

## 난과식물의 형질전환 유도 및 다량증식에 관한 연구

### I. 자란(*Bletilla striata*)의 미성숙 종자로부터 체세포배 형성 및 식물체 재분화

李 偵 錫\* · 金 永 俊 · 鄭 賢 淑\*\* · 黃 柏

(전남대학교 생물학과, \*임학과, \*\*조선대학교 유전공학과)

## Studies on the Induction of Transformation and Multiplication in Orchid Plants

### I. Formation of Somatic Embryos and Regeneration from Immature Seeds of *Bletilla striata*

Lee, Jhung Seok\*, Young Jun Kim, Hyeon Sook Cheong\*\*  
and Baik Hwang

(Department of Biology and \*Department of Forestry, Chonnam  
National University and \*\*Department of Genetic  
Engineering, Chosun University, Kwangju)

#### ABSTRACT

Our study was carried out for plant regeneration *via* somatic embryogenesis from immature seeds of *Bletilla striata*. The highest frequency of embryogenic callus formation was obtained from the immature seeds (at 150 days after pollination) cultured on Hyponex and VW medium supplemented with 3 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 1 mg/l kinetin under the dark condition. Multiple somatic embryos were induced when embryogenic callus was transferred to VW medium without growth regulators under continued illumination. Somatic embryos were observed histologically with scanning electron microscopy. Regeneration of *Bletilla striata* was obtained from somatic embryos with a well-defined scutellum and coleoptile as well as with one or more shoot primordia and root primordia. We think that these methods for orchid multiplication must be useful to access clonal propagation of orchids.

#### 서 론

기내(器內)에서 고등식물의 조직이나 칼루스로부터 식물체로 효과적인 분화는 체세포 유전을 개량하는 기술 즉, 원형질체 융합 및 유전공학 기술 등의 이용에 있어서 필수적이다. 체세포배 발생은 기내에서 칼루스, 현탁 및 원형질체 배양 등으로부터 간접적으로 발생되거나 줄기 절편

또는 접합배(zygotic embryo)와 같은 기관조직의 세포로부터 직접 발생되는 재분화를 이룰 수 있는 한 과정으로서 잘 알려져 있으며(Williams and Maheswaran, 1986), 유전적으로 안정한 동일 식물체를 짧은 시간에 다량 증식시킬 수 있는 잇점이 된다(Ammirato, 1983; Vasil, 1983; Vasil and Vasil, 1982a; Ho and Vasil, 1983; Hacciuss, 1978).

체세포배의 기원 및 발달에 관해서는 Tisserat 등(1979), Thomas 등(1979) 및 Sharp 등(1980)에 의해서 관찰되어졌으며, 양극(bipolar) 구조(with root and shoot apices)를

본 논문은 1989년도 문교부 유전공학연구소 학술연구조성비 지원에 따른 연구결과임.

지닌 체세포배는 인공 종자로도 유용하게 이용될 수 있다 (Ammirota, 1983). 체세포배 발생에 의한 식물체 재분화는 당근(Kameya and Uchimiya, 1972), caraway(Ammirota, 1983) 및 담배(Bajaj, 1977; Gill *et al.*, 1979) 등과 같은 비교적 소수의 종에서만이 효과적으로 얻어졌다. 난과식물에 있어서는 미성숙 종자로부터 체세포배 발생에 의한 식물체 재분화의 보고는 없는 실정이다.

본 논문에서는 난과식물의 형질전환 유도 및 다량증식에 관한 일련의 연구로서 자란(*Bletilla striata*)의 미성숙 종자로부터 배발생 칼루스 및 체세포배의 유도를 통한 다량 증식의 가능성을 보았고, 형태 및 전자현미경적 관찰에 의하여 이들의 과정을 조사하고 확인하였다.

## 재료 및 방법

**칼루스유도 및 분화.** *Bletilla striata*의 미성숙 종자는 기보(Lee *et al.*, 1988, 1990)의 방법을 이용하여 얻었다. 생장 조절제로서 1-3 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)와 0-1 mg/l kinetin 및 1-3 mg/l naphthaleneacetic acid(NAA)와 0-1 mg/l 6-benzylaminopurine(BAP)를 각각 조합하고, 3.5% sucrose와 0.8% agar을 첨가한 Hyponex 배지(Kano, 1962) 및 VW 배지(Vacin and Went, 1949)에서 종자를 계대배양(27°C, at dark)하여 배발생 칼루스를 유도하였다.

유도된 배발생 칼루스는 생장조절제가 첨가되지 않은 Hyponex 및 VW 분화배지에서 배양(light: dark=16 h: 18 h, ca 1500 Lux, 27°C)하여 체세포배를 유도하였으며, 재분화가 이루어진 식물체는 수대에서 경화 처리한 후 화분에 옮겨 재배하였다.

**형태적 관찰.** 배양 기간별로 배발생 칼루스 및 체세포배를 채취하여 FAA(37% formalin/glacial acetic acid/absolute ethanol/water, 5/5/50/40, v/v)에 고정(for 72 h)시킨 후 5% hydrochloric acid로 연화처리(for 8 h)하였다.

Ethanol series(35%-absolute) 및 ethanol/xylene series로 탈수(each all, 10 h)한 후 paraplast에 포매한 다음 rotary microtome을 사용하여 10 µm 두께로 절편하고 hematoxylin과 1% safranin으로 염색(7-10 min)한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

**주사 전자현미경적 관찰.** 주사 전자현미경 관찰 시료는 2% glutaraldehyde(in 0.1 M Na-cacodylate buffer, pH 7.0)에 전고정(for 2 h, 4°C)하여 위의 cooled Na-cacodylate buffer(pH 7.0)로 세척한 다음 1% OsO<sub>4</sub>(in 0.1 M Na-cacodylate buffer, pH 7.0)에 후고정(overnight, 4°C)하였다.

Ethanol series(25%-absolute)로 탈수(4°C)하여 critical point dryer(FL-949B, Balzer)에서 건조한 후 gold-ion coating(IB-2, Eico-Engineering)한 다음 15 kV로 작동시킨 Hitachi S-450 주사 전자현미경으로 관찰하였다.

Table 1. Rates of induction of embryogenic callus and somatic embryos and regeneration from immature embryo in *Bletilla striata*

Growth regulators* (mg/l)		Embryogenic callus	Somatic embryos**	Regeneration
2,4-D : KIN	1:1	+	+	+
	2:1	++	++	++
	3:1	+++	+++	+++
NAA : BAP	1:1	+	+	+
	2:1	+	+	+
	3:1	++	++	++

Quantitative Rates: +, rare; ++, good; +++, excellent.

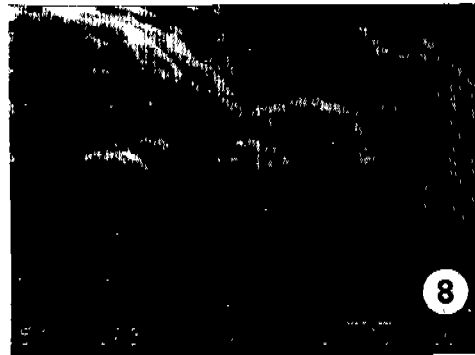
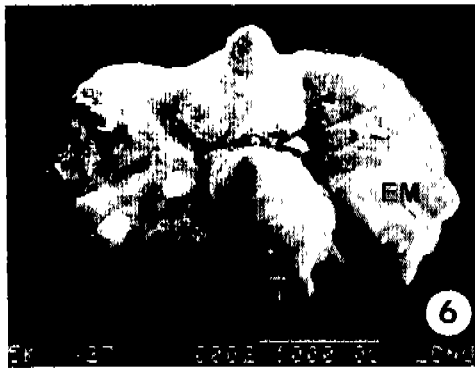
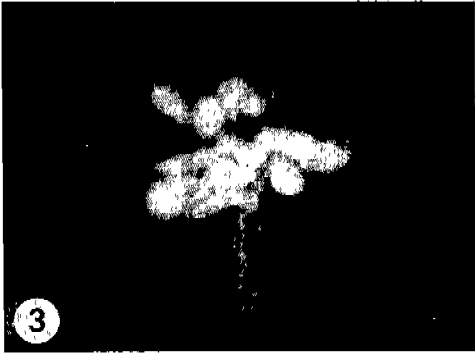
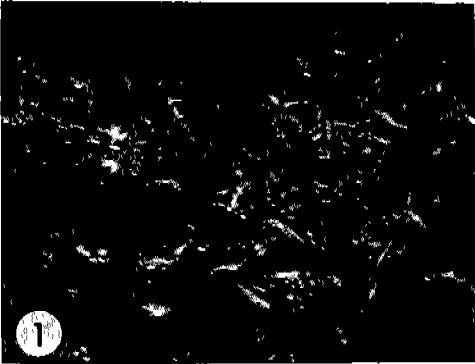
\*2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; KIN, kinetin; NAA, naphthaleneacetic acid; BAP, 6-benzylaminopurine. \*\*Transferred to growth regulator-free medium.

## 결 과

**배발생 칼루스 유도.** 자란(*Bletilla striata*)의 green pod로부터 채취한 미성숙 종자(인공수분 후 150일)는 0.5 mm 크기의 작고 단단한 상태였다(Fig. 1). 이들 미성숙 종자는 Hyponex 및 VW 고형배지(pH 5.2)에서 2주 정도 암배양 하였을 경우에 칼루스가 유기되기 시작하였으며, 3주 정도 경과하면 깨끗하고 흰 단단한 모양의 칼루스가 유도되었으며 이를 배발생 칼루스로 간주하였다(Fig. 2). 생장 조절제로서 3 mg/l 2,4-D와 1 mg/l kinetin이 첨가된 배지에서는 배발생 칼루스를 효과적으로 얻을 수 있었으며, 이후 이들로부터는 체세포배의 형성이 효과적으로 나타났다(Table 1). 한편, 1-3 mg/l NAA와 0-1 mg/l BAP가 첨가된 경우와 2,4-D의 농도가 낮아진 경우에는 갈색을 띤 덩어리 형태의 non-embryogenic callus 상태가 다수 나타났으며 배발생 칼루스의 형성률은 저조하였다. 이와 같이 유도된 배발생 칼루스는 2,4-D의 농도가 3 mg/l로서 일정하게 유지된 상태에서 연속 계대배양하여 배발생 칼루스 상태를 유지시킬 수 있었다.

**체세포배 발생 및 형태적 관찰.** 배발생 칼루스를 생장 조절제가 첨가되지 않은 VW 분화배지에서 배양하여 체세포배의 형성 및 식물체로의 재분화가 이루어짐을 확인하였다(Table 1, Figs. 3-12). 3 mg/l 2,4-D와 1 mg/l kinetin이 첨가된 칼루스 배지에서 유도된 배발생 칼루스를 분화배지에서 배양하였을 경우 하얗고 단단하며 다양한 형태의 체세포배가 다수 형성되었으며(Figs. 3 and 6), 재분화도 효과적으로 이루어짐이 관찰되었다(Figs. 5, 8-12). 한편 NAA와 BAP가 첨가된 배지에서 유도된 배발생 칼루스로부터는 체세포배의 형성 및 재분화율이 낮게 나타났다.

체세포배의 현미경적 관찰에서 배반 및 자엽초의 형성을 확인할 수 있었다. Figs. 4와 5는 체세포배를 10 µm 두께로



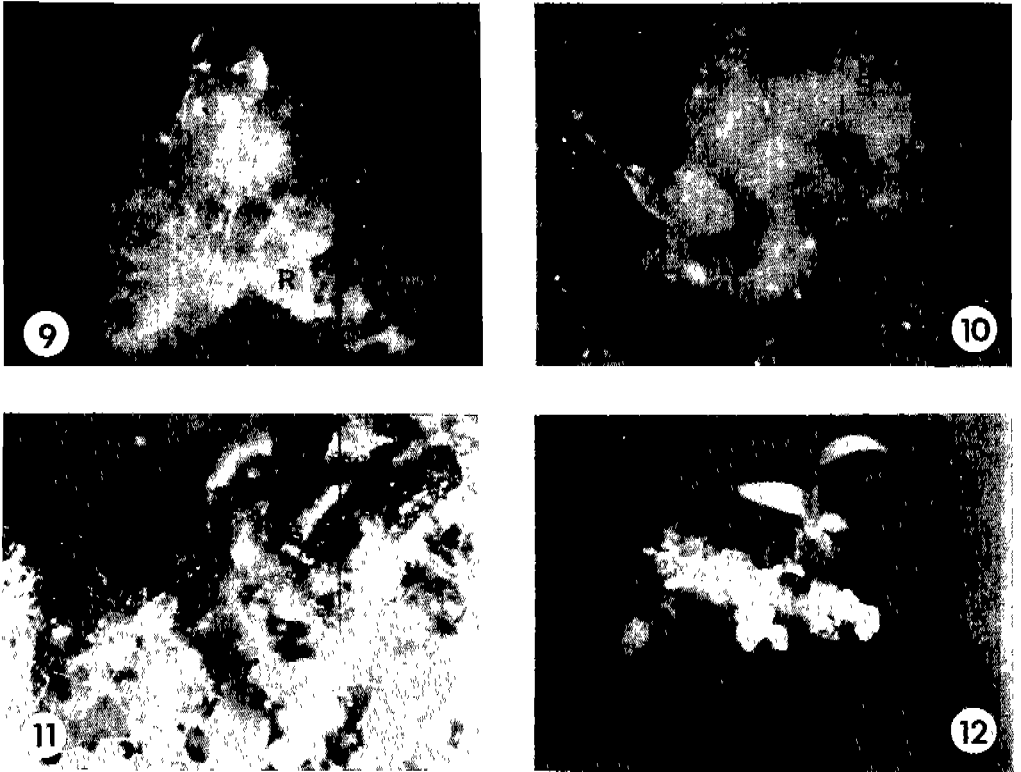


Fig. 1. Immature seeds of *Bletilla striata* excised after pollination.

Fig. 2. Embryogenic callus (EC) induced from immature seeds.

Fig. 3. Formation of somatic embryos (EM) from embryogenic callus.

Figs. 4-5. Longitudinal section of somatic embryo. Development of suspensor (SU), scutellum (SC), coleoptiles (CL) and coleorhiza (CR) from somatic embryo. ( $\times 40$ ).

Figs. 6-8. Scanning electron micrograph showing the somatic embryo formation from embryogenic callus.

Figs. 9-12. Multiple shoot and plantlet developing from somatic embryos.

형 절단하여 체세포배의 발달과정을 조사한 것으로서 배병의 형성이 나타났으며(Fig. 4), 이로부터 배반과 자엽초 및 근초의 분화가 잘 이루어짐을 관찰 할 수 있었다(Fig. 5). 또한, 주사 전자현미경적 관찰에 의해서도 배발생 칼루스에서 다양한 체세포배 형성 및 자엽초의 분화가 관찰되었으며(Figs. 6 and 7), 다수의 자엽초가 이루어짐이 관찰되었다(Fig. 8). 광학현미경적 관찰에 의해서는 어린싹의 분화가 다수 이루어지고 저번부에서는 뿌리털과 함께 뿌리의 분화가 이루어짐이 확인되었으며(Figs. 9-11), 식물체로의 분화가 잘 이루어짐이 관찰되었다(Fig. 12). 이로써 하나의 미성숙 종자로부터 다수의 배발생 칼루스를 유도시킨 다음 체세포배 발생을 거쳐 다수의 재분화 식물체를 얻을 수 있었다.

## 고 찰

일반적으로 난에서는 칼루스의 유도가 잘 되지 않으나

전괴체(protoctorm)의 유도에 관한 몇 가지 실험이 있어, *Dendrobium*에서는 5 mg/l BAP가 첨가된 RM 배지에서 전괴체가 형성된 다음 분화됨을 보았고(Kukulczanka and Wojciechowaka, 1983), *Phalaenopsis*와 *Doritaenopsis*에서는 꽃대 절간을 1 mg/l BAP가 첨가된 VW 배지에서는 전괴체의 형성률이 73.4%, 5 mg/l BAP가 첨가된 배지에서는 노랑고 흰 캘러스가 53% 유기됨을 보았으며(Lin, 1986), *Oncidium varicosum*에서는 5 mg/l NAA가 첨가된 Knudson 배지에서 배양할 경우에 칼루스 유도율이 좋았다고 하였다(Kerbaudy, 1984). 또한 Lee 등(1988, 1990)의 실험에서는 자란(*Bletilla striata*) 및 약란(*Cremastra appendiculata*)의 미성숙 종자를 배양하여 이로부터 칼루스를 유도하였는데, 이 때 Hyponex 기본배지에 2 mg/l 2,4-D와 1 mg/l kinetin을 첨가했을 경우에 칼루스 및 전괴체의 형성률이 높은 것이 확인되었다. 본 실험에서는 배발생 칼루스의 유도가 NAA 및 BAP 첨가에서 보다도 3 mg/l 2,4-D 및 1 mg/l kinetin이 첨가된 Hyponex 및 VW 배지에서 효과적이었다.

계대배양에 있어서 시간 간격 및 2,4-D의 농도는 종에 따라 다양하며 *Panicum maximum*(Lu and Vasil, 1981)과 *Pennisetum purpureum*(Wang and Vasil, 1982)에서와 같이 빨리 성장하는 경우에는 매 10-14일, 다른 종류에서는 보통 매 4주도 가능하였다. Vasil과 Vasil(1984)은 배발생 칼루스만의 단독배양이 가능하다고 하였다. 자란에서도 배양 동안 2,4-D의 농도가 저하될 경우에는 체세포배의 형성 및 재분화가 이루어지므로 이와 같은 배발생 칼루스의 유지 및 다량유도를 위해서는 배발생 칼루스 유도시 첨가되었던 농도 수준으로 일정하게 유지하면서 매 3주 간격으로 계대배양해야 하였으며, 배발생 칼루스를 따라 분리하여 배양할 필요는 없었다.

*Bahigrass*의 mature caryopse 배양에서 배발생 칼루스는 형태적으로 하얗고, 구형인 것 또는 부서지기 쉬운 것으로 구분하였으며, 2,4-D가 첨가되지 않은 배지로 옮겼을 때에는 배발생 칼루스로부터 체세포배가 발달된 후 재분화됨을 관찰하였다(Marousky and West, 1990). 당근에 있어서는 체세포배 발생의 효과는 2,4-D의 농도에 의존하여 2,4-D의 농도가 0.1 mg/l 첨가된 배지에서는 거의 100%의 체세포배가 형성되었으나 5 mg/l로 증가된 배지에서는 덩어리 모양의 세포로 된다는 보고가 있다(Borkird et al., 1986). 체세포배로부터 식물체의 재분화는 *Pennisetum purpureum*(Wang and Vasil, 1982), *P. americanum*(Vasil and Vasil, 1982a, b) 그리고 *Triticum aestivum*(Ozias-Akins and Vasil, 1982)에서 보고되었다. Cytokinin은 다수의 종에서 체세포배 발생과 식물체 분화에 중요한 요인으로 작용한다는 보고가 있으며(Evans et al., 1981), Marousky와 West(1990)는 체세포배 발생 뿐만 아니라 식물체의 재분화에 있어서 BAP가 중요한 요인이 된다고 하였으며, Hwang 등(1988)은 *Oryza sativa*에서 2,4-D를 첨가하지 않거나 첨가(0.02 mg/l)한 경우도 분화가 이루어진다고 하였다. 본 실험에서는 배발생 칼루스 유도에 있어서는 2,4-D의 농도가 중요한 요인으로 작용하였고, 배발생 칼루스 형성 후 체세포배 발생 및 재분화를 이루기 위해서는 생장 조절제가 전혀 첨가되지 않은 분화배지에서 효과적이었다. 결과적으로 종자로부터의 하나의 식물체만을 얻을 수 있음에 비하여 배발생 칼루스 유도 및 체세포배 발생을 통하여 몇 십배에 이르는 재분화 식물체를 얻을 수 있었다.

## 적 요

자란(*Bletilla striata*)의 형질전환 유도 및 다량증식에 관한 일련의 연구로서 미성숙 종자로부터 배발생 칼루스 유도와 체세포배 형성 및 재분화를 실시하였다.

전체 형성능을 갖는 배발생 세포로 된 배발생 칼루스의 형성은 3 mg/l 2,4-D와 1 mg/l kinetin이 첨가된 Hyponex 및 VW 배지에서 가장 높게 나타났다. 배발생 칼루스를 생장 조절제가 첨가되지 않은 VW 분화배지에서 배양하여 체세포배의 형성을 보았고, 형태 및 조직학적 관찰에 의

하여 체세포배 발생을 확인하여, 하나의 미성숙 종자로부터의 다수의 클론 식물체를 얻을 수 있는 가능성을 제시하였다.

## 참 고 문 헌

- Ammirato, P.V. 1983. The regulation of somatic embryo development in plant cell cultures: Suspension culture techniques and hormone requirement. *Bio/Technology* 1: 68-74.
- Bajaj, Y.P.S. 1977. Protoplasts isolation, culture and somatic hybridization. In, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer-Verlag, New York. pp. 468-496.
- Borkird, C., J.H. Choi and Z.R. Sung. 1986. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the expression of embryogenic program in carrot. *Plant Physiol.* 81: 1143-1146.
- Evans, D.A., E.R. Sharp and C.E. Flick. 1981. Growth and behavior of cell cultures. In, *Embryogenesis and organogenesis*. T.A. Thorpe (eds.). *Plant Tissue Culture*, Academic Press, New York. pp. 45-113.
- Gill, R., A. Rashid and S.C. Maheshwari. 1979. Isolation of mesophyll protoplasts of *Nicotiana rustica* and their regeneration into plants flowering *in vitro*. *Physiol. Plant.* 47: 7-10.
- Haccius, B. 1978. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. *Phytomorphology* 28: 74-81.
- Ho, W. and I.K. Vasil. 1983. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). I. The morphology and physiology of callus formation and ontogeny of somatic embryos. *Protoplasma* 118: 169-180.
- Hwang, B., M.K. Kim and I.K. Vasil. 1988. Isolation and culture of protoplasts derived from embryogenic cell suspension culture of *Oryza sativa* (rice). *Korean J. Bot.* 31: 41-49.
- Kameya, T. and H. Uchimiya. 1972. Embryoid derived from isolated protoplasts of carrot. *Planta* 103: 56-60.
- Kano, K. 1962. Studies on the media for orchid seed germination. *Mem. Fac. Agri. Kagawa Univ.* 20: 1-70.
- Kerbaui, G.B. 1984. Plant regeneration of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae) by means of tip culture. *Plant Cell Rep.* 3: 27-29.
- Kukulczanka, K. and U. Wojciechowaka. 1983. Propagation of two *Dendrobium* species by *in vitro* culture. *Acta Hort. Cult.* 131: 105-110.
- Lee, J.S., B.Hwang and Y.J. Kim. 1988. Studies on the embryo culture and protoplasts fusion of *Bletilla striata*. *Korean J. Plant Tissue Culture* 15: 181-186.
- Lee, J.S., B. Hwang and Y.J. Kim. 1990. Studies on the multiplication and induction of hybrid plant in *Cremastra appendiculata* use the embryo and tissue culture. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 5: 43-48.

- Lin, C.C. 1986. *In vitro* culture of flower stalk internodes of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis*. *Lindleyana* **1**: 158-163.
- Lu, C. and I.K. Vasil. 1981. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues of *Panicum maximum* Jacq. *Theor. Appl. Genet.* **59**: 275-280.
- Marousky, F.J. and S.H. West. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured mature caryopses of bahiagrass (*Paspalum notatum* Flugge). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **20**: 125-129.
- Ozias-Akins, P. and I.K. Vasil. 1982. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescence of *Triticum aestivum* L. (wheat): Evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma* **110**: 95-105.
- Sharp, W.R., M.R. Sondahi, L.S. Caldas and S.B. Maraffa. 1980. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Hort. Rev.* **2**: 268-310.
- Thomas, E., P.J. King and I. Potrykus. 1979. Improvement of crop plants *via* single cell *in vitro*-an assessment. *Zeit. Pflanze.* **82**: 1-30.
- Tisserat, B., E.B. Esan and T. Murashige. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hort. Rev.* **1**: 1-78.
- Vacin, E.F. and F.W. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. *Bot. Gaz.* **110**: 605-613.
- Vasil, I.K. 1983. Regeneration of plants from single cells of cereals and grasses. *In*, Genetic Engineering in Eukaryotes, P.F. Lurquin and A. Kleinhofs (eds.), Plenum, New York. pp. 233-251.
- Vasil, V. and I.K. Vasil. 1982a. The ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum ammericanum* (L), K. Schum I. *In*, Cultured Immature Embryos. *Bot. Gaz.* **143**: 454-465.
- Vasil, V. and I.K. Vasil. 1982b. Characterization of an embryogenic cell suspension culture derived from inflorescences of *Pennisetum ammericanum* (pearl millet, Gramineae). *Am. J. Bot.* **69**: 1441-1449.
- Vasil, V. and I.K. Vasil. 1984. Induction and maintenance of embryogenic callus cultures of Gramineae. *In*, Cell Culture and Somatic Genetics of Plants, Vol. 1, Academic Press, New York. pp. 36-42.
- Wang, D. and I.K. Vasil. 1982. Somatic embryogenesis and plant regeneration from inflorescence segments of *Pennisetum purpureum* Schum (Napier or Elephant grass). *Plant Sci. Lett.* **25**: 147-154.
- Williams, E.G. and G. Maheswaran. 1986. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.* **57**: 443-462. (1990. 10. 8 接受)