

미나리에서 비배발생캘러스와 배발생캘러스간의 분화능력 및 해부학적, 생화학적 특성비교

반철구* · 김병동¹

창원시설화훼시험장 육종재배실, ¹서울대학교 농업생명과학대학 원예학과

Totipotential, Morphological, Biochemical Comparisons between Nonembryogenic Callus and Embryogenic Callus in Water Dropwort (*Oenanthe stolonifera* DC)

BEEN, Chul Gu* · KIM, Byung Dong¹

Changwon Green House Floricultural Experiment Station, 523-1 Jaedong, Daesan, Changwon, Gyeongnam, 641-920, Korea: and ¹Dept. of Horti. Sci., College of Agricultural Life Sci. Seoul National University, Suwon, 441-744, Korea. *Corresponding author

The embryogenic callus (EC), from which somatic embryos could be induced, was compared with nonembryogenic callus (NE) to study the origin and features of totipotent cell in water dropwort (*Oenanthe stolonifera* DC). To induce and maintain of EC and the NE, meristematic stem and immature floret were inoculated in MS media supplemented with 1 mg/L 2,4-D, and with 2.5 mg/L NAA and 5 mg/L BA, respectively. The EC was not induced from the NE even after subculturing in MS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D. Plantlets were not regenerated from the NE in hormone-free medium. In histochemical comparison of the EC with the NE by light microscopy, the EC had smaller cells in size, dense cytoplasm, and more starch granules of cells compared to the NE cells. The cell from the EC, as observed by transmission electron microscopy, had smaller vacuoles, well developed ribosomes, mitochondria, and endoplasmic reticulum, whereas the cells from the NE had larger vacuoles and underdeveloped organelles. In protein pattern from NE, EC and Somatic embryo (SE), as analyzed by SDS polyacrylamide gel electrophoresis, different proteins specific for tissue were observed: 17 and 28 KD for NE, 50, 52, 57, 66, 68 KD for EC and 20 KD for SE. DNA polymorphism was also observed between EC and NE as analyzed by RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) method. The origin of totipotent stem cell and the relationship between irreversible genomic change arose in differentiation and the loss of totipotency in plant were discussed.

Key words: embryogenic callus, nonembryogenic callus, totipotent stem cell, water dropwort

식물세포배양 및 조직배양을 통하여 서로 다른 특성을 가진 세포 또는 캘러스 계통들을 분리할 수 있다. 그 중 비배발생 캘러스(nonembryogenic callus: NE)와 배발생캘러스(embryogenic callus: EC)는 재분화능력에 따라 구분되어진다. 배발생캘러스는 배발달을 거쳐 식물체로 분화할 수 있는 캘러스를 의미하고 비배발생캘러스는 식물체 재분화가 거의 불가능한 캘러스로 정의된다(Ammirato, 1983). 재분화가 극히 힘든 이런 세포군들은 생리적이고 일시적인 변화 때문에 전능성이 없는 것으로 나타났는지 아니면 유전적인 변화에 기인한 근본적인 전능성의 상실이 그 원인인지는 확실치 않다. 모든 식물세포는 완전한 하나의 식물체로 분

화할 수 있는 능력을 가진다는 전형성능(totipotency)이론은 식물의 세포와 조직배양을 통해 식물체를 재분화시키는 가장 중요한 기본원칙이 되어왔다(Krikorian and Berguam, 1969). 배세포든 이미 여러 기관으로 분화된 분화세포든 식물의 모든 세포는 한 식물체를 만드는 데 필요한 full set의 genome을 가지고 있으며 각각의 분화세포들이 각기 다양한 특성과 기능을 나타내는 것은 필요한 특정유전자의 선택적 발현조절에 기인한 것이라고 알려졌다. 분화조직을 조직배양할 경우 탈분화(dedifferentiation) 즉 특정유전자의 선택적 발현으로 유지되고 있던 분화특성이 해체되어 원시세포가 되고 다시 재분화(redifferentiation) 과정을 거쳐 식물체

로 분화할 수 있다는 것이다(Kimball, 1983). 최근 분자유전학적 연구결과는 모든 세포들이 동일한 DNA를 가지고 있지 않으며 특히 미분화세포와 분화세포간에는 DNA상에서 상당한 차이를 나타내고 있다는 것이 보고되었다. 그리고 분화과정중 체세포분열이 진행된 각 세포에는 genomic change에 의해 서로 다른 DNA가 전달되며 이것이 분화의 기작과 관련이 있을 수 있다는 결과들이 보고되고 있다(Halperin, 1986).

조직배양 및 세포배양시 나타나는 비배발생 캘러스들은 재분화가 가능한 세포들과의 비교분석을 통해 재분화능력 상실과 연관된 유전적 또는 생리적 변화 그리고 그들 세포의 기원과 특성을 파악하는 데 중요한 연구재료로 활용될 수 있다. 본 실험은 미나리를 재료로 재분화율이 높은 EC와 재분화능력이 없는 NE를 유기한 뒤 이들 callus line간에 재분화능력에 관한 특성과 해부학적, 생화학적 수준에서의 특징을 비교 관찰하고 재분화능력을 가진 전능모세포(stem cell)의 존재와 기원에 관해서 고찰하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 배지

미나리(*Oenanthe stolonifera* DC, water dropwort)로부터 캘러스를 유기하기 위해 사용한 기본 배지는 MS 배지(Murashige and Skoog, 1962)였고 생장점조직과 미숙 소화경을 치상하여 비교하였으며 조직은 6.5% sodium hypochlorite에 20분간 침지하여 소독한 후 멸균수로 3회 이상 씻어내고 배지에 치상하였다.

EC와 NE의 유기와 증식

EC와 NE를 유기하기 위해 MS 기본배지에 NAA (25 mg/L) + BA (5 mg/L) 또는 2,4-D (1 mg/L)를 첨가한 고체배지에서 생장점조직과 미숙 화경 조직을 각각 치상하였고 유기된 EC와 NE를 형태학적 관찰을 한 뒤 대량증식을 하기 위해 NAA (25 mg/L) + BA (5 mg/L) 또는 2,4-D (1 mg/L)를 첨가한 고체배지 또는 MS 액체배지를 사용하였으며 5일 간격으로 계대배양하였다.

재분화능력을 검정하기 위해 EC와 NE callus line을 체세포배(somatic embryo: SE) 유도가 가능한 호르몬이 들어가지 않은 MS 액체배지에 현탁배양하였다.

형태해부학적 관찰과 비교

EC와 NE의 외부형태는 해부현미경하에서 관찰하였고,

광학현미경과 투사 전자현미경으로 조직과 세포를 관찰하기 위해 캘러스 조직을 4% glutaraldehyde에 1차 고정시키고 다시 2% osmic acid에 2시간 동안 2차 고정하였으며, 아세톤 series를 거쳐 탈수시켰다. 탈수된 재료는 epon 혼합액을 써서 포매하고 60°C에서 24시간 중합시켜 plastic block을 얻어냈다. Sample을 다시 LKB ultratom V에서 glass knife를 이용 1 μm 두께로 잘라 toluidine blue로 염색하여 광학현미경 관찰에 사용하였고 전자현미경 관찰을 위해서는 다이아몬드 칼로 초박편을 만들고 2% aqueous uranylacetate에서 30분, 9.3% lead citrate로 50분간 실온에서 염색하였다.

SDS-PAGE를 이용한 단백질 패턴의 비교

EC와 NE 그리고 SE에서 단백질을 분리하기 위해 0.5g의 조직과 1 mL의 sample extraction buffer (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 0.02% bromophenol blue, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol)를 넣고 유발에서 마쇄하여 5분간 끓이고 15,000 rpm에서 10분간 원심분리한 뒤(4°C) 상등액을 취해 전기영동하였다. 전기영동은 7.5-15% polyacrylamide linear gradient gel을 만들어 30 mA에서 실시한 후 Coomassie brilliant blue로 염색하여 밴드패턴을 비교하였다.

RAPD 방법을 이용한 NE와 EC의 Genomic DNA 비교

Total DNA 분리는 Draper와 Scott (1988)의 방법을 이용하였다. 식물조직 0.5 g을 채취하여 마쇄한 후, 여기에 protease buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 8.0, 2% SDS, 0.1 mg/mL Proteinase K)를 넣고 37°C에서 2시간 반응시킨 후 phenol-chloroform extraction하여 2배의 ethanol을 넣고 원심분리하였다. 침전된 DNA는 70% ethanol로 2-3회 세척한 후 TE buffer에 녹였다. PCR에 이용한 primer는 DNA synthesizer를 이용하여 임의의 oligodeoxynucleotide primer를 다음과 같이 합성하였다: RA-1: TTATGTAAAACGACGCCA-GT(20-mer); RA-2: ACCTCGAGCACTGTCT(16-mer). RAPD를 위한 PCR 조건은 reaction mixture (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 각각 200 μM의 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP, 1 μM primer, 0.5 μg의 genomic DNA, 5 unit의 Taq polymerase)의 final volume은 50 μL이었고 반응은 94°C에서 1분, 36°C에서 1분, 72°C에서 2분간 30회 반복하였다. Amplified product는 1.2%의 agarose gel에서 전기영동하여 관찰하였다.

결과 및 고찰

미나리에서의 EC와 NE의 유기조건

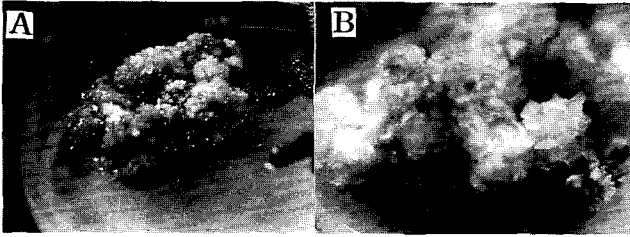


Figure 1. Morphological differences between embryogenic callus (A) and nonembryogenic callus (B).

미나리의 생장점 조직, 미숙 소화경 등을 2,4-D(1 mg/L) 또는 NAA(2.5 mg/L) + BA(5 mg/L)가 첨가된 MS 배지에 치상하여 약 1달 후 부터 발달되는 캘러스를 관찰하였다. 이때 보통 두 종류의 캘러스가 생기는데 EC는 노랗고 단단하며 표면에 둥근 돌기가 많이 발생되어 있고 서로 잘 떨어지는 특성을 보이는 반면 NE는 반투명의 흰색을 띠고 부드러우며 물기가 많고 표면이 거친 결정체 모양을 띤다 (Fig. 1). 미나리의 경우 EC는 2,4-D (1.0 mg/L)가 첨가된 배지에서 잘 유기되며 NE는 NAA (2.5 mg/L) + BA (5 mg/L)가 첨가된 배지에서 매우 잘 형성된다고 보고 되었다 (Lee, 1993). 생장점 조직과 미숙 소화경을 각각 2,4-D (1 mg/L) 처리구와 NAA (2.5 mg/L) + BA (5 mg/L) 처리구에서 배양하여 EC와 NE의 유기율을 비교 조사하였다. 생장점 조직과 미숙 소화경 공히 NAA + BA 처리구에서는 EC가 유기되지 않았고 2,4-D 처리구에서는 생장점조직에서 EC 유기율이 높았다(Table 1). 그러나 EC 유기에 따라 NE의 발생도 같이 관찰되었으며 또한 EC를 계속 계대배양하면 NE가 발생되어 같이 자라는 경우를 볼 수 있었다. 때로는 NE가 형성되고 이어서 EC가 그 가운데서 형성되는 경우도 관찰되었다. 이것은 당근의 경우 EC와 NE 형성이 캘러스가 유기되기 시작함과 동시에 이미 결정된다는 보고와 일치한다고 추정되었다. 그리고 화분과 식물의 경우에 성숙한 개체의 분화조직에서는 EC를 얻기 힘들고 오히려 NE가 잘 발생된다고 보고된 바 있으며(Narbors et al., 1982) 본 시험에서도 줄기 등 이미 분화된 조직을 치상하면 NE의 발생빈도가 높았다. 이런 결과들은 조직 또는 세포 특이성에 의해 EC와 NE 유기에 결정된다는 것을 암시한다고 볼 수 있다.

EC와 NE의 선별과 유지 및 식물체 분화

EC는 증식이 느리고 NE는 증식이 빨라 그냥 방치해 두면 NE가 빨리 자라서 캘러스 전체를 덮게 된다. 그러므로 각기 고유의 특성을 가진 캘러스 line을 고정시키고자 할 때는 치상 수 주후부터 EC와 NE를 분리해서 계대배양해야 한다. EC와 NE를 계속 계대배양하였을 때 특성유지와 증식양상을 알아보기 위해 EC와 NE를 각각 2,4-D (1 mg/L)

Table 1. Effect of growth regulators on callus induction in *O. stolonifera*.

Explant	Hormonal combination (mg/L)	No. of explant inoculated ^a	No. of explant forming EC ^b	No. of explant forming NE ^c	No response
Meristematic tissue	NAA(2.5) + BA(5)	120	102	-	18
	2,4-D(1)	120	10	95	15
Immature florets	NAA(2.5) + BA(5)	100	80	-	20
	2,4-D(1)	100	15	60	25

^aExplants were cultured in Murashige and Skoog medium.

^bEmbryogenic callus.

^cNonembryogenic callus.

Table 2. Effect of number of subculture on callus types in MS medium containing 2,4-D (1 mg/L) or NAA (2.5 mg/L) + BA (5 mg/L)^a

Callus type	Hormonal condition	No. of callus subcultured	No. of subculture											
			1		2		3		4		5		6	
			NE ^b	EC ^c	NE	EC	NE	EC	NE	EC	NE	EC	NE	EC
NE	2,4-D	100	100	-	100	-	100	-	94	-	92	-	87	1
NE	NAA + BA	100	100	-	100	-	100	-	100	-	97	-	92	-
EC	2,4-D	100	-	100	2	98	3	95	5	90	7	86	11	80
EC	NAA + BA	100	10	90	14	82	16	79	20	72	24	63	37	50

^aSubculture was conducted at 4 week intervals

^bNonembryogenic callus.

^cEmbryogenic callus.

와 NAA (2.5 mg/L)+ BA (5 mg/L)를 첨가시킨 배지에 4 주 간격으로 계대배양하였다.

NE의 경우 NAA + BA 처리구에서는 물론 2,4-D 처리구에서도 NE의 증식만 관찰되었고 EC의 경우 2,4-D 처리에서는 EC의 형성이 왕성했으나 계대배양 횟수가 많아질수록 NE의 형성률이 높아졌다(Table 2).

NE line과 EC line은 액체배지에서 현탁배양으로 대량증식이 가능한데 계대배양을 5-7일 간격으로 해주어야 유지가 가능하였다. EC를 호르몬이 첨가되지 않은 배지에 옮기면 체세포배가 형성되어 식물체 분화가 이루어지나 NE의 경우는 재분화가 이루어지지 않았다. EC 또한 계대배양을 오래하면 재분화율이 급격히 떨어지는 것으로 나타났다. 이것은 다른 식물의 경우와 일치하는 결과인데 NE는 부드럽고 투명하며 unorganized된 형태로 재분화가 극히 힘들고 가끔 뿌리형성이 유도되는 경우가 발견된다고 보고되었다(Smith and Street, 1974). 그리고 EC와 NE를 호르몬이 첨가되지 않은 MS 액체배지에 옮겨 식물체 재분화를 유도한 결과

EC에서는 정상적으로 SE 형성을 통해 유식물로 재분화가 되었지만 NE에서는 전혀 식물체 분화가 이루어지지 않았다. 이는 미나리에서 얻은 NE에서 여러 가지 호르몬 처리를 한 후에도 체세포배 유도 및 식물체 분화가 불가능했다는 다른 연구내용(Koh and Ahn, 1995)과도 일치하는 결과이다.

EC와 NE의 유기와 증식에 관한 실험내용은 다음과 같이 요약할 수 있다.

- Meristematic tissue + (MS + 2,4-D) = EC\NE
- Meristematic tissue + (MS + NAA + BA) = EC\NE
- NE + (MS + 2,4-D) = NE
- NE + (MS + NAA + BA) = NE
- EC + (MS + 2,4-D) = EC\NE
- EC + (MS + NAA + BA) = EC\NE
- EC + (MS) = SE

계대배양을 통해 고정된 EC와 NE는 유기와 증식에 있어서 상당한 차이를 보여주고 있으며 NE의 분화능력의 상실은 이들 세포의 기원과 분화능력사이에 어떤 관련성이 있다는 것을 암시한다고 볼 수 있다.

EC와 NE의 조직해부학적 비교

EC와 NE를 세포수준에서의 차이와 특성을 비교하기 위해 plastic embedding을 통해 1 μm 두께의 박편을 만들어 광학현미경으로 관찰하였다(Fig. 2). EC는 NE에 비해 세포질이 농밀하게 차 있었고 세포 크기도 작고 조밀한 모양을 나타냈으며 세포내에 다수의 전분립이 축적되어 있다.

NE는 세포배열이 양성하고 세포가 크며 전분립 축적이 없었다. EC와 NE의 이러한 차이는 각 캘러스 유형이 가지는 재분화능력과 밀접한 관계가 있을 것으로 추정되었다. 식물체 재분화 과정에 고에너지가 필요하므로 세포내에 축적된 전분이 재분화에 요구되는 에너지원으로 쓰여서 EC의 재분화능력을 향상시키는 요인으로 해석되었다

한편 투사 전자현미경으로 EC와 NE 세포들의 미세구조를 관찰하였다. NE의 경우 세포질의 80% 이상이 거대한 액포에 의해서 점유되어 있었고 세포질은 세포막을 따라서 peripheral cytoplasm을 이루고 있었다(Fig. 3). 한편 SE 세포에서는 세포질이 농밀하고 핵이 크며 amyloplast, 인지질체 및 다른 세포 소기관이 잘 발달되어 있는 것으로 나타났는데 이는 미나리의 체세포배를 투사 전자현미경으로 관찰한 다른 보고의 결과(Koh and Ahn, 1995)와 일치하는 것으로 나타났다.

SDS-PAGE에 의한 단백질 패턴의 비교

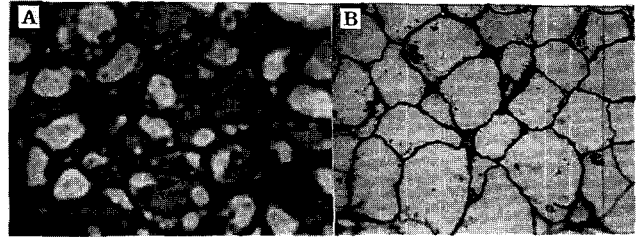


Figure 2. Histochemical differences between embryogenic callus and nonembryogenic callus observed by light microscopy. A. Embryogenic callus (X 1000). B. Nonembryogenic callus (X 800).

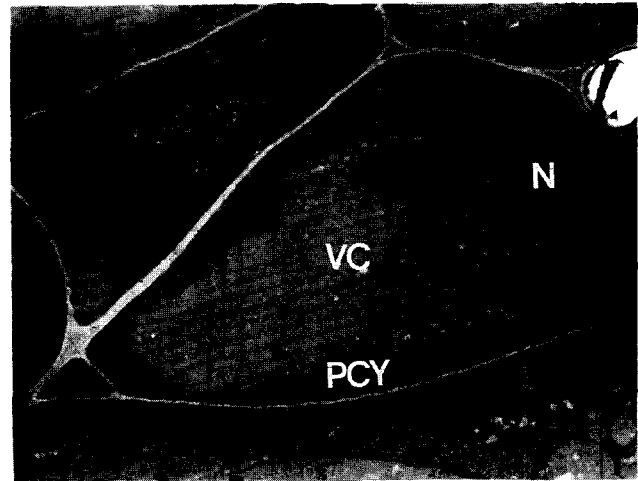


Figure 3. Electronmicrograph of nonembryogenic cells. A central vacuole occupies most of the cytoplasm. VC: vacuoles, PCY: peripheral cytoplasm, N: nucleolus (X 3,200).

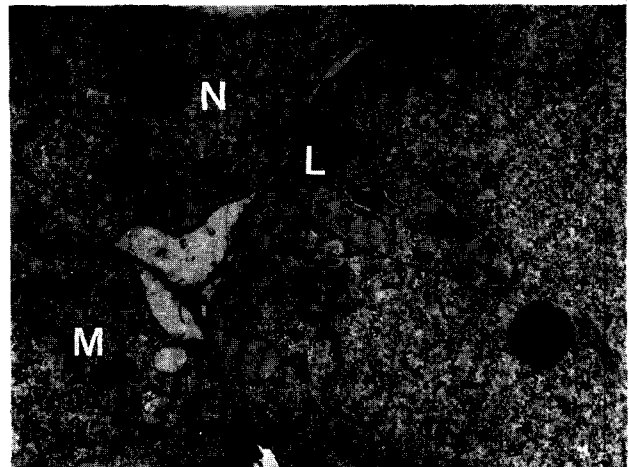


Figure 4. Electronmicrographs of embryogenic cells. Presence of mitochondria, lipid droplets, endoplasmic reticulum and ribosomes is remarkable. M: mitochondria, ER: endoplasmic reticulum, L: lipid droplets, N: nucleolus (X 4,300).

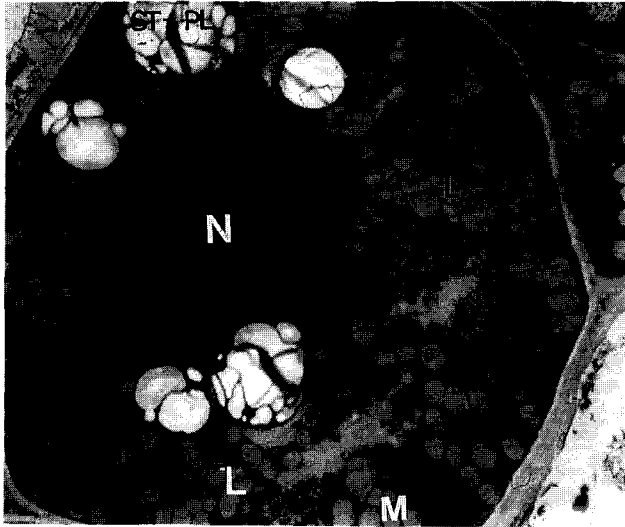


Figure 5. Electronmicrograph of globular type of somatic embryo. Presence of numerous lipid droplets and starch-containing plastid is remarkable. ST-PL: starch containing plastid, M: mitochondria, L: lipid droplets, N: nucleolus (X 3,200).

조직배양으로 유기, 증식된 EC, NE 및 SE로부터 준비된 단백질 시료를 8-14% polyacrylamide gradient gel로 전기영동하여 Coomassie brilliant blue로 염색한 결과 NE, EC, SE 순으로 단백질 밴드 숫자가 증가함에 전기영동상에서 나타났다(Fig. 6). 이는 발생과 분화과정이 진행됨에 따라 그 기능을 달리하는 효소를 포함한 새로운 단백질이 만들어진다는 것을 의미한다고 볼 수 있다. 단백질 패턴의 비교에서 NE에서는 17 KD와 26 KD의 단백질 밴드가, EC에서는 50 KD, 52 KD, 57 KD, 66 KD, 및 68 KD의 단백질 밴드가 특이적으로 나타났다. 또한 SE의 단백질 패턴에서도 NE와 EC에서는 볼 수 없는 약 20 KD의 한 밴드를 비롯하여 몇 개의 크고 작은 밴드들이 구별이 될 정도로 나타났다. 그리고 SE와 EC에 공통적으로 나타나는 밴드의 경우에도 EC와 비교해서 더 진하게 나타나는 것과 희미해지는 것들이 있었으며 EC에 있던 일부의 밴드가 SE에서는 없어지는 것도 관찰되었다. 또한 17 KD의 단백질은 EC에서는 관찰되지 않았으나 NE와 SE에서는 공통으로 나타났다. Choi 등(1987)은 당근의 체세포배 발생시 나타나는 20 KD, 66 KD, 68 KD의 단백질들은 체세포배 형성과정에 요구되는 필수적인 단백질로 추정할 바 있다.

Kim 등(1992)은 미나리의 NE, EC, SE 간의 단백질 패턴 비교에서 본 실험에서는 관찰되지 않은 다수의 NE, EC, SE specific 단백질 밴드가 나타나는 것으로 보고한 바 있다. 또한 EC와 NE간 isozyme pattern 비교에서 NE specific esterase가 존재하는 것으로 보고되었다(Chibbar et al., 1989). NE와 EC 그리고 체세포배에서 나타나는 단백질의 패턴 차이를 고려해 볼 때 이들 간의 유전자 발현은 물론 생리 생화학적 특성이 매우 다른 것으로 추정된다.

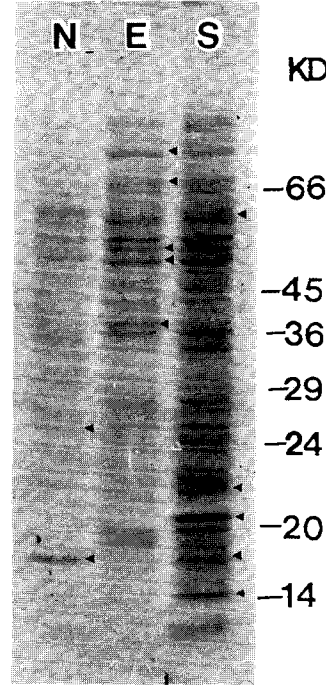


Figure 6. Comparison of protein patterns in SDS-PAGE stained with Coomassie brilliant blue. N: non embryogenic callus, E: embryogenic callus, S: somatic embryo. Arrows indicate specific bands.

RAPD 기술을 이용한 EC와 NE 간의 DNA 비교

NE와 EC의 genomic DNA level에서의 변화를 알아보기 위해 arbitrary primer를 사용하는 RAPD방법과 PCR 기술을 이용하여 DNA polymorphism을 관찰하고자 하였다. PCR에 이용된 primer는 7개였으며 재현성을 높이기 위해 15mer 이상되는 길이의 primer 합성하여 사용하였다. 이중 primer RA-1(20-mer)와 RA-2(16-mer)를 사용한 경우에 EC와 NE의 DNA상에서 polymorphism이 나타났다(Fig. 7). 최근 클라디올라스의 기관분화가 가능한 캘러스와 기관분화능을 상실한 캘러스간에 AFLP 분석을 한 결과 각 각의 캘러스에서 상당수의 specific한 DNA 밴드가 나타나는 것으로

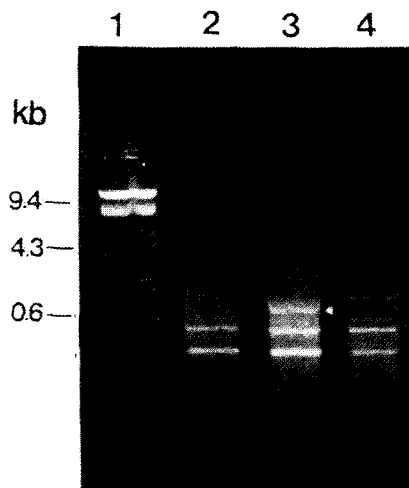


Figure 7. Polymorphism of genomic DNAs from embryogenic callus, nonembryogenic callus, and shoot by PCR with an arbitrary primer (16-mer). Lane 1: λ -Hind III size marker, Lane 2: non-embryogenic callus, Lane 3: embryogenic callus, Lane 4: leaf. Arrow indicates specific band.

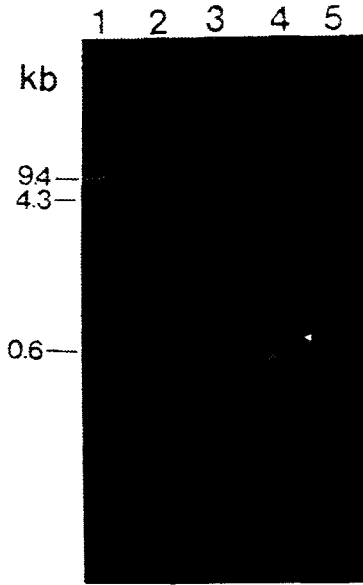


Figure 8. Polymorphisms of genomic DNAs from different tissues by PCR with an arbitrary primer (20-mer). Lane 1: λ -Hind III size marker, Lane 2: non-embryogenic callus, Lane 3: embryogenic callus, Lane 4: shoot, Lane 5: root. Arrow indicates specific band.

보고되었다(Choi et al., 1996). 또한 당근에서 얻은 NE와 EC에서 flow cytometer로 cell ploidy를 조사한 결과 NE에서 비정상적인 ploidy가 상당한 많이 관찰되었다고 보고된 바 있다(Lotus-Thevnot et al., 1990). 이상의 결과들은 NE의 전능성상실과 genomic change의 관련성이 있다는 것을 암시한다고 할 수 있다.

그리고 EC와 NE, 잎과 뿌리의 DNA간의 비교도 행하였는데 RA-1 primer에서 polymorphism이 나타났으며 shoot와 EC DNA의 패턴은 비슷하였으나 NE와는 다소 다르게 나타났다(Fig. 8). 이런 DNA상의 변화는 somaclonal variation에 기인된 결과일 가능성이 있으나 분화과정에서 일어나는 genomic change가 원인일 수도 있다고 사료된다.

최근 미분화 세포조직과 분화세포조직간에 DNA상에서 큰 차이를 나타내고 있다는 정보가 축적되고 있다. 렌드로비움의 잎에서 heterochromatin 부분이 급속하게 소실되는 것이 관찰되었고(Nagl, 1983), 완전히 성숙한 귀리의 잎세포에 존재하는 핵 DNA 농도는 2C에 못미치며 2C 수준에 있는 세포들과의 비교에서 약 14.7%의 DNA 소실이 있음이 보고되었다(Hesemann and Schroder, 1982). 그리고 담배에서 화아를 만드는 윗부분 마디조직의 DNA량이 엽아를 만드는 아래 마디조직의 DNA량과의 비교에서 약 10배 이상 차이가 나는 것으로 알려졌다(Wardell and Skoog, 1973). 또한 discontinuous DNA replication, G₂ phase에서 염색체로부터 DNA excision 과정이 완두 뿌리 조직의 분화와 관련있다는 보고(Vant Hof et al., 1986)가 있으며, 이런 분화과정상의 genomic change는 irreversible genomic change이며 이것이 세포의 분화능력과 관련성이 있는 것으로 해석할 수 있다고 추정하였다(Halperin, 1986). 모든 식물세포가 완전한 식물체를 분화할 수 있다는 종래의 전능성 이론에 의문을 제시하

고 튜니카 II 층(Tunica II Layer)에 존재하는 특정세포군만이 전능성을 가진다는 제안이 보고된 바 있다(Been CG, 1993). 즉 왕성한 분열세포가 자리하며 발생해부학적으로 매우 중요한 튜니카 II 층에 존재하는 이들 세포들은 똑같은 genome을 딸세포에 전달하는 세포분열을 통해 전능성세포를 존속시켜나가는 동시에 분화과정 중 다양한 분화관련 신호를 받아 genomic change가 수반되는 또 다른 세포분열을 통해 다양한 분화세포를 만들어 낸다는 것이다. 그러므로 이들 분화세포들은 극심한 genomic change가 일어나는 경우에 전능성을 상실하며 식물체의 재분화가 어렵다고 추정하였다. 이는 동물에서와 같이 전능성모세포가 식물에도 존재함을 주장하는 것이라 볼 수 있는 데 앞으로 이 분야에 보다 심도있고 직접적인 증거를 제시할 수 있는 실험의 수행이 요구된다고 사료된다.

인용문헌

- Ammirato PV** (1983) Embryogenesis. In DA Evans, WR sharp, PV Ammirato, Y Yamado, eds, Handbook of Plant Cell Culture, Vol 1, Macmillan Pub Co, New York, pp 82-123
- Been CG** (1993) The Future of the Plant Developmental Engineering. Ed 1, Seowon Press, Seoul, pp 68-73
- Chibbar RN, Polowick PL, Newsted WJ, Hyluk JS, Georges F** (1989) Identification and isolation of a unique esterase from the medium of nonembryogenic cell line of cultured carrot cells. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 18: 47-53
- Choi JD, Suh SK, Kim KW** (1996) Selection of organogenic specific gene markers from gladiolus callus by using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Korea Soc Hort Sci Abstracts* 14: 672-673
- Choi, JH, Liu L, Borkird C, Sung ZR** (1987). The cloning of genes developmentally regulated during plant embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 1906-1910
- Draper J, Scott S** (1988) The isolation of plant nucleic acids. In J. Draper, S. Scot. P. Armitage, and R. Walden, eds, *Plant Genetic Transformation and Gene Expression*, Blackwell, Oxford, pp 355-360
- Halperin W** (1986) Attainment and Retention of Morphogenetic capacity *in vitro*. In IK Vasil, ed, *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plant*, vol 3, Academic Press, New York, pp 3-37
- Halperin W, Jensen WA** (1967) Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures. *J Ultrastruct Res* 18: 428-443
- Hesemann CU, Schr der G** (1982) Loss of nuclear DNA in leaves of rye. *Theor Appl Genet* 62: 325-328
- Kim SY, Cho RY, Son WY** (1992) Protein analysis and structural aspects somatic embryogenesis in *Oenanthе javanica*. *Korea J Plant Tissue Culture* 1: 23-28
- Kimball JW** (1983) *Biology*. Ed 5. Addison Wesley Press. Massachusetts.

pp 352-365

- Klar AJS** (1987) Differentiated parental DNA strand confer developmental asymmetry on daughter cells in fission yeast. *Nature* **326**: 466-470
- Koh GC, Ahn CS** (1995) Production and developmental pattern of embryogenic callus in *Oenanthe javanica* (BL) DC. *Korea J Plant Tissue Culture* **22**: 283-289
- Koh GC, Ahn CS** (1995) Anatomical observation of somatic embryogenesis in *Oenanthe javanica* (BL) DC. *Korea J Plant Tissue Culture* **22**: 323-327
- Krikorian AD, Bergum DL** (1969) Plant Cell and Tissue Culture: Role of Harberlandt. *Bot Rev* **31**: 59-88
- Lee GW** (1993) Development of mass production system by somatic embryos in *Oenanthe stolonifera* DC. *J Korea Soc Hort Sci* **34**: 99-107
- Loutos-Thevnot P, Jouanneau JP, Brown S, Peitard V, Guerm V** (1990) Embryogenic and non-embryogenic cell lines of *Daucus carota* cloned from meristematic cell clusters relation with cell ploidy determined by flow cytometry. *Plant Cell Reports* **8**: 605-608.
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plantarum* **15**: 473-479
- Nabors MW, Kroskey CS, McHugh DM** (1982) Green spots are predictors of high callus growth rates and shoot formation in normal and in salt stressed tissue culture of oat. *Z Pflanzenphysiol* **105**: 341-345
- Nagl W** (1983) Heterochromatin elimination in the *Orchid dendrobium*. *Protoplasm* **118**: 234-237
- Smith SM, Street HE** (1974) The decline of embryogenic potential as callus suspension cultures of carrot (*Daucus acrota* L.) are serially subcultured. *Ann Bot* **38**: 223-241
- Vant Hof J, Bjerknæs CA, Lamm SS** (1986) Meristematic precursors of vascular parenchima differentiate from G₂ phase after replicating DNA discontinuously. *Am J Bot* **73**: 87-95
- Wardell WL, Skoog F** (1973) Flower formation in excised tobacco stem segments. III. DNA content in stem tissue of vegetative and flowering tobacco plant. *Plant Physiol* **52**: 254-220

(1997년 5월 13일 접수)