

한라산 자생 왕벚나무 접합자배 유래의 캘러스로부터 체세포배 형성과 식물체 재분화

고정군^{1,2} · 박영철¹ · 양두영¹ · 김응식³ · 오문유¹ · 고석찬^{1,*}

¹제주대학교 생물학과, ²한라산국립공원, ³서남대학교 생물학과

Plant Regeneration and Somatic Embryogenesis from Zygotic Embryo-derived Callus of Native *Prunus yedoensis* in Mt. Halla

KOH, Jung Goon^{1,2} · PARK, Young Chul¹ · YANG, Doo Young¹ · KIM, Eung Sik³ · OH, Moon You¹ · KOH, Suck Chan^{1,*}

¹Department of Biology, Cheju National University, Cheju, 690-756, Korea:

²Mt. Halla National Park, Cheju, 690-200, Korea: and

³Department of Biology, Seonam University, Namwon, 590-711, Korea. *Corresponding author.

Somatic embryos were induced through embryogenic callus derived from immature zygotic embryo culture of native *Prunus yedoensis* in Mt. Halla and regenerated into plantlets successfully. Embryogenic callus was induced most effectively on MS medium with 1.0 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L BAP at an efficiency of approximately 60% using 45 day-old zygotic embryos after full blooming. Globular somatic embryos were induced from embryogenic callus on MS medium with 1.0 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L BAP and these globular embryos developed to heart-shaped and cotyledonary embryos on hormone-free MS medium. Normal somatic embryos germinated 49% on 1/2 MS medium and the plants regenerated from the somatic embryos were morphologically normal.

Key words : immature zygotic embryo, 2,4-D, embryogenic callus

서 론

벚나무속(*Prunus*) 식물은 관목이나 교목으로서 산지조림 수, 조경수 및 과수 등 그 경제적 가치가 높아 국내는 물론 세계적으로 널리 식재되고 있다. 이 속 식물 중 왕벚나무(*Prunus yedoensis*)는 다양하게 개량되어 세계적으로 식재되고 있는데, 제주도 한라산의 왕벚나무는 1908년 프랑스 신부 Taquet가 처음 발견하여 1912년 Koehne에 의해 왕벚나무가 한라산에 처음 자생한다는 것을 보고한 이후(Park, 1965), 재배 왕벚나무와 함께 그 기원과 자생지에 대한 논의가 끊임없이 진행되는 수종이다. 더우기 천연기념물로 지정 보호되고 있는 한라산 자생 왕벚나무는 개체수가 극히 한정되어 있고 수목이 노령화되어 있을 뿐만 아니라 종자에 의한 자연 발아나 삼목 등에 의한 무성번식이 거의 이루어지지 않고 있어 유전자 보존 및 자생지 복원을 위하여 효율적인 증식방법의 개발이 시급하다.

한편, Steward 등(1958)과 Reinert(1959)가 당근에서 체세

포배 발생을 관찰한 이래 최근에는 식물의 배양조직으로부터 체세포배를 통한 식물체 재분화에 대한 연구가 여러 분야에서 활발히 연구되고 있다. Liu 등(1983)은 사과의 잎으로부터 체세포배를 발생시켰으며, Janick(1982)는 배나무 조직으로부터, Park과 Choi(1992)는 매실나무의 미성숙배로부터 체세포배 발생을 통한 식물체 생산에 성공하는 등 몇몇 목본류에서 체세포배발생을 통한 식물체 재분화가 이루어지고 있다. 벚나무속 식물의 증식은 주로 접목과 삼목 등의 방법으로 이루어지고 있는데, Boxus와 Quoirin(1974)에 의해 조직배양에 의한 증식이 시작된 이후, *P. amygdalus*, *P. persica*, *P. avium*, *P. tomentosa* 등 주로 과수류에서 경단배양이나 측아배양에 의한 증식이 보고되고 있다(Tabachnik and Kester, 1977; Miller et al., 1982; Norton and Boe, 1982; Snir, 1982). 하지만, 한라산의 왕벚나무에 대하여는 영양아를 이용한 기내 증식 방법은 확립되었으나(Kim et al., 1993), 체세포 발생을 통한 번식체계는 이루어지지 않았다.

본 연구는 왕벚나무의 미성숙 접합자배로부터 체세포배

를 발생시켜 식물체로 재분화할 수 있는 조건을 밝혀 왕벚나무의 증식 체계를 확립하고자 실시하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 실험조건

한라산에 자생하는 왕벚나무(*Prunus yedoensis*)의 미성숙한 종자를 2.5% 차아염소산나트륨(NaOCl) 용액으로 20분간 표면 살균한 후 멸균 증류수로 3회 이상 세척하고, 70% 에탄올에 1분 동안 살균 시킨 뒤 멸균 증류수로 4~5회 세척하였다. 표면살균된 종자는 횡단으로 자른 뒤 접합자배만을 분리하여 실험재료로 사용하였다. 본 실험에 사용한 배지는 MS 기본배지에 3% 설탕, 0.8% 한천을 첨가하였고 pH를 5.8로 조정하여 121°C의 고압증기멸균기에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 배양조건은 25±2°C의 배양실에서 2,500 lx의 형광등하에서 광주기가 16/8인 조건으로 배양하였다.

배발생 캘러스의 유도 및 선발

배발생 캘러스를 유도하기 위하여 2,4-D(0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L)와 BAP(0.1 mg/L), NAA(0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L)와 BAP(0.1 mg/L)가 다양하게 조합처리된 MS 배지(Murashige and Skoog, 1962)에 각각의 처리구당 15개씩 3반복으로 미성숙한 접합자배 조직을 접종하고, 4주 후 동일배지에 계대배양하였다. 접종 8주 후에 각각의 처리구에서 캘러스 발생을 관찰하고, 이들 캘러스는 배발생과 비배발생 캘러스로 구분하여 조사하였다. 배발생 캘러스는 세포들이 매우 치밀하고 그 표면에 광택이 있으면서 흑화 또는 마디화한 것을 선택하였고, 좁이 많고 투명하며 구성세포간 부착력이 적어 쉽게 부서지는 캘러스는 비배발생 캘러스로 판단하였다. 또한 동일한 캘러스 조직내에 배발생과 비배발생 캘러스가 혼재된 경우에는 배발생 캘러스가 유도된 것으로 간주하여 각각의 처리구에 대한 유도비율을 산출하였다. 그리고, 캘러스간의 세포질 농도의 차이를 알아보기 위하여 Lowry 등(1951)의 방법으로 단백질함량을 측정하여 비교하였다.

체세포배 및 식물체의 유도

유도된 배발생 캘러스로부터 체세포배를 유도하기 위하여 캘러스를 배발생 캘러스 유도가 양호한 1.0 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BAP가 조합처리된 MS 배지에서 구형이나 심장형배가 뚜렷하게 발달되기까지 4주 간격으로 계대배양시켰다. 이들 구형이나 심장형배를 갖는 캘러스는 식물생장 조절제가 첨가되지 않은 MS 배지에서 지속적으로 계대배

양시켜 체세포배를 획득하였다. 체세포배 발생과정을 거쳐 발달한 정상적인 자엽을 갖는 체세포배는 식물생장조절제가 첨가되지 않은 1/4 MS, 1/2 MS, 1 MS, 3/2 MS, 2 MS 배지에서 발아를 유도하였다.

접합자배 발달 단계별 배발생 캘러스 형성능의 조사

만개후 15, 30, 45, 90일된 종자로부터 절취한 접합자배를 1.0 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BAP가 조합처리된 MS 배지에서 배발생 캘러스를 유도하여, 종자성숙 단계별 배발생캘러스의 형성능을 조사하여 비교하였다.

결과 및 고찰

배발생 캘러스의 유도

왕벚나무 만개후 45일된 종자에서 분리한 미성숙한 접합자배를 0.1 mg/L BAP와 다양한 농도의 2,4-D 및 NAA가 첨가된 MS 배지에 8주 동안 배양한 결과(Table 1), 대조구를 제외한 모든 처리구에서 캘러스가 유도되었으나 유도율은 13.3~100%로 많은 차이를 보였다. 또한 이들 캘러스는 처리된 식물생장조절제의 종류와 농도에 따라 뚜렷한 차이를 보였다. 즉, 0.5~1.0 mg/L 2,4-D와 1.0 mg/L BAP가 혼합처리된 배지에서 형성된 캘러스는 연녹색을 띠며 표면이 부드러우면서 광택이 있고 치밀한데 반해(Figure 1A) 고농도의 2,4-D(2.0~4.0 mg/L) 및 NAA와 0.1 mg/L BAP가 혼합처리된 배지에서 형성된 캘러스는 대부분 연한 노란색이나 투명한 색으로 좁이 많고 구성세포간에 부착이 적어 쉽

Table 1. Effect of plant growth regulators on the induction of embryogenic and non-embryogenic callus from immature embryos of *Prunus yedoensis* after 8 weeks of culture.

Plant growth regulator ^a (mg/L)	Callus induction (%)	Embryogenic callus (%)	Non-embryogenic callus (%)	Callusing	
				Color ^b	Degree ^c
Control	-	-	-	-	-
2,4-D	0.1	13.3	50.0	50.0	Y +
	0.5	40.0	66.7	33.4	YG ++
	1.0	73.3	90.9	9.1	YG +++
	2.0	60.0	55.6	44.4	YG +
	4.0	100	6.7	93.3	WY +
NAA	0.1	20.0	-	100	WY -
	0.5	53.3	12.5	87.5	Y +
	1.0	26.6	-	100	WY -
	2.0	60.0	-	100	WY -
	4.0	80.0	-	100	WY -

^a Plant growth regulators were added to MS basal medium.

^b Y: yellow, YG: yellowish green, WY: whitish yellow.

^c Degree indicates formation of embryogenic callus. -: no response, +: slight, ++: moderate, +++: good.

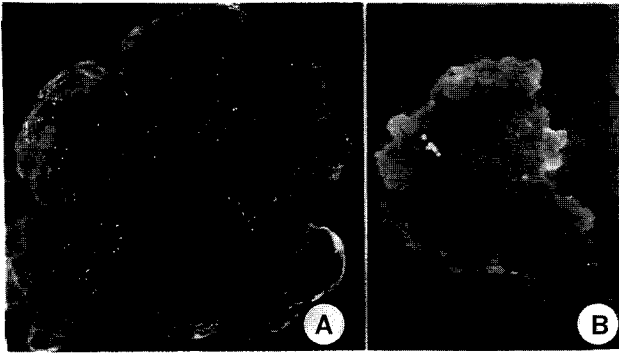


Figure 1. Embryogenic callus(A) and non-embryogenic callus(B) induced from immature zygotic embryo of *P. yedoensis* after 8 weeks of culture.

게 부서지는 특성을 보였다(Figure 1B). 이들 형태적 차이 외에 두 종류의 캘러스는 단백질 함량에서도 조직이 치밀한 캘러스의 경우 생체량 1 g 당 평균 16.27 mg인데 반해 좁이 많은 캘러스는 9.60 mg으로 많은 차이를 보였다(결과 생략). 이는 기내배양에 의한 고등식물조직으로부터 유도되는 캘러스는 배지의 성분과 성장조절제 및 광 등의 영향에 의해 치밀한 캘러스와 유연한 캘러스로 구분되며, 배발생 캘러스는 비배발생 캘러스보다 3배 이상의 단백질을 가진다는 결과와 유사하였다. 따라서 형태적 차이와 단백질 함량을 비교하므로써 배발생 캘러스와 비배발생 캘러스를 구분할 수 있었다(Hall, 1991; Paek and Lee, 1992). 이들 각 처리구에서 유도된 캘러스를 배발생 캘러스와 비배발생 캘러스로 구분하면, NAA와 BAP의 조합처리구에서는 0.5 mg/L NAA와 0.1 mg/L BAP가 조합처리된 배지에서 12.5%의 배발생 캘러스가 유도되었고 이외의 NAA 처리구에서는 비배발생 캘러스만이 형성되었다. 그러나 2,4-D와 BAP가 혼합처리된 대부분의 배지에서는 배발생 캘러스가 형성되었고, 그 중 1.0 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BAP가 조합처리된 배지에서 배양 일주일 후부터 담황색이나 연녹색의 표면이 부드러우면서 광택이 있고 조직이 치밀한 배발생 캘러스가 유도되기 시작하고 배양 8주에 배발생 캘러스의 유도비율이 90.9%로 가장 양호하였으며, 2,4-D의 농도가 높아질수록 배발생 캘러스 유도비율은 저조하였다. 이는 배양시 많은 식물의 경우 체세포발생을 위해서는 2,4-D가 필수적인 역할을 수행하는데(Guo and Gui, 1993), 매실나무의 미성숙 접합자배로부터 배발생캘러스 유도시 2,4-D 1.0 mg/L 이상에서는 비배발생 캘러스의 유도율이 높아지나, 배발생 캘러스나 체세포배는 0.1 mg/L 2,4-D와 0.1mg/L BA가 조합된 배지에서 가장 많이 형성되는 것으로 보아(Park and Choi, 1992) 왕벚나무의 미성숙 접합자배로부터 배발생 캘러스 유도시에도 2,4-D 농도가 중요한 것으로 판단된다.

체세포배 및 식물체의 유도

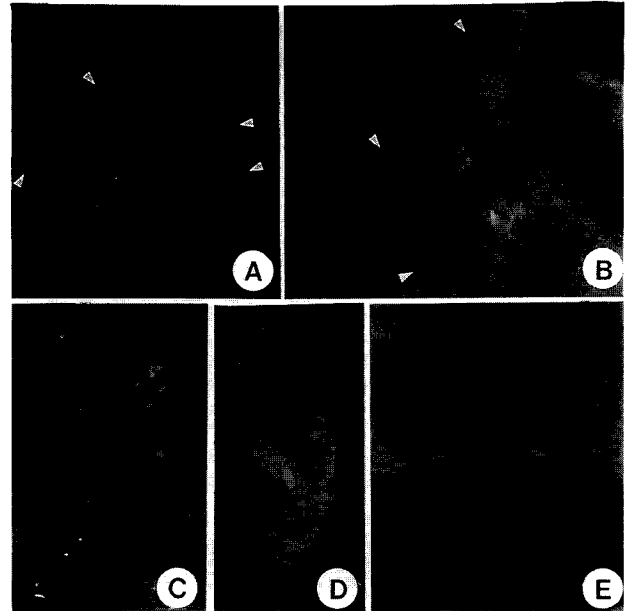


Figure 2. Plant regeneration through somatic embryogenesis in embryogenic callus induced from immature zygotic embryo of *P. yedoensis*.

(A) Globular embryos(arrows) derived from the embryogenic callus, (B) Early heart stage embryos(arrows) developed from globular embryos, (C, D) Cotyledonary embryos developed from the heart stage embryos, (E) Regenerated plantlet.

유도된 배발생 캘러스는 1.0 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BAP가 혼합처리된 MS 배지에 4주 간격으로 계대배양하여 계속 증식·유지하는 한편, 구형 또는 심장형으로 발달한 체세포배를 선발하여 식물성장조절제가 첨가되지 않은 MS 기본배지에서 배양함으로써 체세포배를 획득할 수 있었다(Figure 2A~D). 이들 체세포배의 발달과정은 배양 4주 후부터 구형배가 발생되기 시작하여(Figure 2A) 배양기간이 경과함에 따라 체세포배는 초기 심장형을 거쳐(Figure 2B) 어뢰형으로 발달한 후 다자엽을 갖는 체세포배(Figure 2C)나 정상적인 자엽을 가진 체세포로 발달하였다(Figure 2D). 또한 체세포배 발달 과정에서 1~3 개의 자엽을 갖는 체세포 뿐만 아니라 나팔모양의 체세포배도 관찰되었다. 하지만, 비교적 높은 농도의 2,4-D(2.0~4.0 mg/L)에서 유도된 배발생 캘러스는 구형배로 발달하였으나, 정상적인 자엽을 갖는 체세포배로 발달하지 않았으며 식물체 분화도 대부분 일어나지 않았다. 이는 초기 고농도의 2,4-D 배지로부터 흡수된 2,4-D의 효과가 계속 유지됨으로써 정상적인 체세포배로의 발달이나 식물체로의 전환을 저해하는 것으로 보인다(Buchheim et al., 1989).

정상적으로 발달된 체세포배를 1/4 MS, 1/2 MS, 1 MS, 3/2 MS, 2 MS 배지에 각각 계대배양하여 체세포배의 발아율, 식물체의 발달양상과 발달된 식물체의 형태적 특성을 조사한 바(Figure 3), 배지의 무기물 농도에 따라 발아율은

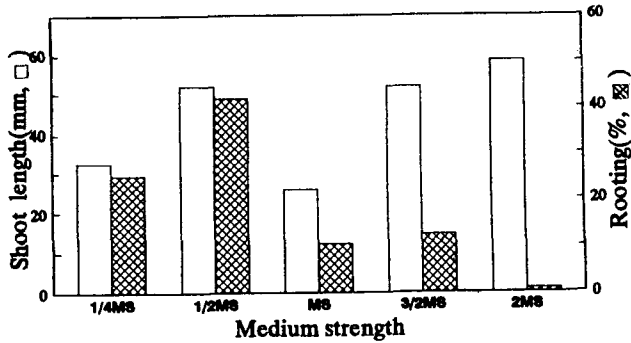


Figure 3. Effects of medium strength on regeneration of somatic embryo induced from immature embryo of *P. yedoensis* after 16 weeks of culture.

0~49%로 많은 차이를 보였으며, 식물생장조절제가 첨가되지 않은 1/2 MS 배지에서 49%의 발아율을 보여 가장 양호하였다. 또한 신초의 성장도 1/2 MS 배지에서 52.0 mm로 양호하여 체세포 발아에 가장 적당한 배지로 판단된다. 그러나, 2 MS 배지에서는 발근은 전혀 이루어지지 않았으나 신초가 발생되었고 신초의 길이도 평균 58.5 mm로 양호한 성장상태를 보였다. 그러나 체세포배의 발아율 즉, 뿌리와 줄기의 정상적인 발달이 배지의 무기물 농도에 따라 많은 차이를 보이고 비교적 낮게 나타났다. 이와같이 초기의 구형에서 자엽단계까지 발달한 체세포배는 정상적으로 발아하고 지속적으로 성장하여 체세포배의 발생경로를 통해 번식이 가능함을 보였다. 이처럼 체세포배로부터 발아 및 식물체 발달시 배지의 구성에 따라서도 차이를 나타내고 있는데, 노각나무의 경우 1 MS, 1/2 MS 보다 1/2 MS 배지에 0.1 % 활성탄이 첨가된 배지에서 뿌리와 줄기의 정상적인 발달이 더욱 효과적이었다는 것으로 보아(Choi et al, 1995) 왕벚나무에서도 활성탄의 처리, 삼투압조절제와 에너지원의 조절 등이 발아율을 높이기 위해 검토해 볼 필요가 있다고 생각된다.

배 발달 단계별 배발생 캘러스 형성능의 비교

체세포배 발생은 배양식물의 종, 치상조직의 종류와 그 생리적 성질 등이 중요한 요인이 되고 있는데, 배가 식물조직편 자체에서 생겨나건 캘러스세포에서 생겨나건 그 세포가 배발생 잠재 능력이 있어야 한다. 이러한 배형성능은 절편체의 성장단계나 부위 등에 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Wang et al, 1984). 이를 알아보기 위하여 왕벚나무 미성숙 종자를 생육단계별로 채취하고 배를 절취하여 배발생 캘러스의 형성능을 비교하였다(Figure 4). 배발생 캘러스 형성능은 종자가 발달함에 따라 점차 증가하여 45일된 종자에서 60.0%로 가장 높았다. 그러나 90일된 종자에서는 25%의 배발생 캘러스가 유도되어 미성숙배가 완숙배로 발달할수

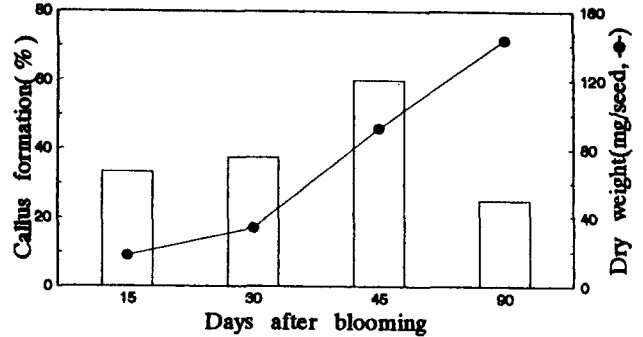


Figure 4. Embryogenic callus formation from immature embryo in various stage of seed development in *P. yedoensis* after 8 weeks of culture.

록 배발생 캘러스 형성율은 낮아졌다. 하지만 발달 단계가 다른 종자의 접합자배에서 유도한 배발생 캘러스로부터 체세포배 발생은 차이를 보이지 않았다. 또한 완숙배를 이용하여 배발생 캘러스 유도시 캘러스와 식물체 분화가 동시에 발생되기도 하였다. 이와같이 접합자배의 발달단계에 따라 동일한 식물생장조절제에서 배발생 캘러스 발생율이나 발생 양상이 달리 나타나는 것은 벚의 미성숙배에서 유겨된 캘러스는 완숙배 유래 캘러스 보다 식물체 재분화능이 높았으며, 수분후 20일된 미성숙배로부터 유래된 캘러스에서 59.6%의 가장 높은 재분화율을 보였고(Sohn and Lee, 1992) 접합자배의 성숙시기에 따라 체세포배의 기원이 현저하게 달라지는 것으로 보아(Choi and Soh, 1993), 미성숙한 접합자배를 이용한 체세포배 형성이나 식물체 분화시 접합자배의 발달정도가 중요한 요인으로 작용한다고 판단된다.

적 요

한라산에 자생하는 왕벚나무(*Prunus yedoensis*)의 미성숙 접합자배로부터 배발생 캘러스를 거쳐 체세포배를 유도할 수 있었으며, 이들 체세포배로부터 식물체를 재분화시킬 수 있었다. 배발생캘러스는 1.0 mg/L 24-D와 0.1 mg/L BAP가 혼합 처리된 MS 배지에서 가장 효과적으로 유도되었으며, 그 중에서 90%가 배발생 캘러스였다. 또한 배발생 캘러스는 만개 후 45일된 종자의 접합자배에서 전체 60%가 발생되어 가장 양호하였다. 유도된 배발생 캘러스를 1.0 mg/L 24-D와 0.1 mg/L BAP가 혼합처리된 MS 배지에서 4주 간격으로 계대배양하여 구형 또는 심장형으로 발달한 체세포배를 얻을 수 있었고, 이들 체세포배는 식물생장조절제가 첨가되지 않은 MS 배지에서 배양하여 정상적인 자엽을 갖는 체세포배를 얻을 수 있었다. 이들 체세포배들은 배지의 종류에 따라 발아율은 0~49%로 많은 차이를 보였으나, 식물생장조절제가 첨가되지 않은 1/2 MS 배지에서 49%의 발

아울을 보여 가장 양호하게 식물체로 재분화되었다.

사시 - 본 연구는 1996년도 교육부 학술연구조성비(기초과학 BSRI-96-4446)에 의하여 연구되었음.

인용문헌

- Boxus P, Quoirin M** (1974) La culture de meristemes apicaux de quelques especes de *Prunus*. Bull Soc R Bot Belg **107**: 97-101
- Buchheim JA, Colburn SM, Ranch JP** (1989) Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. Plant Physiol **89**: 768-775
- Choi EG, Park HB, Kim KS, Lee YK** (1995) Plant regeneration from immature zygotic embryos of *Stewartia koreana* Nakai via somatic embryogenesis. Korean J Plant Tissue Culture **22**: 77-81
- Choi YE, Soh WY** (1993) Structural aspects of somatic embryos derived from cultured zygotic embryos in *Acanthopanax senticosus* L. Korean J Plant Tissue Culture **20**(5): 261~266
- Guo Z, Gui Y** (1993) Plant somatic embryogenesis and artificial seeds. In WY Sho, JR Liu, A Komamine, eds, Advances in developmental biology and biotechnology of higher plants. Korean J Plant Tissue Culture, Taejon, pp 150-159
- Hall, RD** (1991) The initiation and maintenance of callus cultures of carrot and tobacco. Plant Tissue Culture Manual **A2**: 1-19
- Janick J** (1982) Adventive embryogenesis in pear. Acta Hort **124**: 37-41
- Kim CS, Koh JG, Cho RM** (1993) Effects of media, plant growth regulators and dark treatments on in vitro plant regeneration using vegetative bud of *Prunus yedoensis* Matsumura. Korean J Plant Tissue Culture **20**: 213-219
- Liu JR, Sink KC, Dennis FG** (1983) Adventive embryogenesis from leaf explants of apple seedlings. HortScience **18**: 871-873
- Lowry OH, Rosebrough HJ, Farr AL, Randall RJ** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem **193**: 265-275
- Miller GA, Coston DC, Denny EG, Romeo ME** (1982) In vitro propagation of Nemaguard peach rootstock. HortScience **17**: 194
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant **15**: 473-497
- Norton ME, Boe AA** (1982) In vitro propagation of ornamental rosaceous plants. HortScience **17**: 190-191
- Park MK** (1965) A historical survey on the *Prunus yedoensis* in Korea. Korean J Bot **8**: 12-15
- Paek KY, Lee CH** (1992) Enzyme activities in relation to nitrogen assimilation in *Nicotiana tabacum* callus. Korean J Plant Tissue Culture **19**: 81-87
- Park HB, Choi EG** (1992) Plant regeneration and somatic embryogenesis from immature embryo of Japanese apricot(*Prunus mume* Sieb et Zucc). Korean J Plant Tissue Culture **19**: 261-266
- Reinert J** (1959) Ueber die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventive embryonen an gewebeulturen aus karotten. Planta **53**: 318-333
- Snir I** (1982) In vitro propagation of sweet cherry cultivars. HortScience **17**: 92-193
- Sohn JK, Lee GH** (1992) Effect of sorbitol on embryogenic callus and embryoid formation in callus cultures of rice(*Oryza sativa* L.). Korean J Plant Tissue Culture **19**: 179-184
- Steward FC, Mapes MO, Smith J** (1958) Growth and organized development of cultured cell. I. Growth and division of freely suspended cells. Amer J Bot **45**: 693-703
- Tabachnik L, Kester DE** (1977) Shoot culture for almond and almond-peach hybrid clones in vitro. HortScience **12**: 545-547
- Wang D, Wergin WP, Zimmerman RH** (1984) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of strawberry. HortScience **19**: 71-72

(1997년 7월 7일 접수)