stage developing procambium(arrows, 4) and late torpedo stage showing apparent procambium(arrow heads, 5).

거치지않고 분화되는 것을 관찰할 수 있다(Fig. 6-10, Choi *et al.*, 1991). 배양후 약 2주경에 자엽부위의 전형성충조직에서 세포분열이 피층으로 이어지면서 분열조직이 표면부까지 형성되어 녹색반점을 이루고 표면에 나타난다. 이 반점부위에서 부정아가 분화되므로 여러개의 경엽부가 형성된다. 이와같은 경엽부로부터 부정근의 발생이 일어나서 식물체로 재생되는 과정은 아직 밝혀지지 않았으며 조직 배양을 통한 식물체 재생이 어려운 예가 될수 있다.

배양세포조직으로 부터 식물체를 재생시키기 어려운 또 다른 예로서 동부를 들수 있다(Ladeinde and Soh, 1991). 0.2 mg/L Kinetin 및 0.4 mg/L 2,4-D를 첨가한 MS기본배지상에서 동부 유식물의 배축절편을 어두운 상태로 배양하면 캘러스가 유도되는데 이 캘러스를 오옥신배지로 옮겨 배양하면 황색 캘러스로 되고, BAP와 NAA 조합배지로 옮기면 녹색반점을 띄는 캘러스로 된다. 황색 캘러스로 부터 부정아는 물론 부정근도 거의 분화되지 않고 부정근만이 분화된다(Choi *et al.*, 1991). 이와같이 동부의 조직배양에서는 식물체의 재생이 확인되지 않았으며 싸이토키닌 처리로 부정근의 분화만 일어나는 특징을 나타낼 뿐이다.

식물에 따라서는 캘러스 배양에서 부정아보다 부정근이 더 잘 분화되는 경우가 있는데 강남콩의 경우를 들수있다. 0.4 mg/L 2,4-D와 0.2 mg/L Kinetin이 첨가된 MS배지에 배축절편을 배양하여 유도된 노란색의 캘러스를 0.5 mg/L BAP 와 0.05 mg/L NAA가 첨가된 배지로 옮겨서 배양하면 연녹색 캘러스가 생긴다음 부분적으로 녹색반점이 나타나는데 배양을 계속하면 녹색반점이 흰색의 nodule로 된다. 이 nodule을 0.5 mg/L IBA가 첨가된 배지에 옮겨 배양하면 부정근이 분화된다(Fig. 11-15). 이들 캘러스의 단백질을 분석해보면 노란색캘러스, 녹색반점, nodule및 부정근에서 단백질을 분석해보면 단백질 유형에 현저한 변화가 있고 녹색반점에서 단백질함량이 가장 높은것을 알수 있다(Cho *et al.*, 1993).

또한 시호의 어린 잎절편을 0.1 mg/L의 2,4-D를 첨가한 MS 배지에 배양하면 캘러스 유도가 잘되며,이 캘러스를 현탁 배양하여 700-1000 μm 의 세포피를 걸러내서 2,4-D 가 제거된 배지에 계대 배양하면 4일후에는 부정근이 분화된다(Bae, 1993). 세포피의 크기가 500 μm 까지는 부정근이 분화되지만 더 작아지면 분화되지 않는다. 이와같은 세포피를 2,4-D 첨가배지에 계대배양을 하면 부정근의 분화가 일어나지

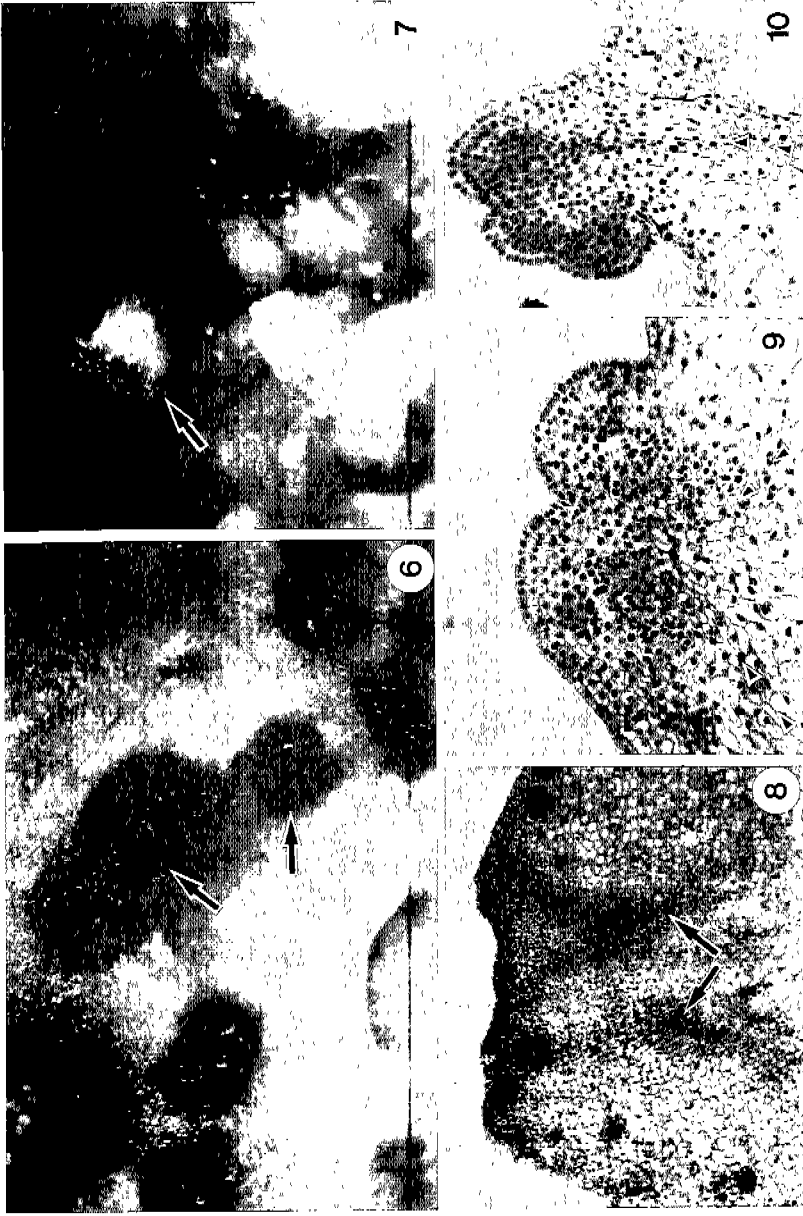


Fig. 6-10, Adventitious bud formation from cotyledon tissue in cultured zygotic embryo of *Ginkgo biloba*. Green spots on yellowish callus are formed (arrows, 6, $\times 10$) from which adventitious bud develop (arrow, 7, $\times 10$). Longitudinal section of bud primordia showing meristematic strands (arrows) in the cotyledon tissue (8, $\times 70$). Bud primordia initiated from the strands (arrow heads) at the cotyledon tissue periphery (9, $\times 70$) and developing bud connected with meristematic strand (arrow head, 10, $\times 70$).

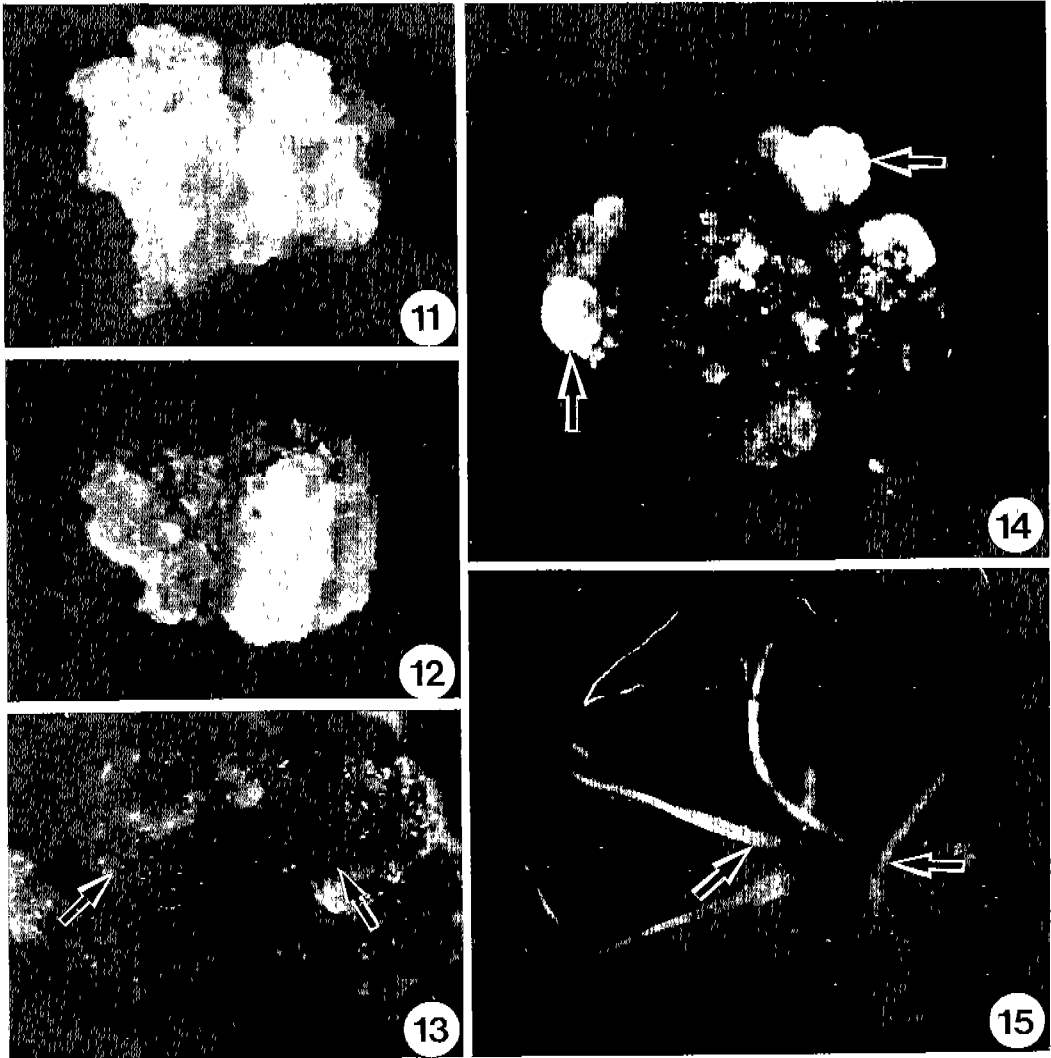


Fig. 11-15, Adventitious root formation from callus cultures of *Phaseolus vulgaris*. Early stages of callus growth(11-12), late stage of callus with green spot(arrows, 13), root primordia formaton from the spot(arrows, 14) and root development on callus(arrows, 15).

않으나 1주일 배양후에 2,4-D 제거배지로 옮겨주면 첨가된 2,4-D 농도가 낮을수록 빠른 시일내에 부정근이 분화되는 반면에 농도가 높을수록 부정근의 수는 많이 분화된다. 최근에 고구마의 조직배양에서도 2,4-D의 전처리 기간이 길수록 부정근의 발생율이 낮아진다고 발표된 연구 결과는 같은 경향의 결론이라고 생각된다(Liu *et al.*, 1992). 시호의 경우에 2,4-D 처리기간에 부정근의 발생은 지연되지만 2,4-D 제거배지로 옮긴후에 발생한 뿌리의 수가 증가한 것은 2,4-D 가 부정근의 원기 형성을 촉진하는 반면에 부정근 원기로 부터 뿌리가 신장되어 나오는 과정은 억제하는 것으로 보인다. 부정근의 기원은 세포피 표면에 가까운 세포에서 분열을 시작하여 부정근 원기가 형성되고 이어서 뿌리가 돌출되어 나오는 것으로 보아서 정상 식물 또는 삼목의 경우, 유관속 형성층 혹은 사부유조직에서 부정근이 기원되는 내장생장과정의 경우와 다른것으로 판단 된다(Fig. 16-23). 이와같이 형성된 부정근은 액체 배지에서 생장이 잘 되기 때문에 이차대사산물을 생산하는데 적합한 재료로 활용될 수 있을것이다(Jo *et al.*, 1990).

2. 재생식물체의 형태

식물세포의 분화전능성이 입증된 이래 지난 40년간 세포조직배양계를 거쳐서 재생된 많은 식물중에는 구조상으로 비정상적인 경우가 적지 않았다는 사실에 주목해야 될것이다. 구조상으로 비정상적인 식물은 정상적인 기능을 갖지못하기 때문에 조직배양계에서 재생된 식물의 생산성이란 면에서 심각한 문제를 일으키게 된다(Pasqualetto, 1990). 이와같이 비정상적인 식물은 배양액및 배양환경이 자연상태와 심하게 다른 조건으로부터 발생된 것이므로 자연조건에서 식물의 발생에 대한 정확한 이해와 그에 상응되는 배양기법이 시급히 개발되어야 할 것이다.

재생식물체에서는 경엽부의 비정상적인 형태가 흔히 관찰되는데 이와같은 경우에는 대체로 과잉의 수분함량을 가지고 투명하게 보이므로 “투명화현상”이라고 부른다(Gaspar *et al.*, 1987). 이런 변태식물은 잎의 표피세포벽 표면쪽에 각피층 표면납질(epicuticular wax)및 책상조직이 아주 빈약하게 분화되거나 혹은 거의 분화되지 않고 기공의 구조와 기능에 이상이 있으며 세포간극은 정상 식물보다 다섯배까지 넓게 발달 된다(Lim and Hoffman, 1991; Ziv, 1991; Paek *et al.*, 1991). 또한 엽육세포는 액포화가 아주 심하게 일어나고 엽록체가 구조적으로 빈약하게

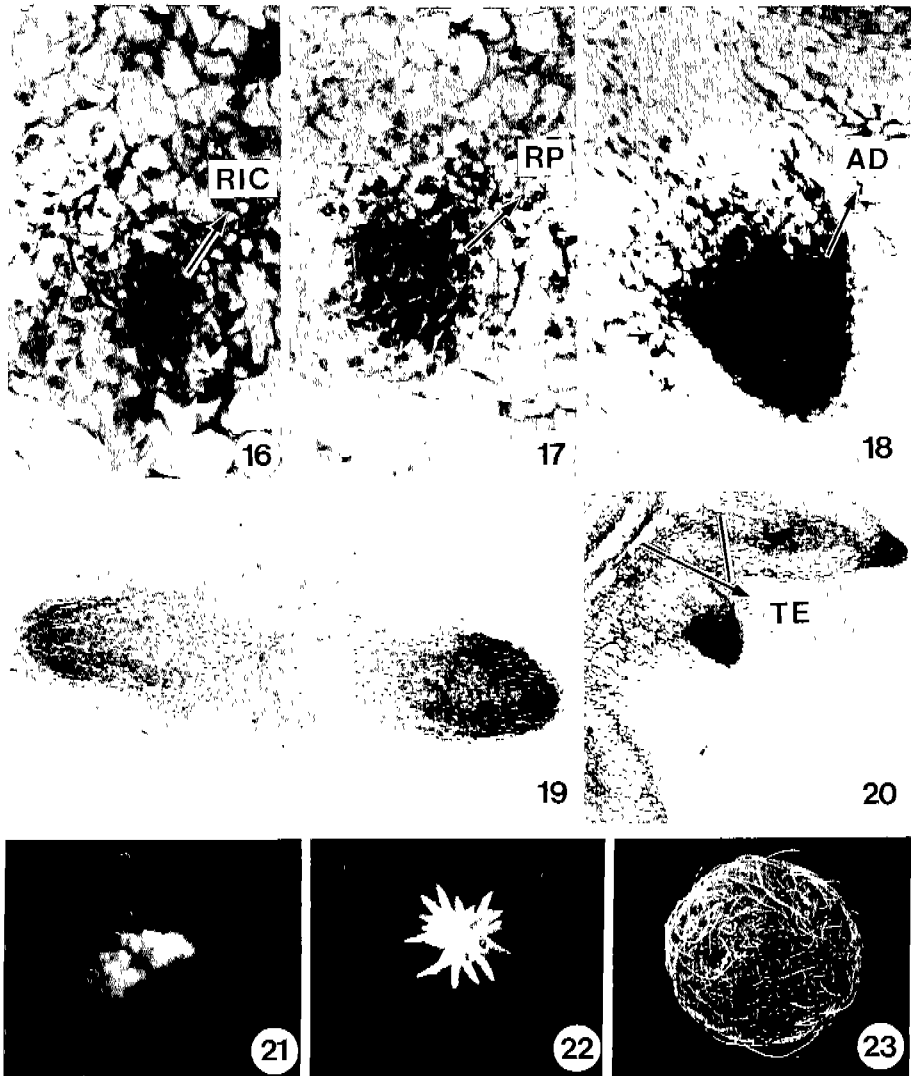


Fig. 16-23, Adventitious root formation from cell clumps of *Bupleurum falcatum*. Adventitious root initials(RIC) formed near surface of callus or below 3-4 cell layer from the surface(16, $\times 265$), developed into root primordium(RP; 17, $\times 265$) and then into young root(AD; 18, $\times 190$). Two(19, $\times 50$) or multiple(20, $\times 50$) adventitious roots were formed from a cell clump. TE: Tracheary element. Root primordium were formed on MS medium supplemented with 2,4-D, but could not develop into young root(21, $\times 10$). Roots are protruding when the clumps were subcultured on MS basal medium(22, $\times 10$). 3-month old adventitious roots in liquid medium(23, $\times 0.2$).

발달되어 광합성 능력이 저하된다.

이와 같이 재생식물체의 경엽부가 뿌리보다 구조상으로 더욱 심한 변형을 나타내는것은 여러가지 원인이 있겠지만 배양병 내부의 지나친 습도와 관계가 있다(Ziv, 1991). 당근의 체세포배가 한천배지와 액체배지에서 각각 발생되었을때 액체배지에서 발생한 경우에서 더 많은 투명화현상이 일어났다(Lee and Soh, 1993). 또한 이 경우의 배를 해부학적으로 관찰해보면 유경의 분열조직이 비정상적으로 분화되었거나 거의 분화되지않은 것을 확인할 수 있다. 그러므로 초기의 발생과정에서 구조적으로 변형되는 현상을 밝혀야 할것이다(Fig. 24-29). 한천농도가 낮은 배지에서 토마토의 캘러스를 배양하여 경엽부가 분화되면 높은 농도에서 보다 투명화현상의 발생빈도가 높게 나타난다. 그리고 담배의 경우에도 배양병 내부의 습도와 투명화현상의 발생빈도가 관계되는 것으로 밝혀졌으며(Kim *et al.*, 1993), 각피층납질은 얇게 형성되고 기공의 공변세포는 세포벽에 이상구조가 나타난다. 그뿐아니라 전형성충및 유관속조직의 분화가 빈약하고 후벽조직의 세포는 목질화가 충실하게 일어나지 않고 세포벽이 얇은것으로 관찰된다.

이와 같이 비정상적인 형태형성이 일어나는 재생식물은 분자수준으로부터 그변화를 추적해 보면 투명화 기관은 단백질함량이 적게 나타나면서 정상적인 경우와 다른 유형의 단백질이 나타나기도 한다. *Prunus*속의 식물에서도 투명화된 경우에 단백질 함량및 hydroxycinnamate CoA ligase활성이 정상적인 경우보다 낮게 나타나는데 이와같은 효소활성의 저조한 결과는 세포벽의 목질화를 위한 hydroxycinnamic phenol의 이용이 저조하다는 것을 의미한다(Phan and Letouze, 1983). 세포벽의 목질화에 관한 대사작용이 원활히 일어나지 못할경우에 유관속조직의 분화는 빈약할 수 밖에 없을 것이다. 따라서 조직배양계에서 재생된 식물의 비정상적인 형태는 분자수준의 분화로부터 변화가 일어난 것으로 보인다.

3. 체세포의 구조

식물세포 배양에서 탈분화된 세포로부터 다시 분화과정을 거쳐 체세포배가 발생된 것을 처음 발견하였을 때 체세포배는 접합자배와 구조적으로 동일하다고 보았으며(Steward *et al.*, 1958), 그후 많은 식물의 세포배양에서 체세포배가 형성되고 이로부터 식물체가 재생되는 분화전능성이 입증되었다. 일반적으로 체세포배 발생중의

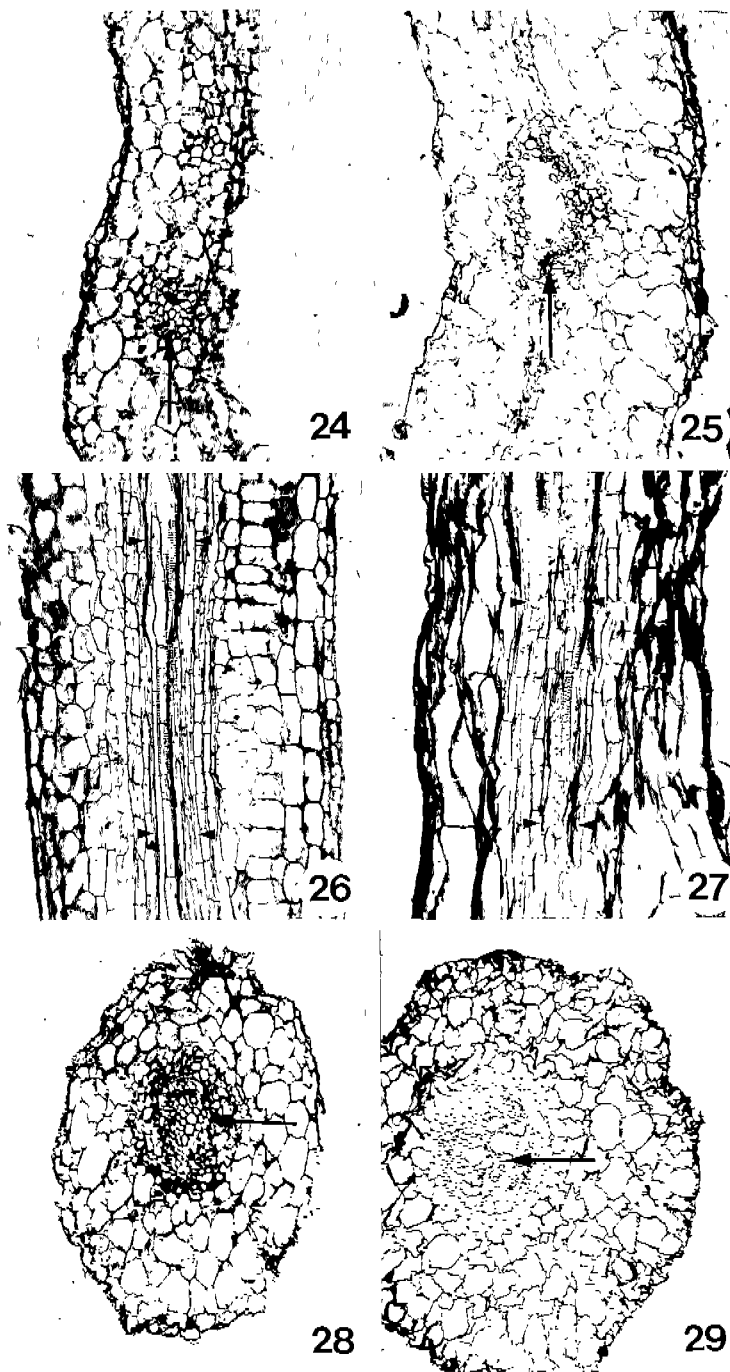


Fig. 24-29, Anatomy of germinating somatic embryo of *Daucus carota* showing differences depend on the culture condition like gelled media(24, $\times 170$, 26, $\times 75$, 28, $\times 80$) or liquid media(25, 27, $\times 60$, 29). In liquid culture, mesophyll cells(25, $\times 150$) and cortex cells in stem(27) and root(29, $\times 60$) are arranged loosely and having large intercellular space with some irregularity. Arrows and arrow heads point vascular bundles.

구상형배에서는 세포분열활동이 구성세포 전반에 걸쳐서 일어나지만 점차로 배의 주축중심부와 그 선단주변부로 국한되므로 V자 또는 Y자 모양의 분열조직부위가 나타나면서 심장형배의 구조를 갖추게된다(Fig. 4, Kim *et al.*, 1992). 주축부분에는 전형성층이 그리고 그 선단부에 두개의 자엽원기가 이루어진다. 자엽이 신장되면서 배축부위가 뚜렷한 어뢰형배를 이루고 이어서 배축선단부에서 유근이, 그리고 자엽사이에서 유경의 분열조직이 분화되면 자엽기배로 성숙된다.

더덕의 세포배양에서도 전형적인 체세포배의 발생을 거치는 분화전능성이 발현된다(Min *et al.*, 1992). 그런데 주의깊게 관찰해 보면 체세포배는 구조상으로 접합자배와 상당한 차이가 나타나는 경우를 발견할 수 있다. 특히 배양중에 이차배의 형성 및 자엽구조의 변형등의 뚜렷한 차이점이 알려져왔다(Ammirato, 1987; Buchheim *et al.*, 1989; Kageyama *et al.*, 1990; Soh *et al.*, 1991; Lee and Soh, 1993). 이와같이 체세포배의 구조에 이상현상이 관찰되고 있지만 많은 연구에서 아직까지 이를 가볍게 지나쳐 온것이 사실이다. 그런데 이상구조를 가진 체세포배는 식물체로 재생되는 비율이 아주낮기 때문에 대량종식 과정에서 심각한 장애요인이 된다. 따라서 체세포배를 이용한 인공종자 생산등의 산업화에 앞서서 체세포배의 이상구조가 나타나는 문제가 극복되어야 할것이다.

Table 1. Cotyledon aberrancy of carrot somatic embryo formed on solid or liquid medium containing 2,4-D after 70-day culture.

Types of media	No. of cotyledon(%)		
	Two	Poly	Horn type
Agar medium	82.93	2.44	14.63
Liquid medium	53.16	21.52	25.32

한천배지상의 당근 캘러스로부터 체세포배가 발생하는 것은 물론이고 액체배지에서도 고도로 동조화된 체세포배의 생산이 확립되었으며(Fujimura and Komamine, 1979), 이미 널리 활용되고 있다. 그러나 이와같이 생산된 체세포배의 동조화 상태를 형태학적으로 확인했다는 보고는 거의 찾아볼수 없다. 우선 캘러스로부터 발생된 체세포배와 현탁배양에서 발생된 체세포배는 그 발생환경이 같지 않다는데 관심을 가져볼 필요가 있다. 대량증식법을 위해 현탁배양으로부터 발생된 체세포배는 한천배지상에서 발생된 체세포배보다 자엽구조의 변형등 이상형태의 배가 더 많이 포함되어 있다는 데에 주목해야 할것이다. 왜냐하면 한천배지상에서 발생된 배가 현탁배양에서 발생된 배보다 접합자배에 더 가까운 구조를 가지고 있으며 현탁배양에서 발생된 이상형태의 체세포배는 식물체 재생율이 아주 낮기때문이다 (Fig. 24-29, Table 1). 이와같은 현상은 옥수수를 재료로한 실험에서도 관찰된 예가 있다(Emons and Kieft, 1991).

이상형태의 체세포배는 더덕의 세포배양에서 0.5-2 %의 낮은 서당 농도의 배지에서 배양할 경우에 두개의 자엽을 가진 배가 형성되지만 3% 이상 높은 농도의 배지에서 배양할 경우에 자엽수가 세개 이상의 다자엽배의 형성율이 높아진다는 사실이 밝혀졌다. 이들 다자엽배는 자엽수와 배축의 유관속수가 상관관계를 가지며(Fig. 30-43) 식물체 재생율은 낮기 때문에 대량증식 능력이 떨어진다(Table 2). 둘 또는 세개의 자엽을 가진 배는 유근부가 신장하면서 발아가 시작되면 근모가 발생하고 자엽은 약간 신장하면서 선단으로부터 녹색을 띠기 시작한다 이어서 첫번째 엽원기가 성장하면서 하나의 경엽부의 생장이 일어난다. 두자엽배는 대부분이 정상발아를 하지만 세자엽배는 절반이상이 발아되지 않는다. 네개의 자엽을 가진 배는 발아하여 하나의 경엽부의 생장을 보이지만 1/3밖에 발아하지 않는다. 나팔모양의 자엽을 가진 배는 뿌리부분만이 생장을 하고 자엽부분은 약간 신장하면서 녹색으로 되지만 배축은 비대해지고 탈분화되거나 갈변되면서 유경이 퇴화된다(Fig. 44-50). 이와같은 유경의 이상형태는 식물체 재생을 어렵게 하는 원인이 되는 것으로 보인다(Kerns *et al.*, 1986). 대두의 체세포배발생에서도 서당의 농도가 자엽수의 변화를 일으키며 (Lazzeri *et al.*, 1988 ;Kageyama *et al.*, 1990), 해바라기등 여러식물의 체세포배 발생에서 고농도의 서당배지에서 발생율이 높게 나타났는데 (Pé lissier *et al.*, 1990) 이 경우에 자엽수의 변화에 대하여는 언급된바 없으므로 다자엽배가 포함되었을 가능성을 추정해볼 뿐이다.

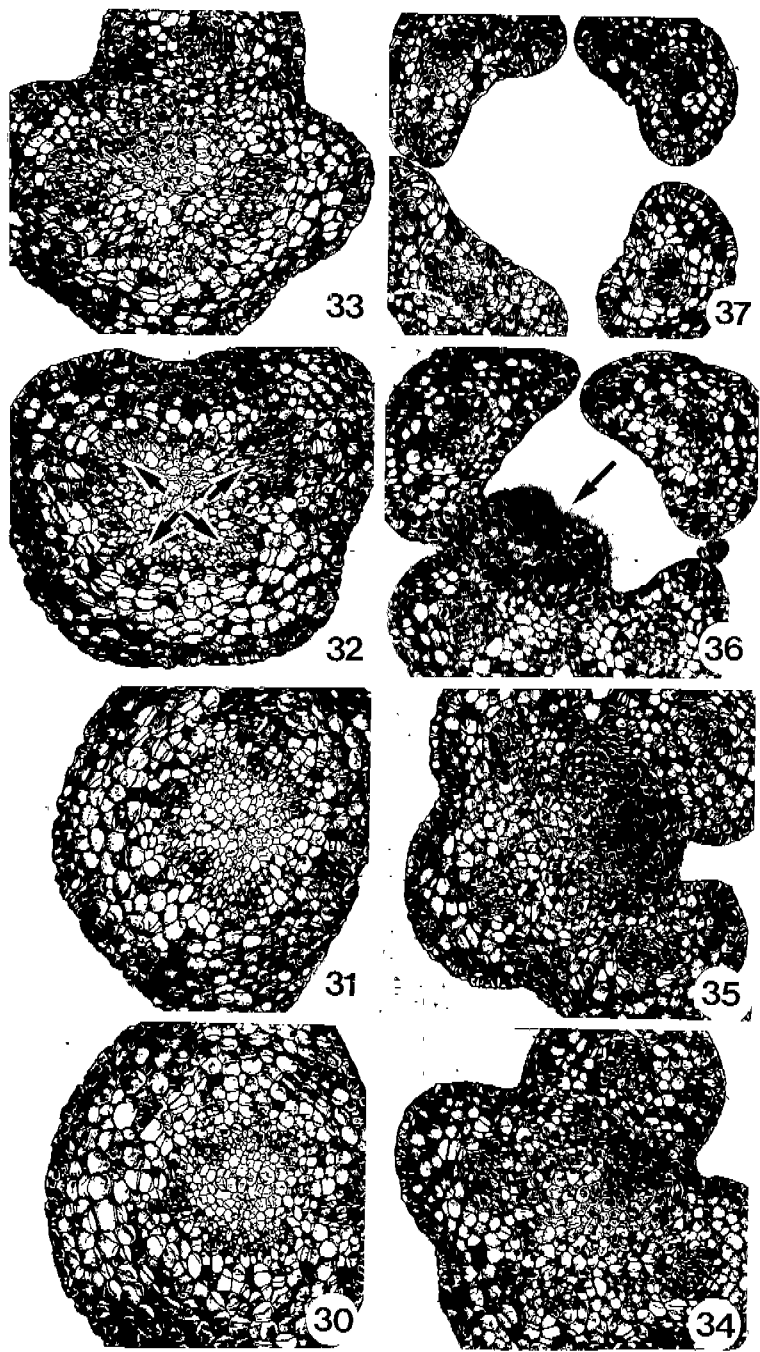


Fig. 30-37, Transverse sections of somatic embryo with four cotyledons in cell cultures of *Codonopsis planceolata* were made from hypocotyl to cotyledon. Nearly circular vascular tissues(30,31) in the lower hypocotyl are transformed into four vascular bundles(arrow, 32, 33), which are run into four cotyledons at cotyledonary node respectively(34-37). Plumule apex(arrow) is positioned at a cotyledon base instead of the center among four cotyledon(36).
 ×95.

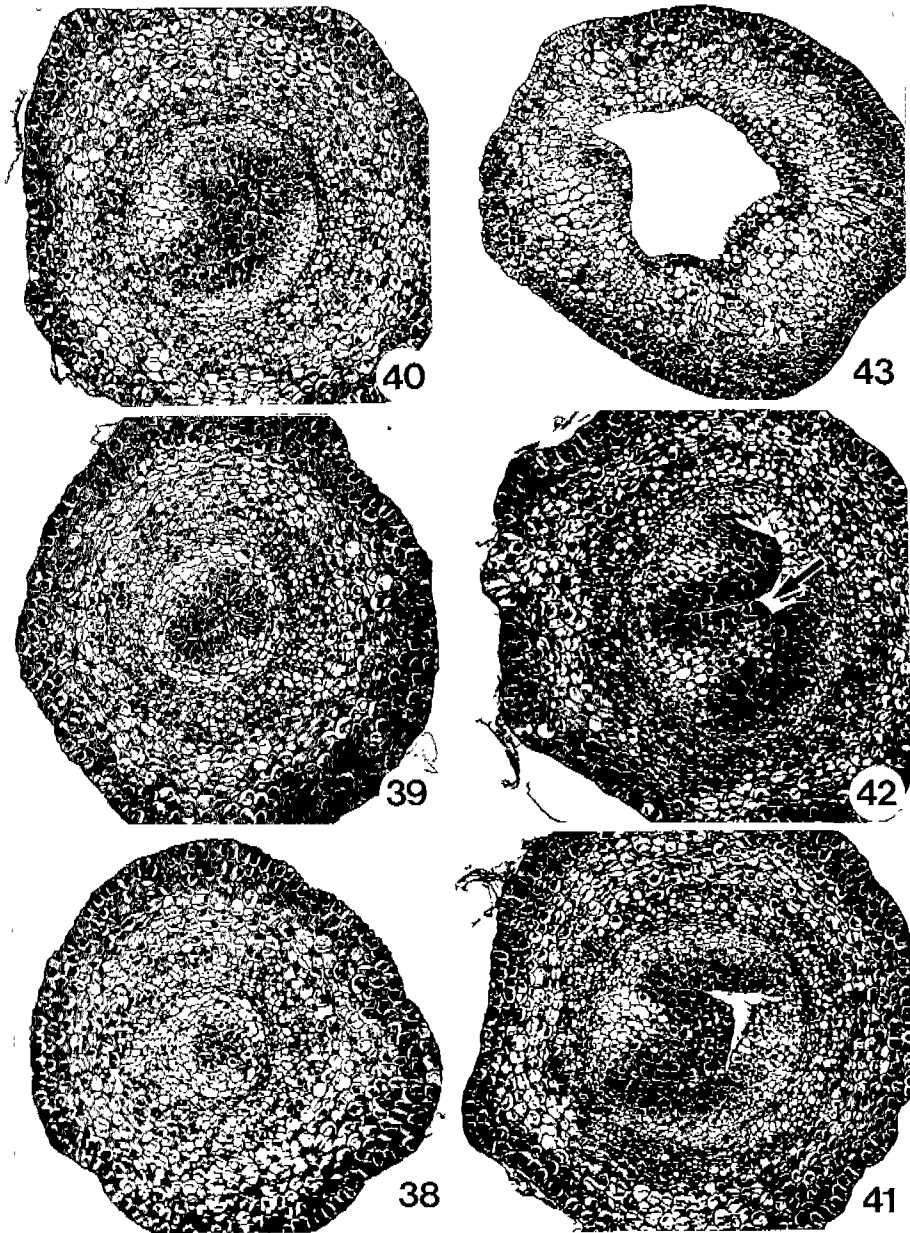


Fig. 38-43, Transverse sections of somatic embryos with horn type cotyledon in cell cultures of *Codonopsis lanceolata*. Circular vascular tissues at lower hypocotyl(38-40) are run into the cotyledon(43) through cotyledonary node(41, 42) at which the plumules appear(arrow, 42). $\times 75$.

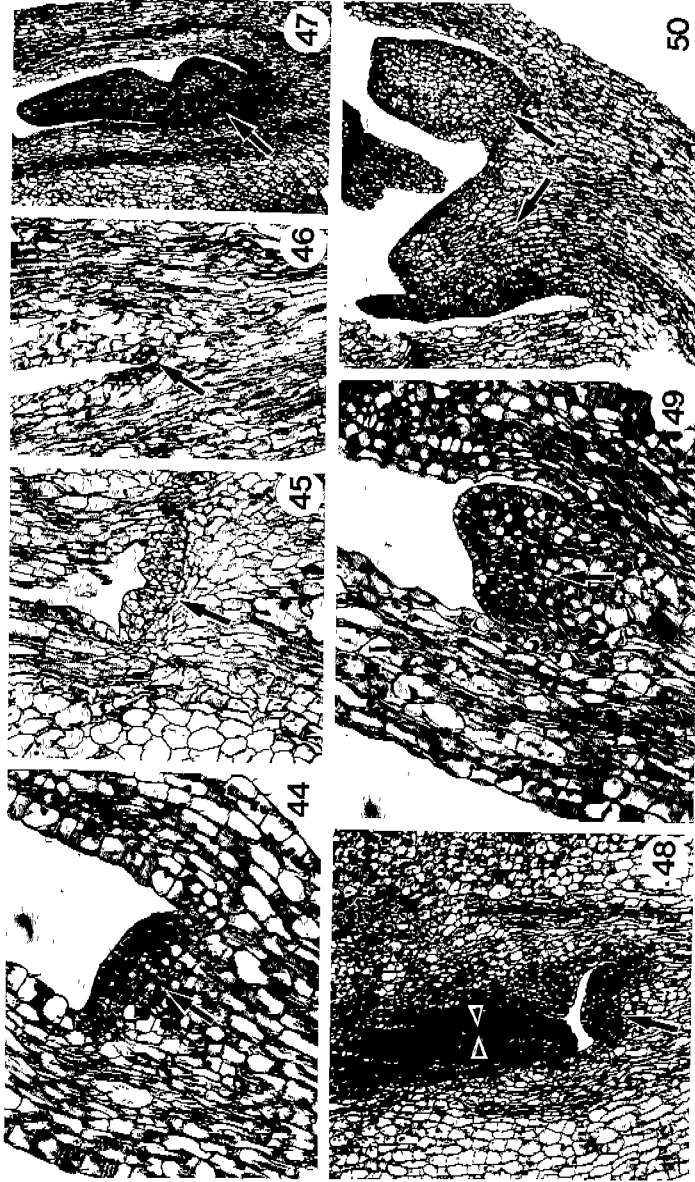


Fig. 44-50, Longitudinal sections of somatic embryos with structurally diversified cotyledons in *Codonopsis lanceolata*. Two cotyledonary embryo with plumule(arrow, 44), horn type cotyledonary embryo showing poorly developed (arrow, 45), aborted(arrow, 46), precocious(arrow, 47), and fully grown(arrow) plumule but sealed at upper region of cotyledon(arrow head, 48), three cotyledonary embryo with plumule(arrow, 49), and four cotyledonary embryo with plumules(arrows, 50). $\times 75$.

Table 2. Plant regeneration from the somatic embryos with aberrant cotyledons in cotyledons in *Codonopsis lanceolata*

Type of cotyledon	Regeneration rate (%)	Germination
Two	98.75	normal
Three	46.25	normal or abnormal degenerated plumule
Four	35.00	normal or abnormal degenerated plumule
Horn	2.50	degenerated plumule normally grown root

땅두릅의 조직배양에서 체세포배의 발생과정에서는 자엽의 수적 및 구조적 변형이 빈번히 일어나므로 여기서 소개하고자 한다. 배발생캘러스를 1.0 mg/L 2,4-D가 첨가된 배지에서 계속 배양할 경우에 체세포배의 발생이 일어나는데 이들 체세포의 대부분은 불링핀 또는 나팔모양의 자엽을 갖는 이상형배였으며 캘러스를 2,4-D가 첨가되지 않은 배지에 옮겨서 배양하면 이상형배는 거의 발생되지 않았다. 불링핀형 자엽을 가진 배는 횡단면에서 전형성층이 뿌리로부터 자엽으로 이어져있으며 자엽절에 해당되는 부위에 유경의 경단부가 형성되어 있지않고 자엽으로 연속된 구조로 되어 있어서 결국 하나의 자엽을 가진것으로 판단된다. 나팔모양의 자엽을 가진 배의 자엽을 횡단해 보면 원통형구조로서 전형성층도 원통형을 이루지만 하배측에서 합쳐져서 뿌리로 이어진다. 이와같은 불링핀형 및 나팔모양 자엽을 가진 배는 발아가 되지 않으므로 식물체로 재생될 수 없다.

또한 배발생 세포괴를 1.0 mg/l 의 2,4-D가 첨가된 MS배지에서 배양하다가 2,4-D가 제거된 배지로 옮기면 체세포배발생이 일어나는데 이때의 2,4-D제거배지에 싸이토키닌을 첨가해주면 BAP > Zeatin > Kinetin의 순으로 다자엽을 가진 배가 많이 형성된다(Fig. 57). 이들 싸이토키닌에 IAA를 같이 첨가해 줘도 다자엽배가 많이 형성된다. BAP의 처리기간은 일 주일 이상으로 하였을 때 그리고 배발생의 이른시기 일수록 다자엽배가 높은 비율로 형성되었다(Fig. 58). 이와같이 형성된 다자엽배의 식물체재생율을 고체배지상에서 조사해본 결과 두 자엽의 배보다 다자엽배가 재생율이 높았고 자엽 수가 많을 수록 경엽부의 형성 수도 많았다(Table 3, Fig 51-56). 이와같은 결과는 더덕이나 당근에서 다자엽의 배는 식물체 재생율이 아주 낮거나 재생되지 못하는 것과 뚜렷한 대조가 된다(Table, Smith *et al.*, 1990).

Table 3. Plant regeneration from somatic embryo with aberrant cotyledon in cell culture of *Aralia cordata* Thunb

No. of cotyledone	No. of embryorate	Regeneration rate (%)	No. of shoot(%)		
			1	2	3
2	60 ^a	100 ^a	100	0.00	0.00
2	30	20.00	100	0.00	0.00
3	47	21.27	100	0.00	0.00
4	45	33.33	66.66	26.66	6.66
≥5	37	40.54	33.33	40.00	26.66

Plant were developed from seeds(zygotic embryos) in soil after 3 weeked of planting

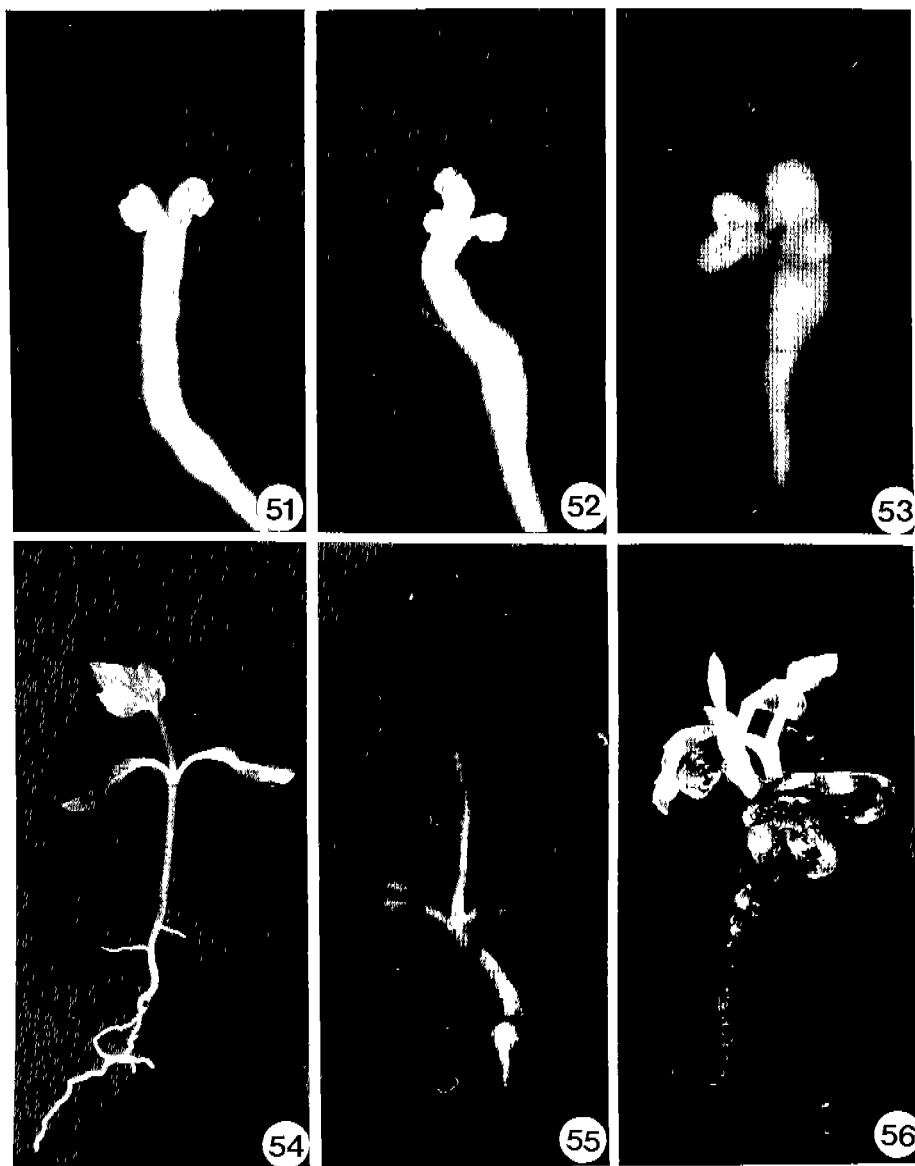


Fig. 51-56, When somatic embryos of *Aralia cordata* with two(51, $\times 3.5$), three(52, $\times 3.5$) and four-cotyledons(53, $\times 3.5$) were germinated, one or two shoots were developed from two cotyledonary(54* $\times 2.5$ and 55, $\times 2.5$) and four-cotyledonary seedlings respectively(56, $\times 2.5$). 54* germinated from zygotic embryo.

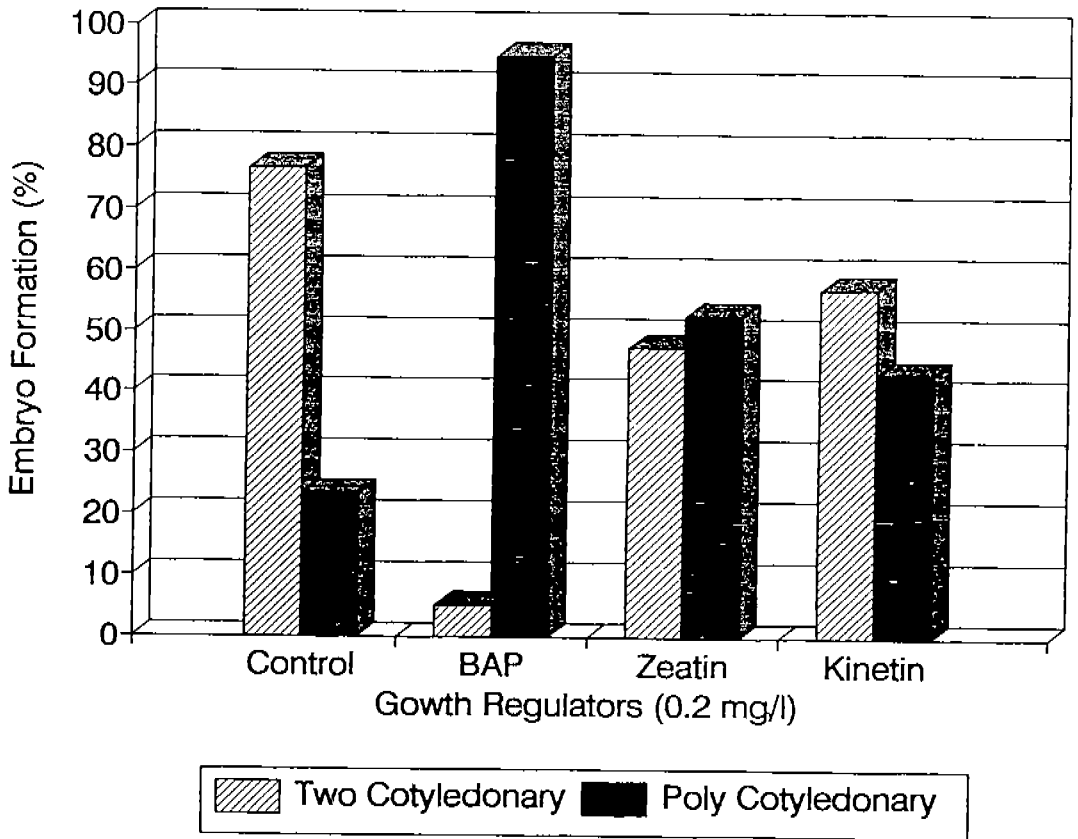


Fig. 57, Effect of cytokinins on the structural abnormalities of somatic embryo in cell cultures of *Aralia cordata*.

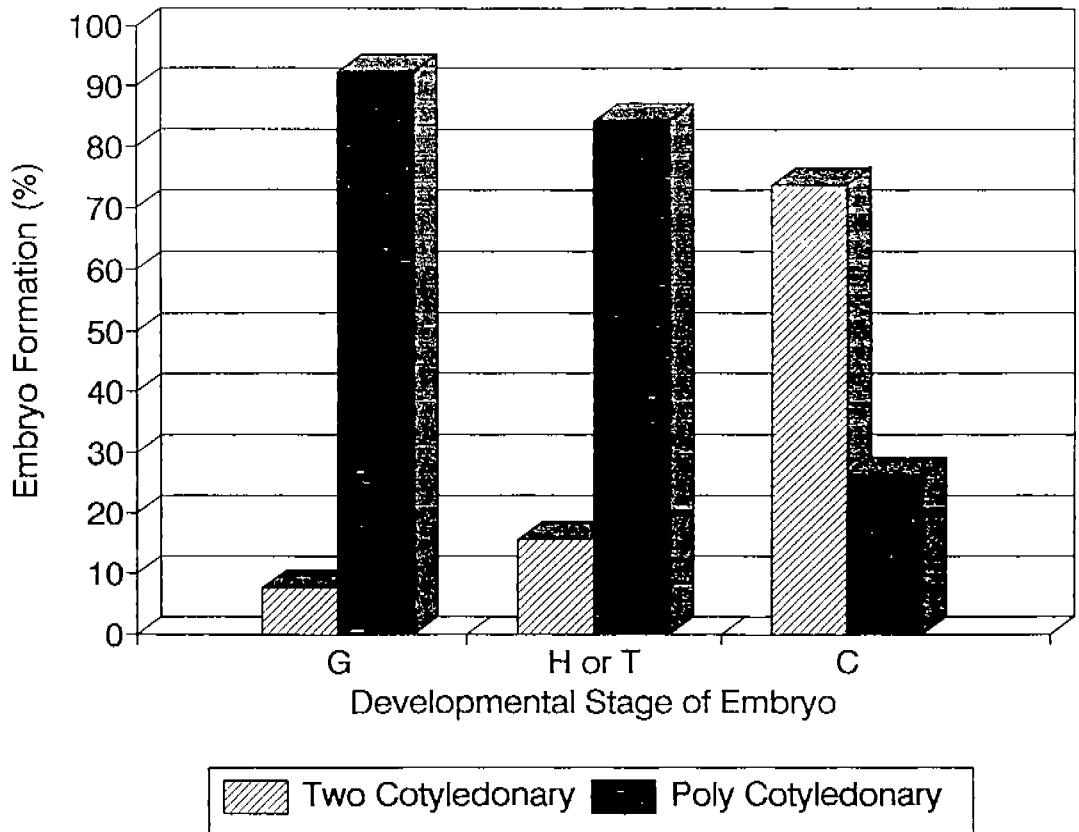


Fig. 58, The structural abnormalities of BAP-pretreated somatic embryo at various stages. G: globular stage, H or T: heart-shaped or torpedo stage, C: cotyledonary stage

땅두릅의 배발생세포괴에 0.2 또는 0.5 mg/l의 ABA를 3주간 처리배양하고 나서 2주간 홀몬없이 배양하면 두자엽배의 형성에 촉진효과를 보이지만 전기한 농도의 ABA배지에서 3주간 배양하다가 농도를 절반으로 낮춘 배지에서 2주간 배양하면 오히려 다자엽배가 더 많이 형성된다(Fig. 59). Caraway의 배양세포괴에 ABA를 배발생의 이른시기에 처리하면 할수록 정상적인 배의 형성율이 높다는 결과가 밝혀졌으며(Ammirato, 1974), 켈러리에서도 비슷한 결과가 나타났으나(Soh *et al.*, 1990), 저농도의 ABA를 첨가한 배지에서 배가 성숙할때까지 배양하면 다자엽배의 발생을 촉진한다.

이상과 같이 검토해 본 결과 세포조직배양계에서 체세포배가 발생할 때 접합자배와는 달리 구조적인 변화가 빈번하게 일어나고 있는 것을 알수있다. 이와같은 변화는 결국 당근이나 더덕에서와 같이 식물세포의 분화전능성 발현에 커다란 장애가 되는 경우가 있는가 하면 땅두릅에서는 식물체 재생율이 제고되기도 하므로 식물생명공학에서 중요한 의미를 갖게된다. 다자엽 배의 식물체 재생이 심하게 부진한 것은 유정의 퇴화에 원인이 있는 것으로 보이지만(Goebel-Tourand *et al.*, 1993) 유정의 정단분열조직의 구조및 그 발생에 대하여는 거의 밝혀진 결과가 없다. 자엽의 구조적및 숫적 변화가 체세포배의 발생과정에서 높은 빈도로 일어나는 현상은 기초식물학적인 면에서 커다란 관심사가 아닐 수 없다. 왜냐하면 식물계통학상으로 자엽의 수는 단자엽 및 쌍자엽 식물군으로 피자식물을 대별 할 만큼 중요한 형질로 다루어지지만 실험적으로 그 변화가 너무 쉽게 일어나기 때문이다.

Ammirato(1987)의 논문에서는 Figure 5의 모식도로 자엽발생을 도해하면서 구상형배의 선단부에 나타나는 환상의 분열조직에서 두개의 자엽원기가 형성되고 이로부터 자엽이 만들어지는데 하나 또는 여러개의 자엽원기를 형성할 경우에 하나 또는 여러개의 자엽을 갖게 된다. 또한 환상의 분열조직이 전체적으로 세포분열을 하게되면 나팔모양의 자엽이 분화되는것으로 설명하였으나 실험관찰에 의한 근거는 제시되지 않았다. 실제의 관찰에서 환상의 분열조직을 확인하기는 어려우며 자엽원기는 배의 주축부중심에서 전형성층의 분화에 이어져서 나타나는 것으로 보인다. 이와 같은 다자엽의 발생에 대한 본격적인 연구는 별로 이뤄진 결과가 없으며 다자엽배의 발생은 배양실험 과정에서 영양 및 홀몬의 공급상에 불균형이나 환경의 부적합 상태에서 나타나는 일종의 변태로 해석되어야 할것이다.

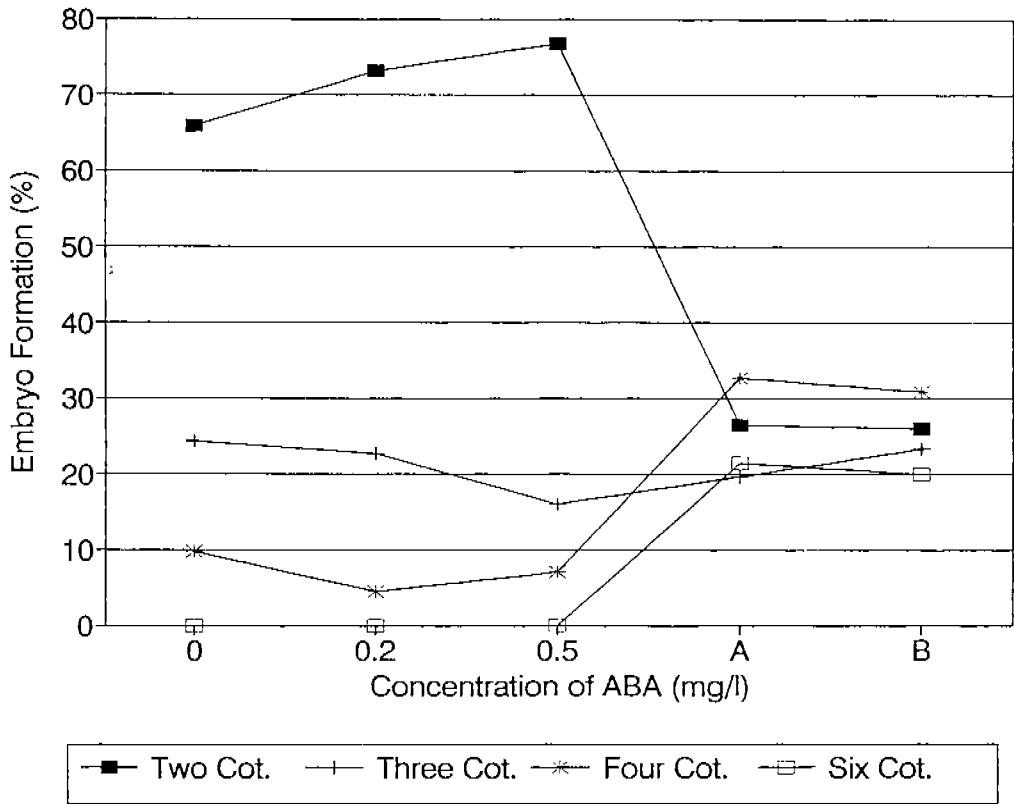


Fig. 59, Effects of ABA concentration and on the cotyledon number of somatic embryo in cell cultures of *Aralia cordata*. A-B: After culture in MS medium containing 0.2 or 0.5 mg/l ABA for three weeks, subculture were performed on medium containing half strength of ABA.

일반적으로 체세포배는 그 구조가 접합자배와 같지만 부분적으로는 세포배열 및 분화 정도의 차이 또는 변형을 나타내기도 하는데 유채의 체세포배는 접합자배와 같이 배 특이성 저장단백질을 가지고 있으나 그 함량은 10배나 적다 (Crouch, 1983; Choi *et al.*, 1987). 또한 미나리의 체세포배 발생과정에서 단백질을 분석해 보면 비배발생캘러스, 배발생캘러스 및 배발생 단계별 단백질 유형에 현저한 차이가 있는 것을 관찰할 수 있다(Choi *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1992). 그러므로 분자수준에서 체세포배의 발생단계별로 또는 체세포배와 접합자배의 상동성이나 차이점을 밝히는 것은 배발생의 이해에 중요한 실마리를 제시하게 될 것이다.

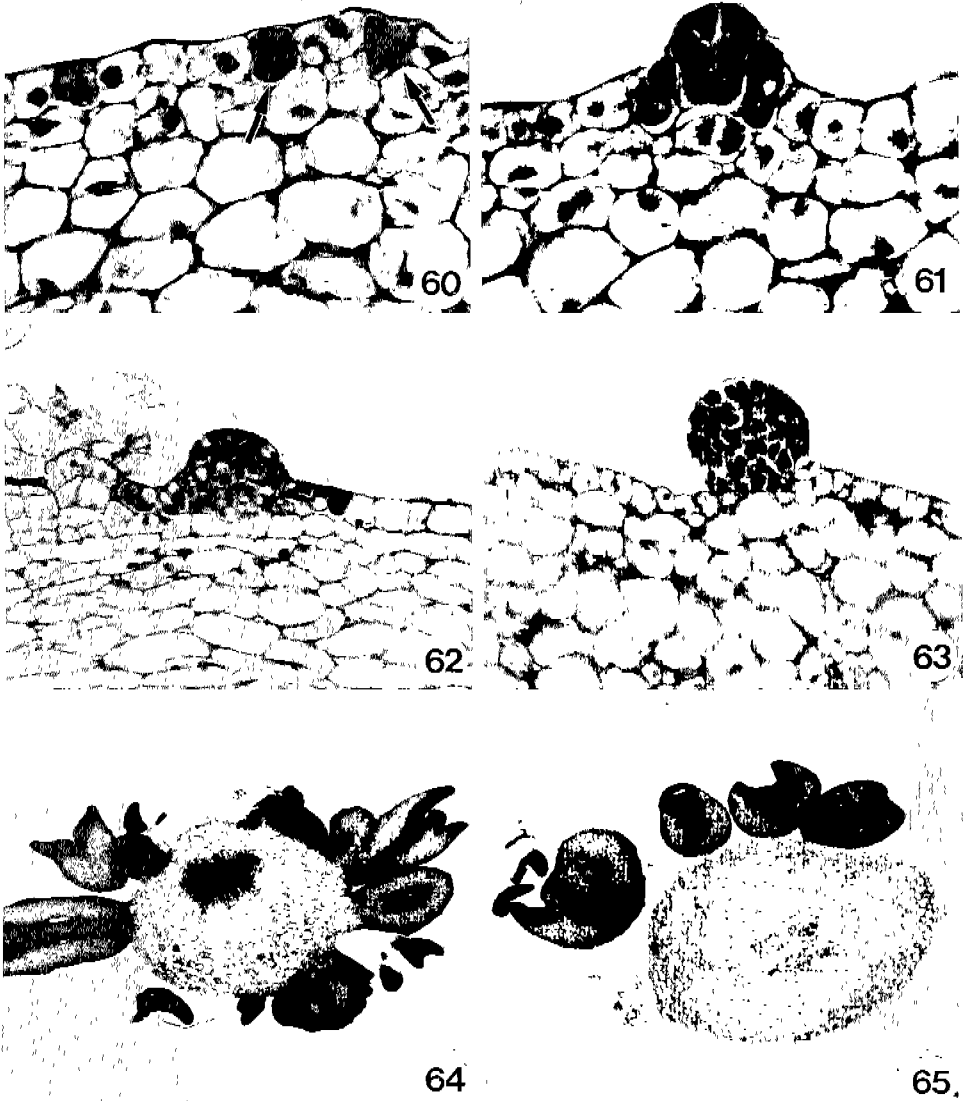


Fig. 60-65, Somatic embryos were developed from a epidermal cell of hypocotyl in *Acanthopanax serticosus*. Some epidermal cells divide and develop into proembryo(60, $\times 340$) and then gradually develop into globular embryo(61, $\times 340$ -63, $\times 250$). Somatic embryogenesis were processed more rapidly in the upper portion(64, $\times 25$) of hypercotyl than lower portion(65, $\times 25$).

III. 결 론

식물세포조직을 시험관에서 배양하면 탈분화상태의 캘러스가 형성된 다음에 기관형성원기가 만들어진 다음에 기관분화를 거쳐서 또는 배발생세포로부터 체세포가 발생되어서 식물체의 재생이 일어나므로 식물세포의 분화전능성이 발현될수 있다. 일부식물에서는 배양절편체에서 캘러스형성을 거치지 않고 직접 기관형성이나 배발생이 일어나 식물체로 재생된다(Fig. 60-65; Tran Thanh Van and Trinh, 1990; Choi and Soh, 1993; Harini and Sita, 1993). 이와같은 연구는 최근에 괄목할만한 발전을 거듭하고 있지만 아직도 배양세포조직으로부터 식물체의 재생이 실현되지못한 경우가 있다. 그러므로 식물생명공학의 발전을 위해서 형질전환세포를 만들 경우엔 먼저 식물체 재생능력의 확인이 필요하게되며 결국 분화전능성의 발현을 거쳐서 실용화가 될수 있을것이다. 세포조직배양계에서 재생된 식물은 배양액및 배양환경의 조건에 따라서 구조와 기능상으로 비정상적인 식물체의 발생도 있기때문에 이런 식물을 실험재료로 사용할 경우에는 충분한 검토가 있어야 할것이다. 또한 산업적으로 이용될 경우에는 생산성 향상에 심각한 장애가 되므로 개선책이 세워져야 할것이다.

체세포배는 식물발생학 연구를 위해서 널리 활용되는 한편 인공종자의 개발등 실용면의 잠재력이 크게 인정되고있다. 그런데 체세포배 발생과정에서도 비정상적인 형태의 배가 나타나서 결국 정상적인 식물체 재생에 문제가 되고 있다. 이와같은 경우에 형태적으로는 유경의 정단분열조직의 분화가 정상적으로 일어나지 못한 것으로 관찰되었으나 아직껏 이에 대한 연구는 초보단계에 머물러 있다. 세포조직배양계에서 재생된 식물은 구조적인 변화가 일어나므로서 형태학적으로 더욱 폭넓은 다양성을 보여주게 된다. 식물의 배발생이 일어날때 새로운 mRNA및 단백질이 활발히 합성되는것으로 보아 재생식물의 형태적인 이상현상이 일어나는 과정도 분자수준으로부터 구명되어야 할 것이다.

형질전환된 대두에서 hydroxyproline-rich glycoproteins 및 glycine-rich proteins 와 같은 세포벽 단백질에 대한 mRNA수준에서의 연구내용에 유관속형성층등의 조직특이적인 발현을 관찰한 논문에서 전형성층부분의 발현을 유관속형성층에서의 발현으로 보고된 바있는데(Ye and Varner, 1991) 조직분화에 대한 충분한 확인이 필요한 경우가 될 것이다 (Kang and Soh, 1988). 형질전환 식물체에서 조직특이적인

유전자발현이 나타날 경우에는(Chae *et al.*, 1992) 형태학적인 검토를 철저히 해야 할것으로 본다.

사 사

이 논문의 정리는 전북대학교 생물학과 김영순박사와 대학원생, 이강섭, 최용의, 최필선, 배형화, 이정운, 채수천, 이재동, 김학수, 강미경들의 적극적인 협력으로 이뤄졌으며 이에 대하여 마음속으로 부터 고마움을 표시하고자 한다.

Summary

Developmental and Structural Diversity of Regenerated Plants in Cell and Tissue Cultures

Woong Young Soh
Dept. of Biology, Chonbuk
National University, Chonju 560-756, Korea

It is possible to regenerate plants from calli, single cells and protoplasts of numerous species *via* organogenesis or embryogenesis in cell and tissue culture systems. Also such regeneration of plants can directly occur from cells of explants. However certain plant species has not been yet provided cultures suitable for plant regeneration from cells or tissues. For example, we have to confirm the regenerability of plant from cells before preparing transformed cells for application. Even more, it is very important to notice that regenerated plants in cell and tiussue cultures often show structural abnormality. The mojority of those plants is functionally disordered and eventually cases degenerated. One of such examples is vitreous plants which are manifested mainly in the leaves and manifested to a lesser extent in the stems and roots. Regenerants in suspension cultures show more frequent vitrification than on gelled media so that relative humidity and water potential are the key factors involved in abnormal morphogenesis *in vitro*. The other is that somatic embryos formed in media containing BAP or high concentration of sucrose show frequently cotyledon aberrancy such as polycotyledon and horn

type cotyledon. The embryos with aberrant cotyledon of *Codonopsis lanceolata* could not germinate or regenerate into plants in many cases. In contrast, the polycotyledon embryos of *Aralia cordata* germinated in higher percentage than two cotyledonary embryos, but horn type cotyledonary embryos rarely germinated. The major cause of poor germination is the abnormal development of plumule apex meristem.

참고문헌

- Agarwal, B., U. Singh and M. Banerjee (1992) In vitro clonal propagation of tea (*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze). *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 30: 1-5.
- Ammirato, P.V. (1974) The effects of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway (*Carum carvi* L.) *Bot. Gaz.* 135: 328-337.
- Ammirato, P.V. (1987) Organizational events during somatic embryogenesis. *In: Plant Tissue and Cell Culture*(ed., Green, C.E.), Alan R., Liss Inc., New York. PP.57-81.
- Bae, H.H. (1993) Histological study of adventitious root formation from callus of *Bupleurum falcatum* L. MS Thesis, Graduate School, Chonbuk National University, Chonju, Korea
- Buchheim, J.A. , S.M. Colburn, and J.P. Ranch (1989) Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plant growth. *Plant Physiol.* 89: 768-775.
- Chae, S.C., Y.S. Kim and W.Y. Soh (1992) Stable expression of foreign gene in *Nicotiana glauca* Transformants. *Proc. Ann. Meet. Korean Soc. Plant Tissue Culture*, P. 38(Abstr.).
- Cho, D.Y., P.S. Choi and W.Y. Soh (1993) A comparison of protein pattern in adventitious and tap root development of *Phaseolus vulgaris* L. II. Protein pattern in adventitious root from callus derived from hypocotyl explant. *Korean J. Plant Tissue Culture.* 20: (in press)
- Choi, J.H., L.S. Liu, C. Borkind and Z.R. Sung (1987) Cloning of genes developmentally regulated during plant embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 1906-1901.
- Choi, P.S., W.Y. Soh and D.Y. Cho (1991) Effects of growth regulators on adventitious bud from immature zygotic embryos of *Ginkgo biloba* L. *Proc. Ann. Meet. Korean Soc. Plant Tissue Culture.* P. 15(Abstr.).
- Choi, P.S., W.Y. Soh, and Y.S. Kim (1991) Analysis of soluble proteins of somatic

- embryo according to the developmental stage in *Conodopsis lanceolata* L. Proc.Spring Meet.Korean Soc.Plant Tissue Cult. P.39(Abstr.)
- Choi, Y.E. and W.Y. Soh (1993) Anatomy of somatic embryogenesis in zygotic embryos culture of *Acanthopanax serticosus*. Proc.Spring Meet.Kor.Soc.Plant Tissue Culture. P.27(Abstr.).
- Crouch, M.L. (1983) Non-zygotic embryos of *Brassica nupa* contain embryo-specific storage proteins. *Planta*. 156: 520-524.
- Debergh, P.C., and P.E. Read (1991) Micropropagation. *In* : Micropropagation; Technology and Application(ed., Debergh, P. and R.H. Zimmerman), Kluwer and Academic Publ., Netherlands, PP.1-14.
- Emons, A.M.C. and H. Kieft (1991) Histological comparison of single somatic embryos of maize from suspension culture with somatic embryos attached to callus cells. *Plant Cell Rep.* 10: 485-488.
- Fujimura, T. and A. Komamine (1979) Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Physiol.* 79 : 988-991.
- Gaspar, Th., C. Kewew, P. DeBergh, L. Maene, M. Paques and Ph. Boxus (1987) Vitrification : morphological, physiological and ecological aspects. *In*; Cell and Tissue Culture in Forestry(ed., Bonga, J.M., and D.J. Durzon), Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht, PP. 152-166.
- Goebel-Tourand, I., M. Marie-Claude, S. Lucienne, M. Emile and D. Alain (1993) Arrest of somatic embryo development in grapevine: histological characterizatoin and the effect of ABA, BAP and zeatin in stimulating plantlet development. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 33: 91-103.
- Harini, I. and G.L. Sita (1993) Direct somatic emryos of chilli (*Capsicum annuum* L.). *Plant Sci.* 89: 101-112.
- Howel, S.H. (1993) Transgenic plants for studying resposses to the hormones auxins and cytokinins. *In*: Transgenic Plants. Vol.1. Engineering and Utlization(ed., Kung, S. and R. Wu), Academic Press.Inc., New York. PP. 195-223.

- Jo, P.H., R.S. Seong, H.H. Bae, W.Y. Soh and D.Y. Cho (1990) Saikosaponin content in *Bupleurum falcatum* root produced by tissue culture. Korean J. Pharmacogn. 21: 205-209.
- Kageyama, C., T. Komatsuda, and K. Nakajima (1990) Effects of sucrose concentration on morphology of somatic embryos from immature soybean cotyledons. Plant Tissue Culture Letters. 7 : 108-110.
- Kang, K.D. and W.Y. Soh (1988) Origin of the vascular cambium in the developing hypocotyl of *Glycine max* seedling. Korean J. Bot. 31: 289-298.
- Kerns. H.R., V.B. Barwale, M.M.Jr. Meyer and J.M. Widholm (1986) Correlation of cotyledonary shoot proliferation and somatic embryoid development insuspension cultures of soybean(*Glycine max* L. Merr.). Plant Cell Rep. 5: 140-143.
- Kim, H.S., S.C. Cho, Y.S. Kim and W.Y. Soh (1993) Protein synthesis in the transformant leaf of *Nicotiana glauca*. Proc. Spring Meet Bot. Soc. Korea P.19 (Abstr.)
- Kim, Y.S., D.Y. Cho and W.Y. Soh (1992) Protein analysis and structural aspects during somatic embryogenesis in *Oenanthe javanica*. Korean J. Plant Tissue Culture. 19: 23-28.
- Kim, Y.S., W.Y. Soh, M.J. Suh and J.B. Hong (1993) Formation and Selection of antibiotic resistant somatic hybrids between *Nicotiana glauca* and *N. Tabacum*. Proc. Spring Meet. Korean Soc. Bot. P.19(Abstr.).
- Komamine, A. (1991) Molecular Biology in the Totipotency of Plants. Asakura Shioden, Tokyo, PP.3-26(in Japanese).
- Lazzeri, P.A., D.F. Hildebrand, J. Sunega, E.G. Williams and G.B. Collins (1988) Soybean embryogenesis : interactions between sucrose and auxin. Plant Cell Rep. 7:517-520.
- Lee, J.D., W.Y. Soh and D.Y. Cho (1992) Somatic embryogenesis and adventitious bud formation from zygotic embryo of *Lycium chinense* Mill. Pro. Ann. Meet. Korean Soc.Plant Tissue Culture. P. 37 (Abstr.).

- Lee, K.S. and W.Y. Soh (1993) Somatic embryogenesis and structural aberrancy of embryos in tissue cultures of *Aralia cordata* Thunb. Korean J.Plant Tissue Culture. 20 : (in press).
- Lim, H.T. and F.M. Hoffman (1991) Morphological and anatomical changes on in vitro regenerated plantlets of *Lycopersicon esculentum* L. during their acclimatization. Korean J.Plant Tissue Culture. 18: 369-375.
- Liu, J.R., S.R. Min and S.G. Yang (1993) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid at a single concentraton determining various morphogenesis patterns in shoot apical meristem cultures of sweet poatoto(*Ipomoea batatas*). Korean J.Plant Tissue Culture. 19: 167-170.
- Malik, K.A. and P.K. Saxena (1992) Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L.: High-freguency induction of direct shoot formation in intait seedlings by N⁶-benzyl-aminopurine and thidiazuron. *Planta*. 186: 384-389.
- Min, S.R., S.G. Yang, J.R. Liu, P.S. Choi and W.Y. Soh (1992) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue culture of *Codonopsis lanceolata*. *Plant Cell Rep.* 10: 621-623.
- Nomura, K.and A. Komamine (1985) Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiol.* 79: 988-991.
- Paek, K.Y., B.H. Han and S.L. Choi (1991) Physiological, biochemical and morphological characteristics of vitrified shoots regenerated in vitro. *Kor. J. Plant Tissue Culture*, 18(3): 152-162.
- Pasqualetto, P.-L. (1990) Vitrification in plant tissue culture. *In: Plant Aging: Basic and Applied Approaches*(ed., Rodriguez R., R.S. Tames and D.J. Durzan,). Plenum Press, New York, PP. 133-137.
- Pé lissier, B., O. Bouchefra, R. Pepin, and G. Freyssinet (1990) Production of isolated somatic embryos from sunflower thin cell layers. *Plant Cell Rep.* 9: 47-50.

- Phan, C.T. and R. Letouze (1983) A Comparative study of chlorophyll, phenolic and protein contents, and of hydroxycinnamate: Co A ligase activity of normal and vitreous plants(*Prunus avium* L.) obtained in vitro. *Plant Science Letters*, 31: 323-327.
- Ritchie, S.W. and R.K. Hodges (1993) Cell culture and regeneration of transgenic plants. *In*; *Transgenic Plants. Vol.1. Engineering and Utilization*(ed., Kung, S. and R. Wu), Academic Press.Inc., New York. PP. 147-178.
- Redenbaugh, K., J.A. Fujii and D. Slade (1991) Synthetic seed technology. *In*; *Scale - Up and Automation in Plant Propagation*(ed., Vasil, I.K.). PP. 36-75.
- Smith, D.L., and A.D. KriKorian (1990) PH control of carrot somatic embryogenesis. *In*; *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*(ed., NijKamp, H.J.J., L.H.W. Van der Plas and J. Van AartrijK), Kluwer Academic Publishers, Netherlands. PP. 449-453.
- Soh, W.Y., K.D. Kang and K.S. Lee (1991) Structural aspects of cotyledonary variations in somatic embryos of dicotyledonous cell cultures. *Trends in the Biotechnology of Woody Plants, 3rd International Workshop Organized by the IUFRO Working Party S2.01-07, Somatic Cell Genetics*, P. 10(Abstr.).
- Soh, W.Y., U.D. Yeo and S.S. So (1990) Artificial seed production and somatic embryogenesis from the cultured cells of *Cedrela sinensis* Juss. *Korean J. Plant Tissue Culture*, 17: 231-238.
- Steward, F.C., M.O. Mapes and K. Mears (1958) Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Amer. Jour. Bot.* 45: 705-708.
- Skoog, F and C.O. Miller (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp.Soc.Exp.Biol.* 11: 118-131.
- Tran Thanh Van, K. and T.H. Trinh (1990) Organogenic differentiation. *In*; *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations* (ed., Bhojwani, S.S.), Elsevier

Sa.Publ., Amsterdam. PP. 34-53.

Ye, Z.-H. and J. E. Vaner (1991) Tissue-specific expression of cell wall proteins in developing soybean tissues. *Plant Cell*. 3: 23-37.

Ziv, M.(1991) Quality of micropropagated plants-vitrification, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27: 64-69.

Ziv, M. (1991) Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro Plants. *In*; *Micropropagation: Technology and Application*(ed., Debergh, P.C. and R.H. Zimmerman), Kluwer Academic Publ., Dordrecht, PP. 45-69.