

어수리(*Heracleum moellendorffii* Hance.)의 미숙배로부터 형성된 체세포배의 자엽수에 미치는 Cytokinin의 영향

김창길 · 정재동* · 지선옥**

상주대학교 원예학과
경북대학교 농과대학 원예학과*
중부대학교 원예학과**

Effect of Cytokinins on the Number of Cotyledons of Somatic Embryos from Immature *Zygotic* Embryo Culture of *Heracleum moellendorffii* Hance.

Chang-Kil KIM · Jae-Dong CHUNG* · Sun-Ok JEE**

Dept. of Horticulture, Sangju National University
* *Dept. of Horticulture, Kyungpook National University*
** *Dept. of Horticulture, Joongbu University*

Abstract

In order to investigate the effect of cytokinins on the cotyledonary variability of somatic embryos in *Heracleum moellendorffii* Hance., somatic embryos were induced from the immature zygotic embryo on MS medium containing 1.0 mg/l 2, 4-D, and then transferred to 2,4-D-free and cytokinin-added medium for somatic embryogenesis after 4 weeks culture. Polycotyledonary embryos were formed most abundantly (84.9 %) on the 0.2 mg/l BA medium as compared with the 0.2 mg/l 2ip (42.6 %) and kinetin (32.9 %) media, and it was proportional to BA concentrations (0.01 ~ 0.1 mg/l). The rate of polycotyledonary embryo formation increased proportional to the period of BA treatment and also increased more at the globular stage than at the heart, torpedo-shaped and cotyledonary stages.

Key words : *Heracleum moellendorffii*, cotyledon number, cytokinins, somatic embryogenesis

緒 論

인공종자의 개발을 위해 또는 식물생물학 연구의 시료로서 동조화된 그리고 구조와 기능상으로 정상적이고 건실한 체세포배의 생산이 필요하지만, 일반적으로 기내에서 생산되는 대부분의 체세포배가 비정상적인 형태임이 지적된 바 있다(Ammirato, 1985; Smith et al., 1990). 이러한 비정상적인 특징중의 하나는 자엽의 수와 형태로서, 배의 주축에서 하나 혹은 셋 또는 그 이상의 자엽이 형성되거나 (Navarro et al., 1985; Ammirato, 1987; Kageyama, 1990; Smith et al., 1990), 몇몇 식물에서는 나팔모양으로 형성되기도 한다(Stuart et al., 1985; Merkle et al., 1987).

형태형성에 미치는 여러 요인중 배지내 첨가되는 호르몬이 체세포배 발생에 많은 영향을 미치는 것으로 보인다. ABA는 체세포배가 정상적인 자엽체를 갖게하며(Soh et al., 1990), zeatin은 다자엽의 형성에 영향을 미친다는 것이 부분적으로 알려져 있다(Ammirato, 1977). 그러나 체세포배 발생과정에서 자엽의 수적변이에 중점을 두고 실시한 연구는 거의 이루어진 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 cytokinin을 종류별, 농도별, 그리고 배발달 단계별로 처리하여 자엽의 수적변이에 미치는 영향을 밝히고자 한다.

재료 및 방법

어수리의 개화후 2~3주 된 미숙종자를 채취하여 70% 에탄올에 1분, 1% sodium hypochlorite 용액에 약 30분간 침적하여 표면살균한 후, 멸균수로 3~4회 세척하여 해부현미경하에서

2~3 mm 크기의 미숙배만을 채취하여 일회용 petri-dish(87×15 mm)에 접종하여 배양하였다. 배지는 MS 기본배지에 sucrose 30 g/l, 한천 8 g/l 그리고, 식물생장조절물질을 첨가하고 pH 5.8로 조절하여 사용하였다. 배양은 온도 25 °C, 광도 2,000 lx, 16시간 광조건하에서 약 8주간 실시하여 유도된 캘러스로부터 배발생캘러스를 선발하였다. 배발생캘러스는 1.0 mg/l의 2,4-D가 첨가된 액체배지에서 100 rpm의 속도로 약 3주간 현탁배양하고, 이를 직경 200~100 μ m의 stainless sieve로 여과하고, 4주간 계대배양하여 배발생 세포괴를 증식시켰다. 사용된 시료(배발생세포괴, 구상형배, 심장형배, 어뢰형배, 자엽형시기의 배)는 액체배지 20 ml씩 첨가하여 처리구당 5개씩 5반복하여 수행하였다.

체세포배의 자엽발생에 미치는 cytokinin의 영향을 구명하기 위하여 cytokinin을 종류별(BA, Zip, kinetin) 농도별(0.01~1.0 mg/l) 그리고 배발생 단계별(구상형배~자엽형시기의 배)로 처리하여 2~4주간 배양한 후 자엽의 수를 해부현미경하에서 조사하였다.

결과 및 고찰

유식물의 잎절편을 1.0 mg/l 2,4-D가 첨가된 MS배지에 8주간 배양하였을 때, 갈변된 캘러스로부터 흰색의 배발생캘러스와 체세포배가 유도되었다. 배발생캘러스를 1.0 mg/l 2,4-D가 첨가된 액체배지에 현탁배양하여 증식시켰으며, 이를 성장조절물질이 제거된 액체배지에 이식하여 4주간 배양하였을 때 구상형의 체세포배가 유도되었다.

구상형배를 대조구(성장조절물질이 제거된

배지)와 cytokinin을 종류별(BA, 2ip, kinetin)로 각각 0.2 mg/l씩 단독처리하여 2주간 현탁 배양한 결과, 2개의 자엽을 갖는 정상적인 체세포배의 형성률은 각각 74.7, 15.1, 57.4, 67.1%이었으며, 다자엽을 갖는 체세포배의 형성률은 각각 25.2, 84.9, 42.6, 32.9%로서 특히, BA처리구에서 현저하게 높은 형성률을 나타내었으며, BA > 2ip > kinetin 순으로 다자엽형성에 관여함을 알 수 있었다. 한편, 2차배의 형성은 대조구를 제외한 cytokinin 처리구 모두에서 같은 경향으로 형성되었다(Table 1).

체세포배의 발생중에 2개의 자엽을 갖는 정상적인 배의 생산은 산업적인 응용면에서 매우 중요한 문제이다. 2개의 자엽을 갖는 정상적인 배는 ABA에 의해 유도됨이 caraway와 참죽나무 등의 배양으로부터 알려진 바 있다

(Ammirato, 1974; Soh et al., 1990). 본 실험에서 BA처리는 현저하게 다자엽형성을 촉진하였다. 이와같이 cytokinin이 다자엽형성에 미치는 영향은, caraway의 배양세포에 zeatin 및 gibberellic acid(GA3)를 처리하면 다자엽의 형성율이 증가된다는 Ammirato (1977)의 보고와 유사한 것을 알 수 있다.

배발생 세포피에 BA를 농도별 (0.01, 0.5, 0.1, 1.0 mg/l)로 2주간 처리한 후, 생장조절물질이 제거된 배지에 2주간 배양한 결과, 2개의 자엽을 갖는 정상자엽배의 형성율은 대조구(7.7%)에 비해 BA의 농도가 높을수록 낮은 경향이였으며, 반대로 다자엽배의 형성율은 대조구(23.3%)에 비해 높은 경향이였다. 그런데, 1.0 mg/l의 고농도에서는 1차배의 자엽절 부위에 2차배가 형성되었다(Table 2).

Table 1. Effect of cytokinins on the variability of cotyledon number of somatic embryos after 2weeks culture of globular embryo in *Heracleum moellendorffii* Hance

Frequency(%)	Cytokinin (0.2 mg/l) ^a			
	Hormon free	BA	2ip	Kinetin
Dicotyledon	74.7±2.1	15.1±1.1	57.4±1.3	67.1±3.3
Polycotyledon	25.2±2.2	84.9±1.4	42.6±1.5	32.9±3.3
Secondary embryo formation ^b	-	++	++	++

^a Each value represents the mean±SE

^b - : none, ++ : greater than 30%

Table 2. Cotyledonary variations of somatic embryos formed from embryogenic cell clumps on medium containing various concentrations of BA in *Heracleum moellendorffii* Hance.

Frequency(%)	Concentration of BA (0.2 mg/l) ^a				
	0	0.01	0.05	0.1	1.0
Dicotyledon	76.7±2.2	60.3±1.9	30.6±1.3	25.6±1.2	0 ^b
Polycotyledon	23.2±2.2	39.7±1.9	69.4±1.3	74.4±1.2	0 ^b

^a Each value represents the mean±SE

^b Abnormal or secondary embryo

대두의 미숙접자배의 크기(2.0~4.4 mm)와 sucrose의 농도(0.5~3.0%)에 따른 정상적인 체세포배의 형성률은 접합자배의 크기가 2.5~2.9 mm이고 sucrose의 농도가 0.5~1.0%일 경우에 높게 나타나며, 0.5%에서는 2개의 자엽 및 다자엽을 갖는 배의 형성률은 높지만 하나의 자엽을 갖는 배의 형성률은 낮으며, 그리고 2.0%의 조건에서는 이상형배의 형성률이 높게 나타남이 보고된 바 있다(Kageyama et al., 1990). 대두의 자엽 배양시에 NAA(6.5~5.0 mg/l)와 sucrose(0.5~0.4%)를 조합처리하면 다자엽의 형성하는 비율이 높다는 보고가 있다(Lazzeri et al., 1988).

Lee와 Soh(1993)는 땅두릅의 잎 절편을 2,4-D가 첨가된 고체배지에서 계속배양하면 대부분(86.7%)이 하나의 자엽을 갖는 볼링핀형 배와 나팔모양의 자엽을 갖는 이상형의 배가 유도됨을 밝힌 바 있으며, Stuart 등(1985)은 alfalfa의 조직배양시 아미노산의 일종인 L-glutamine을 처리하면 나팔모양의 배가 유도되었다고 보고하였다.

구상형, 심장형, 어뢰형 및 자엽형시기의 배를 각각 0.2 mg/l의 BA첨가배지에 1주간 현탁배양한 후, 이를 1주간 생장조절물질이 제거된 배지에 현탁배양한 결과, 정상자엽의 형성

률은 각각 7.6, 15.6, 73.7%로 발생시기에 따라 뚜렷한 차이를 보이며, 다자엽의 형성률은 각각 92.4, 82.4, 26.3%로 어린시기에 처리할 수록 높은 비율을 나타내었다. 또한, 모든 처리구에서 배축과 뿌리는 비대하였으며, 2차배가 형성되었는데, 특히 구상형 시기의 경우에는 다른 시기의 경우에 비하여 2차 배의 형성이 많이 일어났다(Table 3).

본 실험에서 배발생 단계중 발생초기(구상형배 시기)에 cytokinin을 처리했을 때 다자엽의 형성률이 높은 것은 이시기에는 자엽원기의 분화가 이루어지지 않았을 뿐아니라(Kysely et al., 1990; Kim et al., 1992), 내재 cytokinin의 양이 많기 때문에 (Ernst et al., 1984), 외래 cytokinin을 처리하면 세포분열이 더욱 촉진되어 심장형의 배로 발달되면서 자엽원기가 형성될 때 다자엽의 형성이 높아지는 것으로 추정된다.

적 요

어수리의 미숙배로부터 체세포배 형성시 자엽의 수적변이에 미치는 cytokinin의 영향을 조사하였다. 구상형배에 0.2 mg/l의 BA, Zip,

Table 3. Cotyledonary variation of somatic embryos cultured in the basal medium after one week culture of somatic embryos at various stages on 0.2 mg/l BA medium

Frequesncy(%)	Stage of embryos ^a			
	Globular Heart	or Torpedo	Cotyledonary	
cotyledon	Di	7.6±0.6	15.6±1.8	73.7±2.2
	Poly	92.4±0.6	82.4±1.8	26.3±2.2
Root-hypocotyl axiss	welling	swelling	swelling	

^a Each value represents the mean±SE.

kinetin을 각각 처리하여 2주간 배양하였을 때, 다자엽의 형성률은 각각 84.9, 42.6, 32.9%로서 대조구(25.2%)에 비하여 BA > 2ip > kinein 순으로 높았으며 특히 BA 처리시에 가장 높게 나타났다. 또한 BA를 농도별(0, 0.01, 0.05, 0.1 mg/l)로 배발생세포기에 2주간 처리하였을 때, 다자엽의 형성율은 각각 23.3, 39.7, 69.4, 74.4%로서 농도가 높을수록 증가하는 경향이였다. 0.2 mg/l의 BA를 구상형, 심장형 또는 어뢰형, 자엽시기의 배에 2주간 처리한 경우에 다자엽의 형성률은 각각 92.4, 84.4, 26.3%로서 배발생 초기에 처리될 경우에 더욱 높게 나타났다.

참 고 문 헌

1. Ammirato, P. V. 1974. The effects of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway (*Carum carvi* L.). *Bor Gaz.* 135: 328-337
2. Ammirato, P. V. 1977. Hormonal control of somatic embryo development from cultured cells of caraway. Interactions of abscisic acid, zeatin and gibberellic acid. *Plant Physiol* 59: 579-586
3. Ammirato, P. V. 1985. Patterns of development in culture. In RR Henke, Hughes KW, Constantin MP, Hollanender A, eds, *Tissue Culture In Forestry and Agriculture*, Plenum Press Corporation. New York. 9-29p.
4. Ammirato, P. V. 1987. Organizational events during somatic embryogenesis. In CE Green et al., eds, *Plant Tissue and Cell Culture*, Alan R. Liss Inc. New York. 57-81p.
5. Ernst, D., Oesterheld, D., & Schafer, W. 1984. Endogenous cytokinins during embryogenesis in an anise cell culture (*Pimpinella anisum* L.). *Planta* 61: 240-245
6. Kageyama, C., Komatsuda, T., & Nakajima, K. 1990. Effects of sucrose concentration on morphology of somatic embryos from immature soybean cotyledons. *Plant Tissue Culture Letters* 7: 108-110
7. Kim, Y. S., Cho, D. Y., & Soh, W. Y. 1992. Protein analysis and structural aspect during somatic embryogenesis in *Oenanthe javanica*. *Korean J Plant Tissue Culture* 19: 23-28
8. Kysel, W. & Jacobsen, H. J. 1990. Somatic embryogenesis from pea embryos and shoot apices. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 20: 7-14
9. Lee, K. S. & Soh, W. Y. 1993. Somatic embryogenesis and structural aberrancy of embryos in tissue cultures of *Aralia cordata* Thunb. *Korean J Plant Tissue Culture* 20: 77-83
10. Navarro, L., Ortix, J. M., & Juarez, J. 1985. Aberrant citrus plants obtained by somatic embryogenesis of nucelli cultured in vitro. *HortScience* 20: 214-215
11. Smith, D. L. & Krikorian, A. D. 1990. pH control of carrot somatic embryogenesis. In HJJ Nijkamp, LHW Van der plas, J Van aartrijk, eds, *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, Kluwer

- Academic Publishers, Dordrecht, pp449-453.
12. Soh, W. Y., Yeo, U. D. & So, S. S. 1990. Artificial seed production and somatic embryo- genesis from the cultured cells of *Cedrela sinensis* Juss. Korean J Plant Tissue Culture 17: 231-238
 13. Stuart, D. A., Nelson, J., Strickland, S. G., & Nichol, J. W. 1985. Factors affecting develo- pmental processes in alfalfa cell cultures. In RR Henke et al., eds, Tissue Culture in Forestry and Agriculture Plenum Press. New York. 59-73p.