

흰제비꽃 배양세포에 있어서 분화세포와 미분화세포 조직의 비교 관찰

정용모 · 손병구¹ · 이재현² · 서정해³ · 정정한² · 권오창²

경남농업기술원 화훼시험장, ¹밀양대학교 원예학과, ²동아대학교 생명자원과학부, ³경남정보대학 환경조경과

Histological Observation of Embryogenic and Non-embryogenic Callus in Long-term Subculture of Wild Viola (*Viola patrinii* DC.)

CHUNG, Yong-Mo · SON, Beung-Gu¹ · LEE, Jai-Heon² ·
SUH, Jung Hae³ · CHUNG, Chung Han² · KWON, Oh-Chang^{2*}

¹Floricultural Experiment Station, Kyongnam ARES, Changwon, 641-920, Korea

²Department of Horticulture, Miryang National University, Miryang, 627-130, Korea

³Faculty of Natural Resources and Life Science, Pusan, 604-714, Korea

⁴Department Environment Landscape Architecture, Kyungnam College of Information & Technology,
Pusan, 617-701, Korea

ABSTRACT To obtain a basic information on the development of Genus *Viola*, morphological and histological observation of in vitro calli and cells in *Viola* culture cells were investigated. There were two callus types obtained by long term subculture of wild viola (*Viola patrinii* DC.) petiole callus. One was friable callus - soft and pale green in color and small cells in size, and the other was compact callus - compact and deep bluish green in color, large cells in size. In scanning electron microscopic observation, friable callus was composed of voculated cell around small cell clump, while compact callus was composed of cells filled with protoplasm. Somatic embryogenesis was observed from suspension culture of the compact callus.

Key words : compact, friable, somatic embryo, suspension culture

서 론

제비꽃속은 각 대륙에 널리 분포되어 있으며 특히 남 북반구 온대지방에 자라며 우리 나라 전국 산야에도 광범위하게 자생, 분포하는 제비꽃과에 속하는 다년생 초본성 식물이다. 우리 나라에 자생하는 야생 제비꽃속 식물들은 다양한 환경의 자생지에 적응하여 생존해 온 관계로 광에 대한 민감한 반응을 보여 양지성, 반음지성, 음지성의 종들이 속내에 혼재하며, 그 종류 및 화색이 다양하고 초세, 엽형, 내한성, 내음성

등의 유용한 형질을 가진 식물로서 화훼원에 작물로서의 개발 가능성이 높으나, 일장과 온도에 민감한 반응을 보여 개화 (Chasmogamous flower)와 폐화 (Cleistogamous flower)가 함께 존재하는 결점이 있다. 그러나 내서성이 있기 때문에 팬지의 결점을 보완할 수 있을 것으로 판단되며, 화단용으로 개발 가치가 높다고 생각된다. 국내 자생 제비꽃의 개발을 위하여 최근 callus로부터 식물체 재생 (Sato et al. 1995), 잡종식물 창출을 위한 원형질체 융합조건 (Kwon et al. 1992a), 융합세포의 미세구조 관찰 (Kwon et al. 1992b), 그리고 분류와 육종을 위한 RAPD기법의 이용 (Oh et al. 1998; Ko et al. 1998) 등 생명공학적인 기법을 이용한 연구까지 다양하게 진행되고 있다.

본 연구는 우리 나라 각지의 산야에 자생하고 있는 야생

*Corresponding author. Tel 051-200-7500
E-mail ockwon@mail.donga.ac.kr

제비꽃 중 장일성이며 양지생육이 왕성한 흰제비꽃 (*Viola patrinii* DC.)을 이용하여 원예재배용으로 개량하기 위한 기초 자료를 얻기 위하여, 야생 흰제비꽃의 엽병으로부터 얻은 callus를 장기간 계대배양하는 과정에서 구분되어 성장한 friable callus와 compact callus의 조직적 특성을 구명하기 위하여 이들 세포조직의 형태적 차이를 광학 및 주사전자현미경으로 비교관찰하였으며, 또한 compact callus의 계대배양에 의한 체세포배발생에 관하여 광학현미경으로 관찰하였다.

재료 및 방법

Callus 배양

Callus 증식배지는 Murashige and Skoog (1962) 기본 배지에 thiamin 1 mg/L, Fe-EDTA 78.4 mg/L, myo-inositol 200 mg/L, sucrose 30 g/L, casein hydrolysate 3 g/L, 환천 8 g/L를 첨가하여 pH 5.8로 조절하였다. 식물생장조절제로는 NAA 5×10^{-6} M + Kinetin 5×10^{-7} M을 혼용하여 첨가하였고, 배양 환경은 16시간 광과 8시간 암 주기의 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에 광도 3,000 lux로 하였다.

해부학적 관찰

조직의 검경은 5% glutaraldehyde (0.05 M phosphate buffer pH 7.2)에 1차 고정된 다음, 동 buffer solution에 수세한 후 2% OsO₄에 2차 고정하였다. 그 후 증류수에 수세한 다음 acetone series (30% ~ 100%)에 탈수하여 supurr's resin에 포매하여 glass knife를 이용하여 95 μm로 절단 (Ultracut UCT, Reica)하였다. 염색은 1.5%의 Na₂CO₃와 0.5% toluidine blue로 염색한 다음 영구표본을 만들어 광학현미경 (BH2, Olympus)으로 관찰하였다 (Chung et al. 1997).

주사전자현미경 시료조제

주사전자현미경 시료조제는 friable callus와 compact callus를 급속동결법으로 액체 질소에 동결한 후 주사전자현미경 (S-4200, Hitachi, 가속전압 15 Kv)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

야생 흰제비꽃의 엽병으로부터 얻은 callus (Kwon et al. 1992)를 계대배양하는 과정에서 두 가지의 callus, 즉 friable callus와 compact callus로 분류되었다. Friable callus (Figure 1-A)는 연녹색으로 부서지기 쉽고 부드러우며 분화

되지 않는 callus이고, compact callus (Figure 1-B)는 진녹색으로 단단하며 분화가 용이한 callus로 각각 구분되었다.

이들 callus의 표면의 특징은 friable callus는 작은 세포집단으로 이루어진 세포군의 주변부에 고도로 액포화된 세포가 광범위하게 분포되어 있는 반면 (Figure 2-A), compact callus는 거의 균일한 세포들로 구성되어 세포구성이 치밀한 것 (Figure 2-B)으로 관찰되었다. 또한 종단면으로 절단한 후 관찰하였을 때, sieving 하기 전의 friable callus는 액포화가 심한 반면 (Figure 3-A, B), sieving 하여 현탁배양한 후의 compact callus는 세포질이 충만하며 액포가 적었다 (Figure 3-C, D).

Compact callus로서 분열이 왕성한 세포는 세포질 내용물의 합성이 왕성하여 미토콘드리아나 리보솜의 수가 증가하고 액포는 작고 세포내의 원형질도 풍부한 것으로 알려져 있다 (Sutton-Jones and Street 1968). 이러한 조건을 갖춘 야생 흰제비꽃의 compact callus에서의 식물체 재생은 MS기본 배지를 1/2로 희석하였을 때 분화율이 높았으며, 이때의 배지내의 질소 급원으로는 NH₄⁺와 NO₃⁻의 증비보다도 1/2 KH₂PO₄에서 높은 분화율을 보인 것으로 보고된 바 있다 (Sato et al. 1995). 본 실험에서도 표면미세구조와 조직검경에

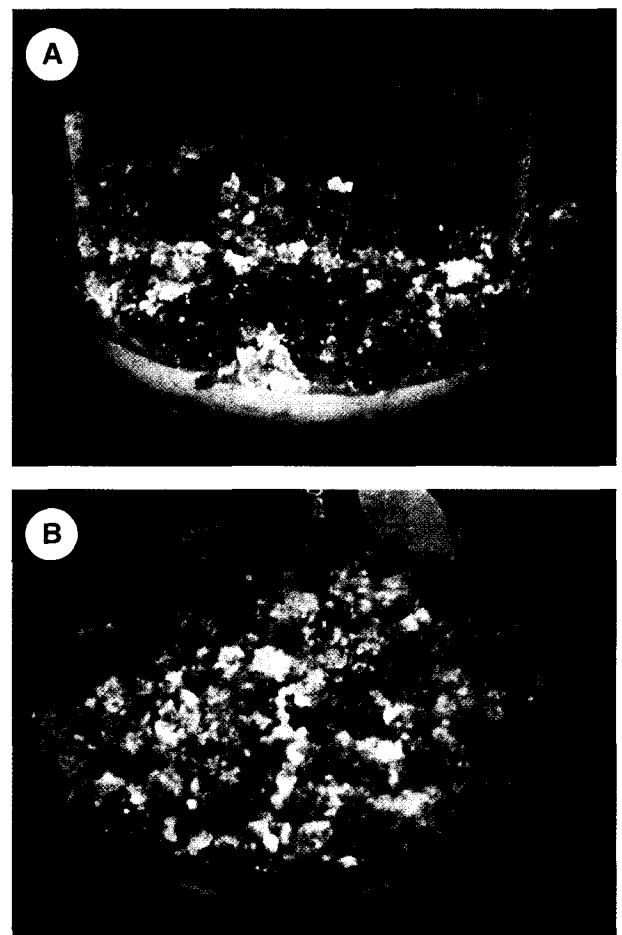


Figure 1. Friable callus (A) and compact callus (B) induced from petiole segment of *Viola patrinii* DC.

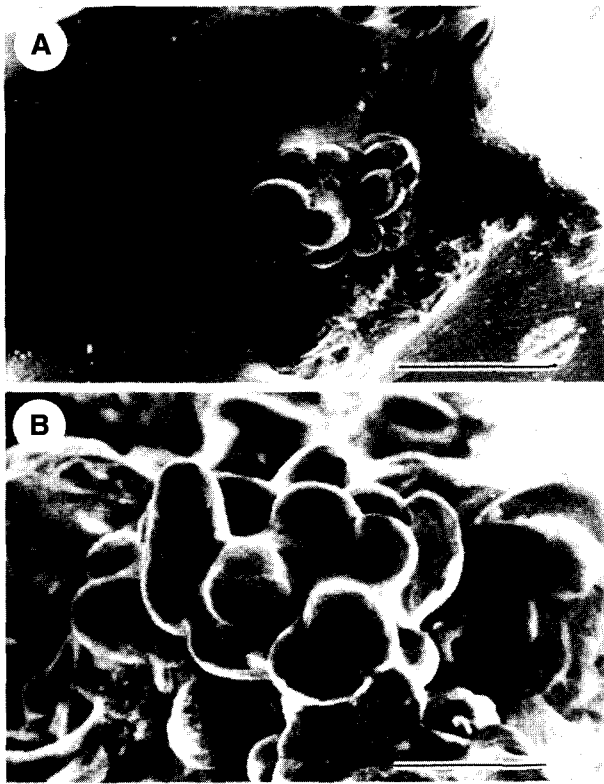


Figure 2. Scanning electron microscopic observation on surface of friable callus (A) and compact callus (B) (Bar : 150 μ m).

서 관찰한 바와 같이 compact callus는 friable callus보다 분열이 왕성하며 세포질이 충만한 것으로 관찰되었는데, 이와 같은 세포의 특징으로 말미암아 분화와 미분화가 조절되는 것으로 추정된다.

Friable callus와 compact callus로부터의 체세포배 형성을 관찰한 결과 (Figure 4), callus mass에서 구형의 배가 발생 (Figure 4-A)하여 성장하면서 심장형 (Figure 4-B)을 거쳐 배양 기간이 지남에 따라 식물체로 분화하였다 (Figure 4-C, D).

Compact callus의 성장과정 중 체세포배 형성의 조직관찰 결과 (Figure 5), callus mass의 세포질이 보다 충만한 부위에서 배유사체 (embryo like body)의 발생이 이루어졌으며 (Figure 5-A, B). 또한 callus mass 내의 세포질이 충만한 부위에서 체세포배가 형성 (Figure 5-C, D)되는 것을 관찰할 수 있었다.

식물체로부터의 체세포배 생산에 관하여서는 구기자나무의 경우, 엽육 callus로부터의 배발생 callus를 현탁배양함으로써 대량의 체세포배를 생산할 수 있었고 (Kim et al. 1993), 글라디올러스는 자구의 절편체로부터 배발생 callus의 유도 후 현탁배양에 의하여 체세포배를 발생시킨 후 식물체를 재생시킬 수 있었으며 (Remotti 1995), 카네이션의 경우는 줄기 절편배

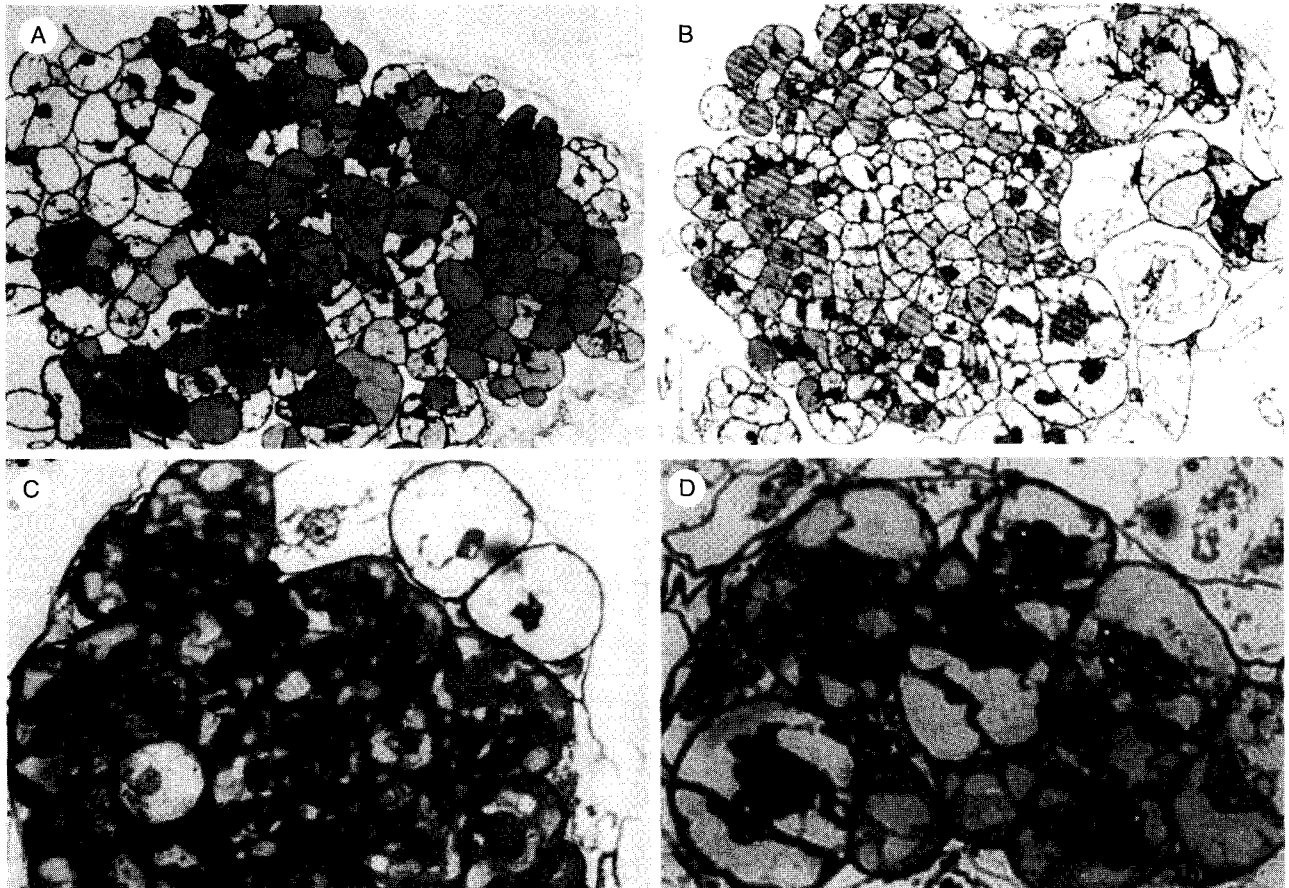


Figure 3. Embryonic cell clumps formed after suspension culture of friable callus (A: $\times 80$, B: $\times 100$, C and D: $\times 160$). (A, B) Friable callus before sieving suspension culture; (C, D) Compact callus after sieving suspension culture.

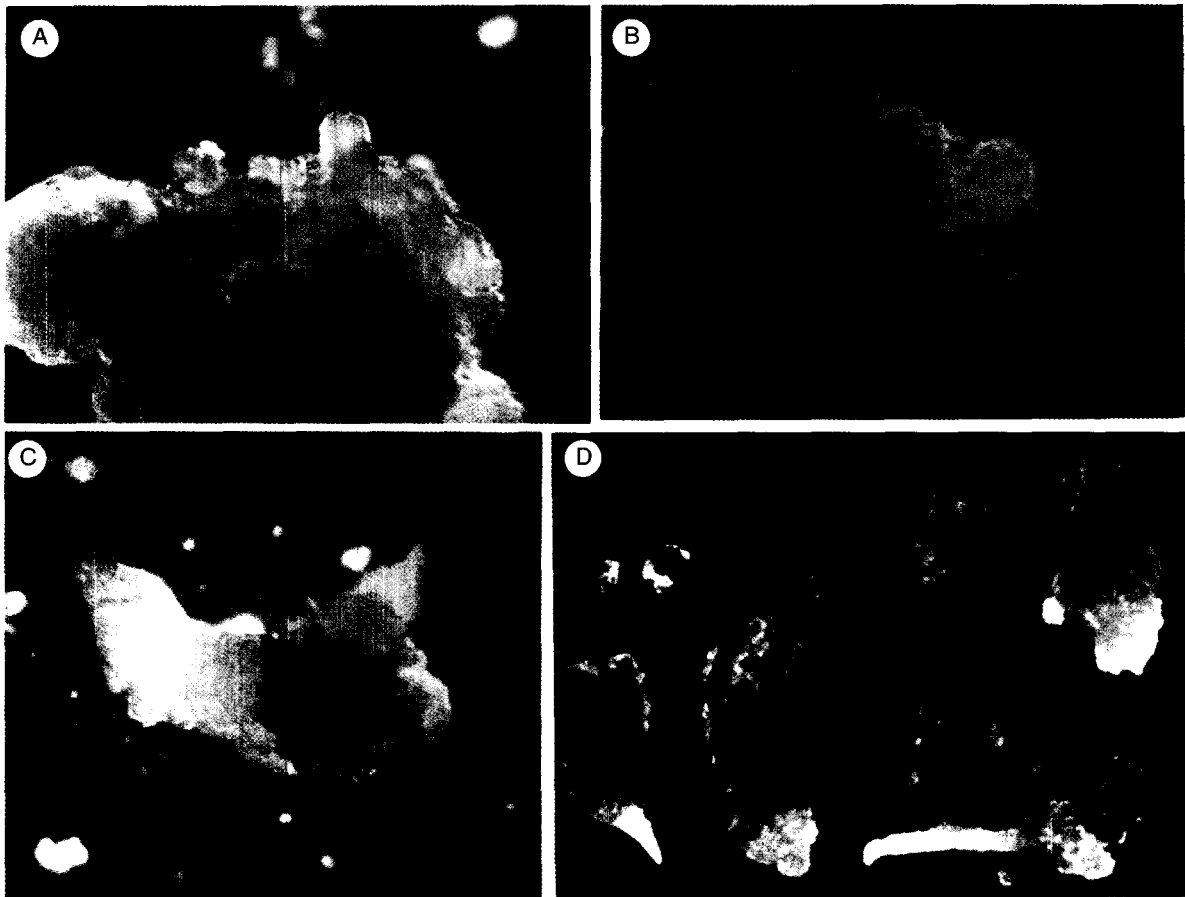


Figure 4. Early stage of somatic embryogenesis from embryogenic callus of wild viola (*V. patrinii* DC.) (A) Globular stage of embryo ($\times 100$); (B) Heart stage of embryo ($\times 80$); (C) Multifol somatic embryos ($\times 40$); (D) Several stages of somatic embryogenesis in suspension culture of compact callus.

양 20~25일 후의 friable callus를 현탁배양 60~75일 후 체세포배 형성과 소식물체 형성을 관찰할 수 있었다 (Choudhary and Chin 1995). 그리고 Buiteveld 등 (1994)은 부추의 미숙배에서 유도된 callus의 광학현미경 관찰 결과, friable callus는 식물체 분화는 되지 않으나 배형성능 callus를 함유하고 있으며, compact callus는 관다발 조직을 포함하는 정단 분열조직으로 발달됨을 비교 설명하였다. 또한 Ozawa와 Komanine (1989)는 벼의 미숙배에서 유래된 callus를 현탁 배양을 통하여 18개월 동안이나 유지할 수 있는 고빈도 체세포배 형성의 시스템을 확립하였다.

이상의 경우와는 달리 체세포배형성에 있어서 절편체에서 직접 배가 생길 경우가 있는데 이는 원래 치상 절편체가 배형성능을 가지고 있으므로 이때의 성장조절물질의 역할은 배발생을 자극할 뿐이며 (Ammirato 1983), 당근의 접합자배에서의 경우 성장조절물질을 첨가하지 않았을 때도 체세포배가 발생되었다 (Smith and Krikorian 1989). 이와 같은 서로 다른 견해는 체세포배의 기원 및 발생 양상이 식물의 종과 배양 절편체의 종류에 따라 다르게 나타나는데 기인하는 것이며 (Lu and Vasil 1982; Wang and Phillips 1984), 이는 식물체의 종류 및 채취시기에 따라 내생 호르몬의 함량이 다르기 때문일 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 야생 흰제비꽃 callus의 장기간의 계대배양 중에 관찰된 compact callus와 friable callus 세포조직의 형태적 차이를 광학 및 주사전자현미경을 이용하여 관찰함으로써 구별할 수 있었으며, 또한 체세포배는 세포질이 보다 충만한 상태의 compact callus에서 발생되어지는 것을 확인하였다. 그러므로 엽병유래 callus가 장기간의 배양에 의해서 friable callus화 되더라도 sieving과정을 거침으로서 분화능을 가진 compact callus화 하여 배발생에 의한 식물체 재생을 기대할 수 있으므로 제비꽃의 원예화를 위한 연구에 유용하게 적용될 수 있을 것으로 생각된다. 아울러 야생제비꽃의 개발을 위한 일련의 과정에서 볼 때, 배발생을 통한 식물체 재생의 조건구명에 대한 더욱 깊이있는 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

적 요

야생 흰제비꽃의 엽병 유래 callus를 장기 계대배양하는 과정 중에 발생하는 순화된 friable callus와 분화능이 높은 compact callus를 비교 관찰한 바, friable callus는 연초록색으로 부서지기 쉬운 부드러운 callus이고, compact callus는

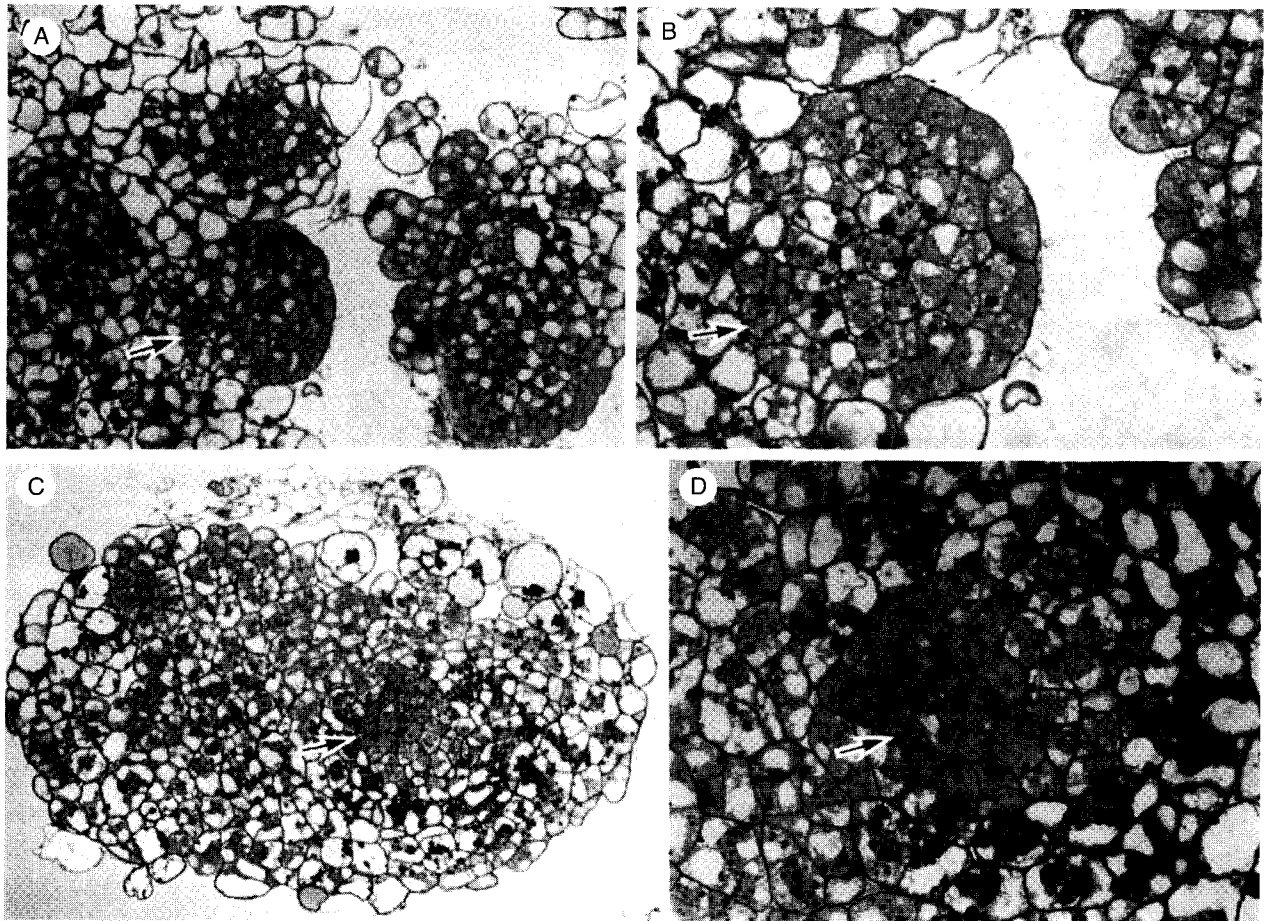


Figure 5. Histological observation of somatic embryogenesis from embryogenic callus of wild viola (*V. patrinii* DC.) (A) Early globular stage of embryo ($\times 200$); (B) Enlarged shape from A, showing globular stage of embryo ($\times 400$); (C) Embryogenic callus with somatic embryo ($\times 160$); (D) Enlarged shape from C ($\times 400$) Arrows indicate somatic embryos.

진녹색으로 단단한 callus였다. 동결처리 한 시료를 주사전자현미경에서 동일하게 200배로 관찰하여 보면, friable callus는 작은 세포집단으로 이루어진 세포군의 주변부에 고도로 액포화된 세포가 광범위하게 분포되어 있는 반면, compact callus는 거의 균일한 세포들로 구성되어 세포구성이 치밀한 것으로 관찰되었다. 또한 friable callus와 compact callus로부터의 체세포배 형성은 배양세포에서 배가 발생하여 배양기간이 지남에 따라 식물체로 분화하였다. 이와 같은 과정은 배양세포의 세포질이 보다 충만한 부위에서 배유사체 (embryo like body)의 발생이 이루어지는 것으로 관찰되었다.

인용문헌

- Ammirato PV (1983) Embryogenesis. In DA Evans, WR Sharp, PV Ammirato and Y Yamada [eds.] Handbook of Plant Cell Culture, Vol Techniques for propagation and breeding. MacMillan Publishing Co. New York 82-123
- Buiteveld J, Fransz PF, Creemers-Molenaar J (1994) Induction and characterization of embryogenic callus of leek (*Allium ampeloprasum* L.). Plant Science 100:195-202
- Choudhary ML, Chin CK (1995) Somatic embryogenesis in cell suspension culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Plant Growth Regulation 16:1-4
- Chung YM, Im HH, Son BG, Suh JH, Chung CH, Kwon OC (1997) Electron microscopic observations of protoplast and fusion cell viola species. Kor J Life Sci 7:282-288
- Kim BW, Choi MS, Roh KS, Park YG (1993) Somatic embryogenesis from leaf callus of *Lycium chinense* Mill. Kor J Plant Tissue Cult 20:91-96
- Ko MK, Yang J, Jim YH, Lee CH, Oh BJ (1998) Genetic relationships of viola species evaluated by random amplified polymorphic DNA analysis. J Hort Sci Bio 73:601-605
- Kwon OC, Chung CH, Park JK, Sato T, Taniguchi T, Maeda E (1992) Electrofusion of protoplasts from wild *Viola* and Pansy and the ultrastructure of the fusion products. Kor J Plant Tissue Culture 19:125-132
- Kwon OC, Chung CH, Sato T, Taniguchi T, Maeda E (1992) Ultrastructure of electrofused products from Pansy (*Viola tricolor*) mesophyll and wild viola (*V. patrinii*) petiole callus protoplasts. Jpn J Crop Sci 61:469-475

Kwon OC, Han SH, Chae YS, Chung YM (1988) Micropropagation of wild viola species by plant tissue culture. Dong-A Univ Kor Agri Tech Inst 9:17-24

(접수일자 2000년 8월 3일)