

다래(*Actinidia arguta*)의 절간절편체로부터 식물체 재분화 및 해부학적 관찰

김희경 · 김준철* · 진창덕
강원대학교 생물학과

Plant Regeneration from Internode Explants of *Actinidia arguta* and its Histological Observation

KIM, Hoi Kyong · KIM, Joon Chul* · JIN, Chang-Duck

Department of Biology, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea. *Corresponding author.

Effects of plant growth regulators and light condition on shoot induction from internode explants of *Actinidia arguta* were investigated. Optimal condition for shoot induction was obtained when internode explants were cultured on MS medium containing 3.0 mg/L zeatin. The frequency showed about 62.5% under dark condition at 27° C after 6 weeks of culture. Regenerated shoots were rooted on WPM medium supplemented with 0.5 mg/L NAA and the regenerants were acclimated to an artificial soil with mixture (perlite : vermiculite = 1 : 1, v/v) for further growth and successfully transplanted to the soil in a highly humidified greenhouse. Histological observations revealed that meristemoids were formed from small and isodiametric cells, and then developed to shoot primordia.

Key words : meristemoids, regenerated shoots, zeatin

다래(*Actinidia arguta*)는 지리적으로 한국, 일본, 중국 등에 분포하는 다년생 낙엽활엽만경식물(落葉潤葉蔓莖植物)로 꽃은 6 ~ 7월에 개화하며 10월에 열매가 성숙하는 자웅이주(雌雄異株)의 식물이다. 다래는 내한성이 강하여 우리나라 전역에서 생육이 가능할 뿐만 아니라 이들의 덩굴성을 이용하여 정원이나 공원의 휴식공간에 조경수로도 많이 식재되고 있다. 또한 다래의 열매는 줄기와 함께 약용으로 쓰일 뿐만 아니라 그 맛이 달콤하고 비타민 C의 함량이 높아 많은 사람들이 즐겨 먹으나 과실이 작은 것이 단점이다. 따라서 자생종 다래의 결점인 소과성(小果性)만 개량된다면 우수한 재배종 과수로 이용될 가능성이 높을 것으로 생각된다.

최근 임목의 조직배양 기술은 육종의 새로운 방법으로, 이를 이용한 우량 임목의 대량증식(Monett, 1986; Piagnani et al., 1988), *Agrobacterium*을 이용한 형질전환(Chiyomi et al., 1991), 원형질체 융합에 의한 체세포 잡종체의 창출(Grosser et al., 1988a; Grosser et al., 1988b) 등과 같은 여러 분야에서 많은 연구가 이루어지고 있다. 그러나 이러한 생물공학적 방법을 형질개량에 응용하기 위해서는 선결조건

으로 목적식물의 callus 및 절편배양 등을 통한 식물체재분화 기법이 확립되어야만 하나 현재까지 다래(*A. arguta*)에 대한 조직배양 연구는 거의 전무한 상태로 shoot의 재분화율이 저조할 뿐만 아니라 완전한 식물체를 얻는 것이 매우 힘든 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 다래의 형질개량에 여러 생물공학적 방법을 응용하기 위한 기초자료로 활용하고자 in vitro에서 다래의 절간조직을 절편체로 하여 이로부터 완전한 식물체를 재분화시킬 수 있는 실험체계의 확립과 shoot가 형성되는 과정을 해부학적으로 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에서는 산림청 산하 임목육종연구소로부터 분양 받은 다래(*Actinidia arguta*)를 식물체재료로 사용하였다. 야외에서 성장하고 있는 건강한 다래로부터 잎이 완전히 전개

되기 전 경정유래의 유묘를 3 ~ 5 cm 정도 절취하여 먼저 잎을 제거한 다음 수도물에 깨끗이 씻은 뒤 1 ~ 2%의 Tween 80이 포함되어 있는 500 mL Erlenmeyer flask에 넣고 10 ~ 20분간 진탕소독한 다음 흐르는 수도물에 2시간 동안 담가두었다. 그 후 유묘를 무균대에서 70% ethyl alcohol에 수초간 처리한 후 2% sodium hypochlorite (NaOCl) 용액에 10분 동안 침지한 다음 최종적으로 0.1% HgCl₂에서 30초간 표면살균하였으며 각 단계마다 멸균수로 3회 수세하였다. 표면소독한 다래 유묘는 줄기에 1 ~ 2개의 마디(節)가 포함되도록 2 ~ 3 cm로 절취한 다음 0.2 mg/L의 BAP가 함유되어 있는 WPM 배지(Lloyd and McCown, 1980)에 치상한 후 27°C, 연속 광조건(21.5 μE · m⁻² · sec⁻¹)에서 배양하여 마디로부터 액아(axillary bud) 형성을 유도하였다. 유도된 액아는 두달을 주기로 동일조건의 배지에서 계대배양을 통해 증식, 유지시켰으며 이로부터 shoot 유도를 위한 배양재료를 채취하였다.

절간절편체의 배양에 의한 shoot 형성

기내에서 6 ~ 8주 정도 성장중인 다래로부터 5 ~ 7 mm 크기로 절단한 절간조직을 shoot 유도를 위한 조직절편체로 사용하였다. Shoot 유도는 MS(Murashige and Skoog, 1962) 배지를 기본으로하여 0.1 ~ 3.0 mg/L zeatin 단독처리 및 1.0 mg/L zeatin에 NAA와 BAP의 농도별 조합처리에서 시행하였으며 배양조직의 치상 개체수는 처리구당 16개체씩 4반복으로 하였고 배양은 27°C가 유지되는 배양실에서 연속 광조건과 암조건으로 구분하여 시행하였다. 식물생장조절제와 광조건에 따른 shoot 형성률은 배양 6주 후 치상한 절편체당 shoot가 형성된 절편체의 수를 조사하여 비교·분석하였다. 본 실험에 사용된 배지는 특별한 언급이 없는 한 MS 기본배지에 3% sucrose와 0.3% gelrite를 첨가하여 사용하였고 pH는 5.8로 조정하였다.

기내발근 및 토양활착

재분화된 식물체중 4 ~ 5 cm 크기의 양호한 개체를 선별하여 0.5 ~ 4.0 mg/L의 NAA가 포함되어 있는 MS 배지와 WPM 배지(Lloyd and McCown, 1980)에 배양하여 기내 발근을 유도하였다. 이때 배양은 21.5 μE · m⁻² · sec⁻¹ 광도의 fluorescent lamp의 연속 광조건에서 수행하였으며 발근정도는 배양 4주 후 배지종류와 NAA 농도에 따라 유도된 뿌리의 수와 길이(5 mm 이상)를 조사함으로써 비교하였다. 기내에서 줄기와 뿌리가 균형있게 발달한 재분화 식물체는 토양활착을 위해 뿌리를 배지로부터 분리한 다음 상처가 나지 않도록 수도물에 수세한 뒤 vermiculite와 perlite가 동량 혼합된 인공토에서 순화시킨다음, 일반토양에 이식하여 지속적인 성장을 유도하였다.

조직학적 관찰

Shoot 형성에 따른 조직의 변화를 관찰하기 위하여 3.0 mg/L의 zeatin이 첨가된 MS 배지에서 일정한 간격을 두고 배양한 다래의 절간조직을 각각 취하여 FAA(formalin:acetic acid:alcohol = 1:1:18, v/v/v)에 고정하였다. 고정된 재료는 농도별로 alcohol series에 담가 단계적인 탈수과정을 거친다음, tert-butyl alcohol에 담가 clearing한 후 paraplast와 tert-butyl alcohol이 1:3, 1:1, 3:1(v/v)로 혼합된 용액에 각각 3시간 동안 매몰시킨 다음 100% paraplast에 3시간씩 2번 매몰시켰다. 이렇게 준비한 식물재료는 Bright 5030 microtome을 이용하여 10 μm 두께로 절단한 다음 Safranin-Fast Green으로 이중염색한 후 광학현미경으로 관찰, 촬영하였다.

결과 및 고찰

절간절편체의 배양에 의한 shoot 형성

다래의 절간조직을 절편체로하여 식물생장조절제의 종류와 광조건에 따른 shoot 형성률을 비교·조사한 결과, 절간절편체를 연속 광조건에서 배양한 경우는 어떤 처리구에서도 shoot가 형성되지 않고 조직이 갈변, 고사하는 것으로 나타났다. 이에 반해 27°C가 유지되는 항온실에서 절간절편체를 암배양한 경우는 식물생장조절제의 구성에 따라 서로다른 분화양상을 나타내었다. 1.0 mg/L zeatin에 NAA와 BAP를 조합한 처리구에서는 모두 callus와 함께 뿌리만 형성되어 shoot 유도에는 부적합한 조건으로 나타났으나 zeatin이 단독처리된 배지에 배양하였을 때에는 모든 처리구에서 shoot가 분화되었으며 shoot 형성률은 zeatin의 농도가 높아질수록 증가하여 3.0 mg/L의 zeatin이 첨가된 배지에서 62.5%의 높은 shoot 형성률을 나타내었다(Table 1). 이상의 결과를 종합하여 볼 때 다래로부터 shoot를 유도하는 데에는

Table 1. The frequency of shoot formation from internode explants in *A. arguta* on MS medium supplemented with various plant growth regulators after 6 weeks of culture under dark condition.

Plant growth regulators (mg/L)			Frequency (%) ^a
NAA	BAP	zeatin	
0.1	1.0	1.0	0
0.5	2.0	1.0	0
0	0	0.1	16.7
0	0	0.5	1.3
0	0	1.0	37.5
0	0	2.0	43.8
0	0	3.0	62.5

^aThe values represent the mean of at least 4 independent experiments.

절간절편체를 zeatin이 고농도로 단독처리된 배지에서 암배양하는 것이 가장 효과적인 것으로 나타났다. 기내배양을 통한 식물체의 분화는 배양에 이용되는 조직 절편체의 종류에 따라서 그 능력에 차이가 있을 뿐만 아니라 배지의 조성, 배양조건 및 방법에 따라서도 그 분화양상이 다른 것으로 알려져 있는데(Bansal and Pandey, 1993) 다래의 경우도 식물생장조절제의 종류 및 광조건에 따라 분화양상이 크게 상이하였다.

다래의 절간절편체를 zeatin 단독처리구에 암배양하였을 때 shoot가 분화되는 양상을 살펴보면, 배양한지 1주가 경과되면서부터 절편의 절단면으로부터 유백색의 단단한 callus가 유도되기 시작하면서 배양 3주 후에는 장차 shoot로 발달될 shoot primordia가 형성되기 시작하였다(Figure 1A). 절간절편체로부터 유도된 shoot는 배양이 진전됨에 따라 지속적으로 성장하여(Figure 1B & 1C) 배양 6주 후에는 3 cm 이상 성장한 shoot의 모습을 관찰할 수 있었다(Figure 1D). Shoot는 주로 절편체의 절단면으로부터 callus의 형성과 동시에 분화되어 나왔는데, 이는 상처가 주변의 세포에 영향을 주어 shoot 형성이 활발하게 일어나도록 유도한 것으로 보인다. 일반적으로 상처를 받은 부위는 내재 auxin이나 ethylene의 농도가 증가한다는 보고가 있으며(Moncousin et al.,

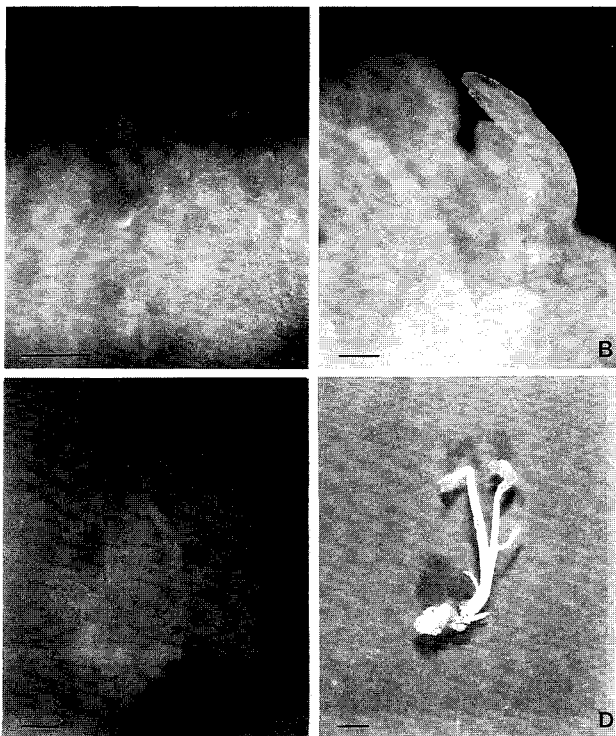


Figure 1. Shoot regeneration from internode explants of *A. arguta*. A, Shoot primordia were formed on MS medium containing 3.0 mg/L zeatin under dark condition at 27°C; B, Shoot initiation; C, Shoot development; D, Regenerated shoots after 6 weeks of culture. Bars indicate 1 mm in A, B and C, and 5 mm in D.

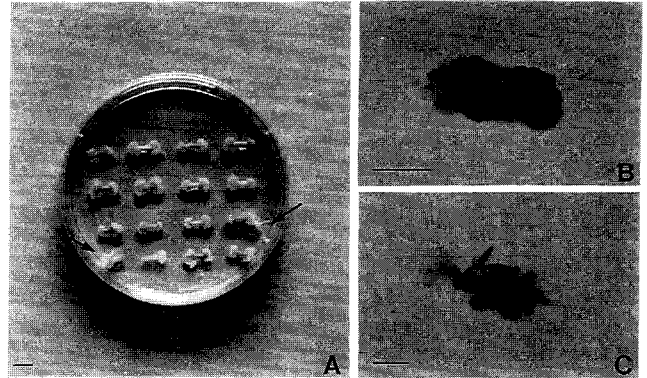


Figure 2. Reddish callus induction and regenerated shoots of *A. arguta*. A, Compact cream-colored calli and shoots(→) were induced from internode explants on MS medium supplemented with 3.0 mg/L zeatin under dark condition; B and C, Reddish calli and shoots were formed when 6 week-dark cultured calli were transferred to continuous illumination. Bars indicate 5 mm.

1989), 이러한 변화가 외부에서 첨가한 식물생장조절제와의 상호작용을 통해 shoot 형성을 유도한 것으로 추정된다.

6주간 암조건에서 배양된 크림빛의 callus와 shoot (Figure 2A)는 지속적인 성장을 위하여 절간절편체와 함께 광조건으로 옮겨 배양한 결과, 배양한지 3일이 경과되면서부터 callus에 적색 색소가 형성되는 것이 관찰되었다(Figure 2B & 2C). 다래와 같은 屬에 속하는 양다래(*A. chinensis*)에서도 shoot가 형성되기 전의 callus에 적색 색소가 축적된 세포들이 형성된다고 보고되었는데(Barbieri and Morini, 1987), 다래에서도 callus에 적색 색소가 형성되는 현상이 shoot 분화와 관련이 있는 것으로 보여진다.

기내발근과 토양활착

일반적으로 기내에서 발근을 유도하는 데는 배지의 종류와 배지에 첨가하는 식물생장조절제 중 auxin의 종류가 중요한 요인으로 작용하는 것으로 알려져 있다(Mohammed and Vidaver, 1990, Kim and Lee, 1996). *Actinidia* 屬의 기내 배양에서 발근에 효과적이라고 알려진 auxin중 NAA를 MS 배지와 WPM 배지에 농도별로 처리하여 유도된 뿌리의 수를 살펴본 결과, MS 배지인 경우 0.5 mg/L NAA에서 평균 10개로, 그리고 WPM 배지는 0.5 mg/L NAA에서 평균 13개로 가장 효과적이었으며 배지간 비교에 있어서는 4.0 mg/L NAA 처리구를 제외하고는 WPM 배지가 MS 배지에 비하여 전반적으로 뿌리의 발생수가 많은 것으로 나타났다(Figure 3A). 뿌리의 길이에 있어서는 MS 배지인 경우 0.5 mg/L NAA에서 평균 1.37 cm, 그리고 WPM 배지는 0.5 mg/L NAA에서 평균 2.14 cm로 가장 생장이 좋게 나타났으며 배지간 차이에 있어서는 WPM 배지가 상대적으로 뿌리의 발생길이가 긴 것으로 나타났다(Figure 3B). 이와같이 배

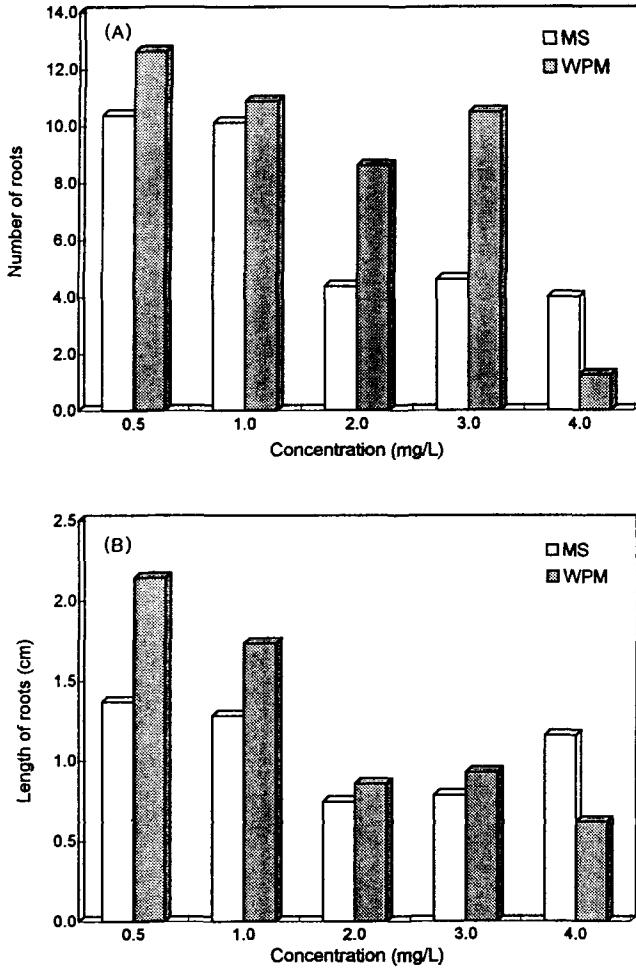


Figure 3. Effects of concentration of NAA and media on the number (A) and length (B) of roots from the regenerated shoots of *A. arguta* after 4 weeks of culture.

지의 종류에 따라 뿌리 유도나 성장에서 차이가 발생한 결과는 질소화합물의 농도가 높을수록 뿌리의 형성이 저하된다는 보고와 일치하는 것으로(Haissig, 1974; Eggens and Wright, 1985) 기내 뿌리의 발생수와 생장의 차이는 배지 구성물질 중 질소원 함량차이에 기인된 것으로 생각된다. 실제로 본 실험에 사용한 두 배지간의 질소성분을 비교해 보면 MS 배지는 WPM 배지에 비하여 질소의 함량이 매우 높았으며 MS 배지는 암모니아태 질소(NH₄⁺-N)와 질산태 질소(NO₃⁻-N)를 합해 60 mM의 질소를 포함하나 WPM 배지는 10 mM을 포함하여 많은 차이를 보여주고 있다. NAA 농도에 따른 발근 및 뿌리 생육에 미치는 영향을 살펴본 결과, NAA의 농도가 낮을수록 뿌리 유도에 효과적이었으나 NAA를 고농도로 처리한 경우에는 줄기 기부에 발육이 미약한 뿌리와 함께 다량의 callus가 형성되어 발근에 부적합한 조건으로 나타났다. 이처럼 NAA의 농도가 높을수록 뿌리의 수와 길이에 있어 두 배지 모두 저조한 결과를 나타낸 것에 대해 Thomas (1989)는 높은 농도의 auxin이 뿌

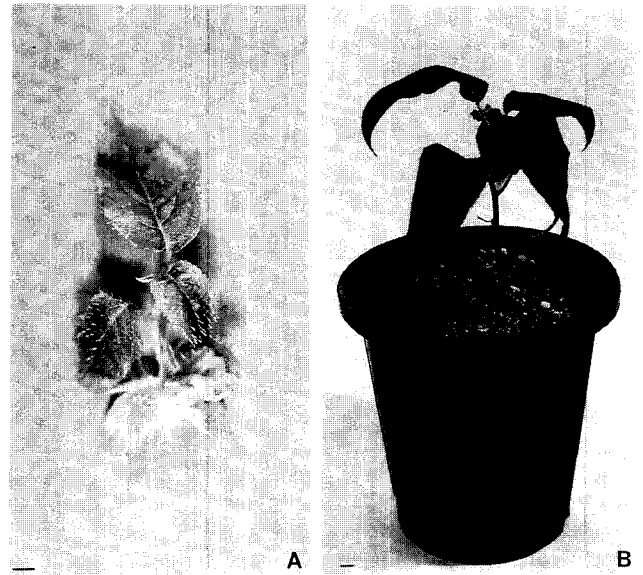


Figure 4. Plant regenerated from internode explants of *A. arguta*. A, *In vitro* root development from the regenerated shoots on WPM medium supplemented with 0.5 mg/L NAA after 4 weeks of culture: B, Two-month-old plant in pot. Bars indicate 5 mm.

리조직에서 ethylene 합성을 증가시켜 뿌리의 발육을 억제시킨다고 보고한 바 있어 이러한 현상이 다래의 조직으로부터 유도된 shoot의 발근에 영향을 미친 것으로 생각된다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 재분화된 shoot로부터 뿌리를 유도하는데 있어 배지간에는 WPM 배지가 MS 배지에 비하여 효과적이었으며 NAA의 첨가효과는 저농도일수록 적합한 것으로 나타났다.

0.5 mg/L NAA가 처리된 WPM 배지에 4주간 배양하여 뿌리가 유도된 식물체(Figure 4A)는 순화과정을 거친 후 일 반토양에 이식하여 온실에서 8주간 생육시킨 결과, 완전히 재분화된 식물체를 얻을 수 있었으며 100%의 토양 활착율을 나타내었다(Figure 4B). 임목의 조직배양에서 가장 큰 문제점은 발근이 쉽지 않을 뿐만 아니라 순화가 용이하지 않다는 점이다(Sankara Rao, 1988). 다래에서 재분화된 식물체를 토양에 완전히 활착시킬 수 있었던 이유는 발근에 효과적인 NAA를 처리함으로써 이미 기내에서 많은 뿌리를 발생시켰고, 순화용도가 통기성 및 보수력이 양호하기 때문인 것으로 사료된다.

조직학적 관찰

다래의 절간절편체를 일정한 간격을 두고 shoot 유도배지에 배양한 후 paraffin 포매방법을 이용하여 shoot가 형성되는 발생과정을 발달단계별로 조직학적인 측면에서 관찰하였다. Shoot 유도배지에서 2주동안 배양한 조직을 관찰한 결과, shoot로 발달할 시원세포(initial cell)의 집단은 형성되

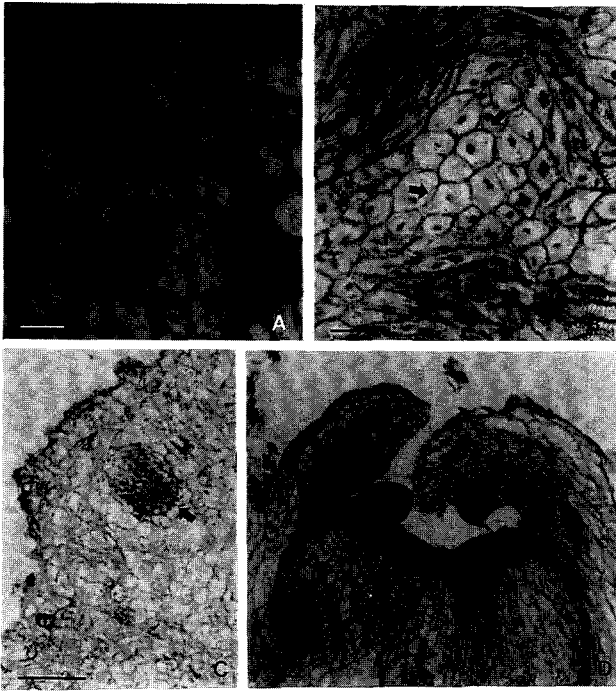


Figure 5. Histological observation of shoot forming tissue from internode explants cultured on MS medium containing 3.0 mg/L zeatin. A, Two week-old tissue was composed mainly of vacuolated and elongated cells: B, Small isodiametric cells (→): C, Region of meristemoid (→): D, Shoot primordium. Bars indicate 20 μm in A and B, and 100 μm in C and D.

지 않았으며 단지 신장되거나 모양이 다양한 무정형의 세포들만이 관찰되었다(Figure 5A). 그 후 배양이 진전됨에 따라 주위의 세포들과 구별이 뚜렷한 세포의 크기가 작고 지름이 동일하며 핵과 세포질이 진하게 염색되는 세포집단이 형성된 것을 관찰할 수 있었다(Figure 5B). 배양조직으로부터 기관형성이 이루어질 때 나타나는 조직내 특징을 살펴보면, 조직을 구성하는 세포들 중 소수의 세포들이 일련의 급속한 세포분열에 의해 shoot나 근원기로 분화될 능력을 지닌 분열조직군(meristemoid)을 형성하여 기관발생 과정에 관여하는 것으로 알려져 있는데 일반적으로 분열조직을 구성하고 있는 세포는 크기가 작고 균일하며 세포질이 충만하고 핵이 커서 핵포화가 이루어지지 않은 것처럼 보인다(Torrey, 1966; Thorpe and Murashige, 1970; Kim et al., 1984). 따라서 이 시기에 형성된 세포집단이 장차 shoot로 발달될 분열조직군임을 확인할 수 있었으며(Figure 5C) 이들 분열조직군이 기관발생 초기단계라고 할 수 있는 shoot primordia로 발달하는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 5D). 4주이상 배양한 조직의 경우는 분화된 shoot 내부에 전형성층(procambial strand)이 형성되는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 6).



Figure 6. Section of 4 week-old tissue forming procambial strand. Bar indicates 1 mm.

적 요

다래(*A. arguta*)의 절간조직을 절편체로하여 식물생장조절제의 종류와 광조건이 shoot 형성에 미치는 영향을 조사하였으며 아울러 기내발근을 통하여 다래로부터 완전한 식물체를 재분화시킬 수 있는 실험체제를 확립하였다. 절간절편체는 3.0 mg/L의 zeatin이 단독첨가된 배지에 암배양한 경우 62.5%로 높은 shoot 형성률을 나타내었다. 0.5 mg/L NAA가 포함된 WPM 배지에 4주 동안 배양하여 발근시킨 식물체는 vermiculite와 perlite가 1:1(v/v)로 혼합된 배양토

에 1주간 순화시킨 후 일반토양에 이식한 결과, 완전한 식물체로 성장시킬 수 있었다.

다래의 절간절편체를 shoot 유도배지에 배양하여 shoot의 형성과정을 발달단계별로 조직학적인 측면에서 관찰한 결과, 배양초기에는 신장되거나 모양이 다양한 무정형의 세포가 대부분이었으나 배양이 진전됨에 따라 세포의 크기가 작고 세포질이 충만한 분열조직군이 형성되면서 이들로부터 장차 shoot로 발달될 shoot primordia가 형성되는 것을 관찰할 수 있었다.

사시-본 연구는 1996년도 교육부 기초과학연구소 연구비지원 (BSRI-96-4439)의 일부에 의한 결과이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

인용문헌

- Bansal YK, Pandey P (1993) Micropropagation of *Sesbania aculeata* by adventitious organogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cul* 32: 351-355
- Barbieri C, Morini S (1987) Plant regeneration from *Actinidia* callus culture. *HortScience* 62: 107-109
- Chiyomi U, Makoto M, Hiroaki I, Jun I (1991) *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of kiwi fruit. *Plant Cell Rep* 10: 286-290
- Eggen JL, Wright CPM (1985) Nitrogen effects on monostands and polystands of annual bluegrass and creeping bentgrass. *HortScience* 20: 109-110
- Grosser JW, Gmitter FG, Chandler JL (1988a) Intergeneric somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* cv. Hamlin and *Poncirus trifoliata* cv. Flying Dragon. *Plant Cell Rep* 7: 5-8
- Grosser JW, Gmitter FG, Chandler JL (1988b) Intergeneric somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species *Citrus sinensis* and *Severinia disticha*. *Theor Appl Genet* 75: 397-401
- Haissig BE (1974) Metabolism during adventitious root primordium initiation and development. *For Sci* 4: 324-337
- Kim JC, Lee EA (1996) Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Dianthus superbus*. *Plant Cell Rep* 16: 18-21
- Kim JC, Won JL, Seong MW (1984) Morphogenetical studies on the habituated callus originated from the excised leaves of tobacco plants. *Genetica-Breda* 3: 47-54
- Lloyd G, McCown BH (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. *Comb Proc Intl Plant Prop Soc* 30: 421-427
- Mohammed GH, Vidaver WE (1990) The influence of acclimatization treatment and plantlet morphology on early greenhouse performance of tissue cultured Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). *Plant Cell Tiss Org Cul* 21: 111-117
- Moncousin C, Favre JM, Gasper T (1989) Early changes in auxin and ethylene production in vine cuttings before adventitious rooting. *Plant Cell Tiss Org Cul* 19: 235-242
- Monette PL (1986) Micropropagation of kiwifruit using non-axenic shoot tips. *Plant Cell Tiss Org Cul* 6: 73-82
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Piagnani C, Eccher T, Castelli S (1988) Micropropagation of *Actinidia chinensis*: effects of growth regulators on proliferation rate. *Acta Hort* 179: 887-889
- Sankara Rao K (1988) *In vitro* meristem cloning of *Eucalyptus tereticornis* Sm. *Plant Cell Rep* 7: 546-549
- Thomas CM (1989) *Biochemistry and physiology of plant hormones*. 2nd ed. Springer-Verlag, pp. 158-195
- Thorpe TA, Murashige T (1970) Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus culture. *Can J Bot* 48: 277-285
- Torrey JG (1966) The initiation of organized development in plants. *Adv Morphogenesis* 5: 39-91

(1997년 3월 14일 접수)