

## 한라산 자생 왕벚나무의 미성숙 접합자배로부터 직접 체세포배 발생을 통한 식물체 재생

고정균<sup>1,2)</sup>, 오순자<sup>1)</sup>, 김응식<sup>3)</sup>, 김문홍<sup>1)</sup>, 고석찬<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>제주대학교 생물학과, <sup>2)</sup>한라산국립공원, <sup>3)</sup>서남대학교 생물학과

### Plant Regeneration through Direct Somatic Embryogenesis from Immature Zygotic Embryo of *Prunus yedoensis* in Mt. Halla

Jung Goon Koh<sup>1,2)</sup>, Soon Ja Oh<sup>1)</sup>, Eung Sik Kim<sup>3)</sup>, Moon Hong Kim<sup>1)</sup>, and Suck Chan Koh<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Biology, Cheju National University, Cheju, 690-756

<sup>2)</sup>Mt. Halla National Park, Cheju, 690-200

<sup>3)</sup>Department of Biology, Seonam University, Namwon, 590-711, Korea.

#### ABSTRACT

Two types of somatic embryos were directly induced from the immature zygotic embryos of the wild *Prunus yedoensis* in Mt. Halla after 16 weeks of culture on MS medium supplemented with 0.1 mg/L GA<sub>3</sub> and 0.1mg/L BAP or 0.5mg/L GA<sub>3</sub> and 0.1mg/L BAP. One was normal single embryo with a radicle attached to cotyledons and the other was abnormal multicotyledonary embryo with a single basal part. Normal somatic embryos germinated successfully on 1/2 MS medium. However, abnormal multicotyledonary somatic embryos, formed shoots only on hormone free MS medium and about 80% of shoots rooted on MS medium with 0.5mg/L IBA. The maximum frequency(62.5%) of normal somatic embryos was directly obtained from the zygotic embryo 30 days after full blooming but it was decreased with further maturation.

**Key words:** *Prunus yedoensis*, immature zygotic embryo, direct somatic embryogenesis, GA<sub>3</sub>, BAP

#### 서론

한라산의 왕벚나무(*Prunus yedoensis*)는 재배 왕벚나무와 함께 그 기원과 자생지에 대한 논의가 끊임 없이 제기되고 있는 수종이다. 그리고 천연기념물로 지정 보호되고 있는 한라산 자생 왕벚나무는 자원적 가치성은 높으나 개체수가 극히 한정되어 있어, 유전 자원 보존과 자원화를 위하여 효율적인 증식방법의 개발이 요구되고 있다.

이러한 연구는 최근에 영양아를 이용한 기내 증식(Kim 등, 1993)과 미숙배에서 캘러스 유도에 이은 체

세포배 발생을 이용한 식물체 재분화(Koh 등, 1997) 등이 보고된 바 있다. 하지만 영양아를 이용한 증식 방법은 클론증식에 주로 이용되고 있으나 한라산 자생 왕벚나무는 개체수와 증식시기가 한정되어 있어 다량증식에 한계가 있으며, 배발생 캘러스를 통한 식물체 재분화는 유전적 변이가 초래될 가능성이 있을 뿐 아니라 체세포배 형성에 상당한 시간이 소요되고 체세포배 발생률이 낮다. 따라서 보다 안정되고 재현성이 있는 고빈도의 체세포배를 발생시키기 위한 체계를 확립할 필요가 있다. 이를 위해서 증식방법을 단순화하면서 배양기간 동안의 변이를 최소화하고 단기간 내의 증식으로 공간 활용도를 높이기 위하여,

이 연구는 1996년도 교육부의 기초과학연구소 학술연구조성비 지원(BSRI-96-4446)에 의한 연구 결과의 일부임.

직접 체세포배 발생이나 다량의 신초를 직접 유도시키는 방법이 이루어지고 있다(Denchev 등, 1991; Denchev 등, 1993).

따라서 본 연구에서는 왕벚나무의 배발생 연구를 위한 기초를 마련할 뿐 아니라, 기내에서 직접적인 체세포배를 유도하여 이를 재분화시킴으로써 보다 효율적인 대량 증식체계를 제시하고자 하였다.

## 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 3 회 이상 세척하고, 70% 에탄올에 1분 동안 살균시킨 뒤 멸균 증류수로 4~5회 세척하였다. 표면 살균된 종자는 횡단으로 자른 뒤 접합자배만을 분리하여 실험재료로 사용하였다.

본 실험에 사용한 배지는 MS 기본배지(Murashige와 Skoog, 1962)에 3% sucrose, 0.8% 한천을 첨가하였고 pH를 5.8로 조정하여 121℃의 고압증기멸균기에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 배양조건은 25±2℃의 배양실에서 2,500 lux의 형광등하에서 광주기가 16/8인 조건으로 배양하였다.

### 직접 체세포배의 유도 및 식물체의 재생

GA<sub>3</sub>(0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0mg/L)와 BAP(0.1mg/L)가 조합 처리된 MS 배지에 미성숙 접합자배를 접종하여 캘러스의 유도과정을 거치지 않고 체세포배를 직접 유도하고, 접종 16주 후 각 처리구에서 체세포배 발생 여부를 조사하였다. 형성된 체세포배는 형태적인 특징에 따라 정상적인 체세포배와 비정상적인 체세포배로 구분하였다. 즉, 2개의 자엽을 갖는 체세포배로 발달하는 구형 또는 심장형의 체세포배를 정상적인 체세포배로, 3개 이상의 다자엽구조를 갖는 체세포배를 비정상적인 체세포배로 구분하여 조사하였다. 또한 동일한 절편체내에서 정상적 또는 비정상적인 체세포배가 동시에 형성되는 경우는 발생빈도가 높은 체세포배를 기준으로 구분하여 판단하였다.

2개의 자엽을 갖는 형태로 발달한 정상적인 체세포배는 1/2 MS 배지에서 발아를 유도시켰으며, 나팔

형 또는 다자엽 구조를 갖는 비정상적인 체세포배는 식물생장조절제가 첨가되지 않은 MS 배지에 계대배양하여 신초를 유도하고, 이들 신초는 일정 크기로 자른 뒤 0.5mg/L IBA가 첨가된 MS 배지에 옮겨 뿌리 형성을 유도하였다.

### 접합자배 발달단계별 체세포배 형성능의 변화

만개 후 15, 30, 45, 90 일된 종자로부터 절취한 접합자배를 0.5mg/L GA<sub>3</sub>와 0.1mg/L BAP가 처리된 배지에서 체세포배를 직접 유도시켜 종자성숙 단계별 접합자배로부터 체세포배의 직접적인 발생을 비교하였다.

## 결과 및 고찰

### 체세포배 발생

왕벚나무 만개 후 45일된 종자에서 분리한 접합자배를 다양한 농도의 GA<sub>3</sub>와 0.1mg/L BAP가 조합 첨가된 MS 배지에서 배양한 결과(표1) 다양한 형태의 체세포배가 직접 발생되었다. 체세포배의 발생은 0.1mg/L GA<sub>3</sub>와 0.1mg/L BAP가 처리된 배지에서 93.3%로 높게 발생된 반면 1.0mg/L GA<sub>3</sub>와 0.1mg/L BAP가 처리된 배지에서는 60.0%로 비교적 낮은 발생율을 보여 처리구간에 차이를 보였다. 또한 형성된 체세포배는 GA<sub>3</sub>의 농도에 따라 형태적으로 많은 차이를 보여, 0.1mg/L GA<sub>3</sub>와 0.1mg/L BAP, 0.5mg/L GA<sub>3</sub>와 0.1mg/L BAP가 첨가된 배지에서는 캘러스 형성과정 없이 정상적인 구형 또는 심장형의 체세포배가 각각 43%와 58%의 비율로 발생되었으며(그림 1-A), 나팔 모양 또는 다배형태의 비정상적인 체세포배의 비율도 42~57%로 나타났다(그림 1-B). 이들 처리구 이외의 비

Table 1. Direct somatic embryogenesis from immature embryos of *Prunus yedoensis* after 16 weeks of culture.

Plant growth regulator (mg/L)		SE <sup>1</sup> induction (%)	Normal SE rate (%)	Abnormal SE rate (%)	Callus rate (%)
GA <sub>3</sub>	BAP				
0.1	0.1	93.3	42.9	57.1	-
0.5	0.1	80.0	58.3	41.7	-
1.0	0.1	60.0	-	33.3	66.7
2.0	0.1	80.0	-	75.0	25.0
4.0	0.1	73.3	-	100	-

<sup>1</sup>SE: Somatic embryo

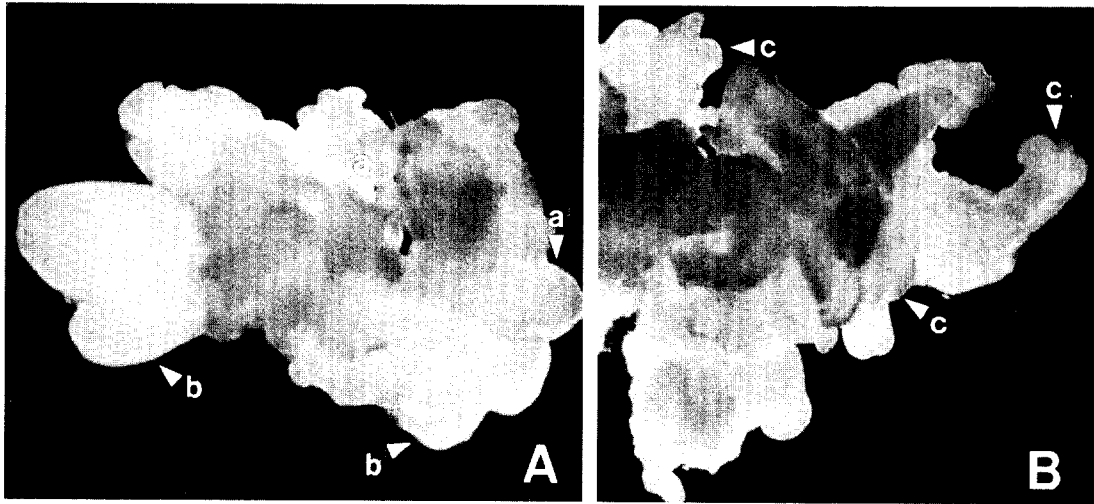


Figure 1. Direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryo of *P. yedoensis*.  
 (A) Globular stage(a) and heart-shaped somatic embryos(b), (B) Multicotyledonary embryos(c).

교적 높은 GA<sub>3</sub> 농도(1.0~4.0mg/L)에서는 체세포배가 발생되었으나 대부분 비정상적인 다자엽구조의 체세포배 또는 비배발생 캘러스의 형태로 발달하였다. 즉, 이들 비정상적인 체세포배는 배축과 유근이 한 개의 구조를 보이지만 배축 상부는 다수의 배로 구성되어 있어서 서로 분리될 수 없는 상태로 발달하였다(그림 2-A). 그리고 정상적으로 발달하는 체세포배는 전보(Koh 등, 1997)에서 배발생 캘러스로부터 유도된 정상적인 체세포배가 발달하는 과정과 같이 구형, 심장형, 어뢰형을 거쳐 자엽단계의 배로 발생되었다(자료 미발표). 그러나 다자엽 구조의 비정상적인 체세포배는 초기발생부터 다수의 세포가 분열을 시작하고 구형단계와는 크게 구분이 되는 커다란 돌기로 자란 다음 이로부터 여러개의 융합된 배가 형성되었다. 또한, GA<sub>3</sub>의 농도가 증가하면서 비정상적인 체세포배의 발생률이 높아지는 것은 고구마 체세포배를 BA 및 GA<sub>3</sub> 복합 처리된 배지에 배양하는 경우는 BA 농도간에 큰 차이는 없었으나 GA<sub>3</sub> 농도에는 다소 차이가 있었다는 보고로 볼 때(Lee 등, 1994) GA<sub>3</sub>의 농도가 크게 작용한 것으로 판단된다. 그러나 지금까지 체세포배를 직접 발생시키는데 BA 등 시토키닌이 주로 이용되어 왔던 것으로 보아, BAP가 체세포배 발생 초기에 관여한 뒤 GA<sub>3</sub>가 촉진효과를 주었을 것으로 사료된다.

#### 기관발생

전보(Koh 등, 1997)에서 2,4-D와 BAP의 조합처리에 의해 유도된 배발생 캘러스가 정상적인 체세포배를 형성하고 정상적으로 식물체 재분화가 이루어진 것처럼 본 연구에서 GA<sub>3</sub>와 BAP의 조합처리에 의해 직접 형성된 정상적인 체세포배도 1/2 MS 배지에서 정상적인 식물체로 재분화가 이루어졌으나(자료 미발표), 다자엽구조를 갖는 비정상적인 체세포배는 발아능력을 보이지 않아 정상적인 식물체로 재분화되지는 않았다. 그러나, 비정상적인 체세포배는 식물생장조절제가 첨가되지 않은 MS 배지에서 계대배양하면 16주 이후부터 신훈초가 다수 발생되었고(그림 2-B, C), 이들 신훈초는 0.5mg/L IBA가 첨가된 MS 배지에 옮겨 배양하면 80% 이상이 뿌리가 형성되어 정상적인 식물체로 발달하였다(그림 2-D).

이러한 결과는 나팔형 또는 다자엽구조를 갖는 체세포배는 발아능력이 없거나 아주 낮은 발아능력을 갖는다는 보고와 유사하나(Choi 등, 1994; Moon 등, 1994; Soh 등, 1996), 당근에서 2,4-D에 의해 유도된 나팔형 체세포배가 생장조절물질이 첨가되지 않은 1/2 MS 배지에서 유근으로부터 뿌리가 신장되면서 자엽도 확대되었지만 경엽부의 발생은 일어나지 않고 점차로 갈변되었다는 보고와는 상반된다(Soh 등, 1996),



Figure 2. Plant regeneration from multicotyledonary embryos induced directly from immature zygotic embryos of *P. yedoensis*. (A) Multicotyledonary embryos. (B, C) Adventitious shoot formation. (D) Rooting of individual shoots.

이는 GA와 BAP에 의해 발생된 나팔형 또는 다자엽 구조의 체세포배는 2,4-D에 의해 유도된 비정상적인 체세포배와는 기관형성능이 전혀 다른 것으로 판단되었다.

#### 접합자배 발달단계별 체세포배 형성능의 변화

체세포배 발생은 배양식물의 종, 치상조직의 종류와 그의 생리적 성질이 가장 중요한 요인이 되고 있다. 또한 체세포배의 기원이 단세포 또는 다세포로부터 이루어지는 것은 배양재료에서 배형성능을 지닌 세포가 인접한 주변세포들 사이에 독립적으로 존재하느냐 아니면 서로 이웃하여 같이 존재하느냐에 따라 달라질 것으로 추측하고 있으며, 이러한 경향은

배양재료의 성숙정도 또는 같은 배양재료일지라도 부위별 세포의 분화정도에 따라 크게 영향을 받는 것으로 알려지고 있다(Williams와 Maheswaran, 1986). 이를 알아보기 위하여 왕벚나무 미성숙 종자를 생육 단계별로 채취하고 배를 절취하여 직접적인 체세포배를 유도하고 비교하였다(그림 3). 체세포배의 직접 유도율은 만개 후 15일부터 45일된 종자의 배에서 80~83%의 발생을 보여 차이가 없었으나 90일된 종자의 배에서는 50%로 낮아졌다. 그러나 형성된 체세포배를 정상적인 체세포배와 비정상적인 체세포배로 구분하면, 정상적인 체세포배 유도율은 만개 후 30일된 종자의 배에서 62.5%가 직접 발생되었고, 90일된 종자의 배에서는 37.5%의 발생을 보여 배가 성숙

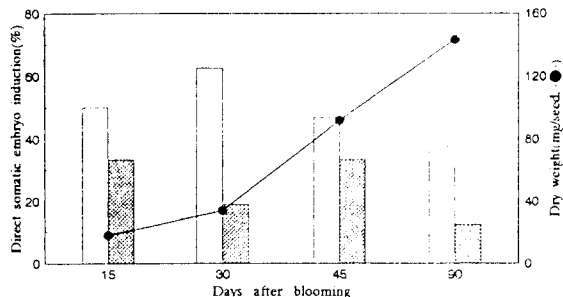


Figure 3. Direct induction of normal(□) and abnormal(■) somatic embryos from immature embryo in various stages of seed development in *P. yedoensis* after 16 weeks of culture.

할수록 정상적인 체세포배 발생은 점차 낮아졌으며, 비정상적인 체세포배의 발생률은 12.5~33.3%로 성숙시기에 따라 다소 차이가 발생되었다. 이는 왕벚나무 미성숙 접합자배에서 배발생 캘러스 형성능은 종자가 발달함에 따라 점차 증가하여 45일된 종자에서 60.0%로 가장 높았다는 보고로 볼 때(Koh 등, 1997), 체세포배의 직접 발생도 배발생 캘러스 형성능과 같이 종자의 성숙시기에 따라 차이가 있음을 알 수 있다. 이러한 결과는 미성숙한 접합자배를 이용한 체세포배 발생시 접합자배의 발달정도가 중요한 요인으로 작용된다고 판단된다. 이는 체세포배가 식물조직편 자체에서 생겨나건 캘러스 세포에서 생겨나건 그 세포가 먼저 배발생의 잠재력을 가지고 있어야 하며, 이렇게 된 세포는 배지조성이나 배양조건 여하에 따라 배로 발달하기도 하고 억제되기도 하는 것으로 보인다.

## 적 요

한라산에 자생하는 왕벚나무(*Prunus yedoensis*)의 미성숙 접합자배로부터 체세포배를 직접 유도할 수 있었으며, 이들 직접 체세포배로부터 식물체를 재분화시킬 수 있었다. 0.1mg/L GA<sub>3</sub>와 0.1mg/L BAP 또는 0.5mg/L GA<sub>3</sub>와 0.1mg/L BAP가 첨가된 배지에서는 캘러스가 형성되지 않고 80~93%로 체세포배가 직접 발생하였으며, 그 중 정상적인 구형 또는 심장형의 체세포배 비율은 43~58%, 자엽상의 비정상적인 체세포배 비율은 42~57%로 나타났다. 자엽상의 비정상적인 체세포배는 성장조절물질이 첨가되지 않은

MS 배지에 계대배양하면 16주 이후부터 신초가 다수 발생되었고, 이들 신초들은 0.5mg/L IBA가 첨가된 MS 배지에서 80% 이상의 발근을 보여 정상적인 식물체로 발달하였다. 또한 종자 성숙 시기에 따라서 정상적인 체세포배는 만개 후 30일된 종자의 접합자배에서 전체 62.5%가 직접 발생되었으나 45일된 종자의 배에서는 37.5%가 발생되어 종자가 성숙할수록 체세포배의 직접적인 유도율은 점차 낮아졌다.

## 인 용 문 헌

- Choi P.S., Soh W.Y., Cho D.Y., Liu J.R. 1994. Somatic embryogenesis in immature zygotic embryo culture of Korean soybean(*Glycine max* L.) cultivars and effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on somatic embryo morphology. *Korean J. Plant Tissue Culture* 21:7-13.
- Denchev P.D., Kuklin A.I., Atanassov A.I., Scragg A.H. 1993. Kinetic studies of embryo development and nutrient utilization in an alfalfa direct somatic embryogenic system. *Plant Cell, Tissue and Organ Cultures* 33:67-73.
- Denchev P.D., Velcheva M.R., Atanassov A.I. 1991. A new approach for direct embryogenesis in *Medicago*. *Plant Cell Rep.* 10:338-341.
- Kim C.S., Koh J.G., Cho R.M. 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.
- Koh J.G., Park Y.C., Yang D.Y., Kim E.S., Oh M.Y., Koh S.C. 1997. Plant regeneration and somatic embryogenesis from zygotic embryo-derived callus of native *Prunus yedoensis* in Mt. Halla. *Korean J. Plant Tissue Culture*. 24:345-349.
- Lee E.M., Fujioka S., Sakurai A., Moon C.S., Roh T.H. 1994. Effects of growth regulators on plant regeneration in shoot-tip-derived embryogenic callus cultures of sweet potato(*Ipomoea batatas*). *Korean J. Plant Tissue Culture* 21:281-286.
- Moon Y.H., Kim S.K., Choi S.B., Lee K.W. 1994. Plant regeneration of soybean cultivars via somatic

- embryogenesis. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Soh W.Y., Cho D.Y., Lee E.K. 1996. Multicotyledonary structure of somatic embryos formed from cell cultures of *Daucus carota* L. *J. Plant Biol.* 39:71-77.
- Williams E.G., Maheswaran G. 1986. Somatic embryogenesis : Factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.* 57:443-462.