

# 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) 잎 절편에서 NAA와 BA에 의한 싹, 부정근, 모용 및 캘러스 형성 결정 시기

김송림, 한태진\*  
한림대학교 생명과학부

## Determination Times for Induction of Adventitious Shoots, Roots, Trichomes, and Calli from Segments of *Arabidopsis thaliana* by NAA and BA

Song Lim Kim, Tae Jin Han\*

Division of Life Science, Hallym University, Chucheon 200-702, Korea

**ABSTRACT** The effect of NAA and Benzyladenine (BA) for determination times on the formation of adventitious shoots, roots, trichomes and calli in MS basal medium was investigated in leaf segments from ecotype 'Nossen' of *Arabidopsis thaliana*. Adventitious shoots, roots, trichomes and calli were formed from leaf segments in a wide range of NAA and BA. The optimal combination of hormones for adventitious shoots formation is 1.0 mg/L NAA and 5.0 mg/L BA. The optimal concentrations were 1.0 mg/L NAA for adventitious root formation, 20 mg/L NAA for trichome formation, 100 mg/L for callus formation. Inductive times for formation of adventitious shoots, roots, trichomes and calli were determined at 14, 4, 6 and 18 days respectively by periodical transfer of leaf segments from hormones containing media to hormone free medium.

**Key words:** Adventitious shoot, adventitious root, trichome, callus, NAA, BA

### 서 론

식물조직배양을 통한 각 기관의 재분화는 식물 기관 형성 연구에 매우 유용한데, 이러한 기관 분화는 auxin과 cytokinin과 같은 식물호르몬에 의하여 주로 조절되고 있다 (Skoog and Miller 1957). Auxin은 세포의 부피증가, 세포분열, 유관속의 분화, 정단 우세 그리고 뿌리의 형성 등에 영향을 주며 (Michalczuk et al. 1992), cytokinin은 auxin과의 상호작용을 통하여 세포분열을 촉진하여 싹과 부정근 형성 (Miller et al., 1955, 1956) 및 유관속의 발달, 측아 형성 등에도 관여한다고 보고되고 있다 (Mok and Mok 1994). 이처럼 이들 식물호르몬은 식물의 기관 분화에 영향을 미치는데 이러한 식물의

기관 분화 단계를 체계적으로 분석하기 위해서는 이들 식물호르몬이 작용하는 특정 부위의 조직과 세포들에 대한 생리적, 유전적 또는 형태적 특성을 구명할 필요가 있다.

Christianson과 Wamick (1983, 1984, 1985)는 *Convolvulus arvensis*의 잎 절편으로부터 싹, 부정근 및 캘러스 유도에 대한 체계를 확립하였다. 이들은 auxin과 cytokinin을 처리하여 싹 (SIM), 부정근 (RIM) 및 캘러스 (CIM)를 형성하는 배지를 조사한 후 이중 하나의 배지에서 배양을 시작하여 타 배지로 옮기면서 식물호르몬의 종류와 처리 시간에 따른 기관 형성 결정과정을 조사하였는데 (Christianson and Wamick 1983), 이때 식물호르몬에 의한 기관 형성 과정을 competence acquisition phase, induction phase 및 realization (morphological differentiation) phase 등의 3단계로 나누었다. 그 첫 단계에서는 탈분화가 일어나 조직 절편이 'competence'를 획득하여 식물호르몬과 같은 유도신호에 반응을 일으켜 분화를 일으킬 수 있는 일정한 능력을 갖게 되며, 두 번째 단계에서는 이리

\*Corresponding author Tel 033-248-2092 Fax 033-256-3420  
E-mail tjhan@hallym.ac.kr

한 능력을 갖게 된 조직 절편이 유도신호에 의한 특이적인 기관의 분화가 결정되고, 세 번째 단계에서는 이미 두 번째 단계에서 기관 분화가 결정되었으므로 성장조절물질 없이도 독립적으로 형태형성이 일어난다고 하였다.

애기장대는 식물의 분자생물학적 연구 재료로서 주목 받고 있는데, Comer 등 (1990)이 애기장대에서 auxin에 의해서 조절되는 유전자의 발현 기구를 규명하고자 하였고, 그 밖에도 식물호르몬이 유전자 발현에 미치는 연구가 분자 수준에서 계속 시도되고 있다. 애기장대는 식물호르몬에 의하여 신초, 부정근, 모용 및 캘러스가 비교적 잘 형성되므로 식물호르몬에 의한 식물 조직의 탈분화 및 재분화에 대한 분자적 접근도 용이할 것으로 기대된다. 애기장대의 생태종인 'Columbia', 'Wassilewskaja', 'Landsberg erecta' 등의 잎 절편은 부정근, 모용, 캘러스 등의 형성은 용이한 반면 신초로의 재분화가 저조하거나 상대적으로 낮으나 'Nossen'의 경우는 신초와 부정근 모두 높은 비율로 분화되었다 (Chaudhury and Signer 1989).

이에 따라 본 실험은 부정근과 신초의 분화가 용이한 'Nossen'의 잎 절편 배양시 식물호르몬에 의하여 기관 재분화가 결정되는 시기를 조사하기 위하여 auxin계의 NAA와 cytokinin계의 benzyladenine (BA)을 단독 또는 혼용 처리하여 신초, 부정근, 모용 및 캘러스 형성 양상을 조사한 다음, 적정 농도의 NAA와 BA에 의하여 신초, 부정근, 모용 및 캘러스 형성이 결정되는 시기를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 발아 및 유식물 육성

애기장대 (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh)의 생태종인 'Nossen'의 종자를 70% (v/v) ethanol에 1분, 5% (v/v) Ca(OCl)<sub>2</sub> 용액에서 15분간 각각 살균 처리한 후 멸균수로 4회 세척하였다. 소독한 종자를 식물호르몬이 첨가되지 않은 MS 고형배지가 25 mL씩 들어 있는 250 mL flask에 파종하여 발아시켜 23±1°C, 명소에서 4~5주 유식물을 육성한 후, 잎 절편을 각각 실험구로 설정한 MS 고체배지에 옮겨 명소에서 배양하였다.

### NAA와 BA의 영향조사

Auxin과 cytokinin이 기관형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 4~5주 된 애기장대 유식물의 잎 절편을 각각 MS 기본배지에 NAA와 BA를 각각 0~100 mg/L의 범위에서 단독 또는 혼용 처리로 조성한 7% agar 고형배지에 치상하였다. 23±1°C, 명소에서 5주간 배양하면서 부정근, 모용, 캘러스, 신초 형성 등의 형성 정도를 조사하였으며, 모든 실험은 한 개의

Petri dish (8×15 mm)에 4개의 잎 절편을 배양하여 3회 반복하여 시행하였다.

### 분화는 결정시기 조사

NAA와 BA의 전체적인 영향을 조사한 것을 근거로 (Table 1) 분화능 결정 시기를 조사하였다. 신초는 NAA 1.0 mg/L와 BA 5.0 mg/L 혼용 처리구에서, 부정근은 1.0 mg/L NAA, 모용은 20 mg/L NAA, 그리고 캘러스는 100 mg/L NAA 단독 처리구에서 각각 배양한 후, 성장조절물질이 없는 MS 고형배지에 1일 간격으로 각각의 잎 절편을 옮겨 배양하여 각각의 처리구가 성장조절물질이 포함된 배지와 성장조절물질이 포함되지 않은 배지에서의 총 배양 시간이 4주가 되도록 하여 성장조절물질 처리 기간에 따른 신초, 부정근, 모용 및 캘러스 형성 정도를 관찰하였다.

## 결 과

### NAA와 BA가 기관 분화에 미치는 영향

애기장대 생태종인 'Nossen'의 잎 절편에 NAA와 BA를 단독 및 혼용 처리하여 기관 형성을 조사한 결과, 신초는 NAA와 BA 혼합처리구에서만 형성되었으며, 부정근과 근모 형태의 모용 및 캘러스는 NAA 단독 또는 BA와의 조합에 따라 광범위하게 형성되었다 (Table 1).

신초는 1.0 mg/L NAA와 5.0 mg/L BA 혼합처리구에서 다른 기관의 형성 없이 단독으로 형성되었는데, 애기장대 잎 절편 당 약 12개로 다른 처리구보다 가장 많이 형성되었다 (Table 2). 부정근의 경우 NAA와 BA 단독 및 혼용처리구에서 폭넓게 형성되었는데, 특히 1.0 mg/L NAA 단독 처리시 약 11개로 전체 처리구 중 가장 많은 형성을 보였다 (Table 3). 그리고 NAA의 농도가 증가함에 따라 모용이 증가하기 시작하여 20 mg/L NAA 단독 처리시 가장 많은 모용이 형성되었으며, NAA 농도가 더욱 증가함에 따라 모용 형성이 점차 감소하면서 캘러스가 형성되기 시작하여 100 mg/L NAA에서 가장 많이 형성되었다 (Table 1). 이처럼 부정근, 모용, 그리고 캘러스는 NAA 농도에 따라 1.0 mg/L, 20 mg/L, 그리고 100 mg/L에서 각각 가장 많이 형성되었다.

### 분화는 결정시기 조사

NAA와 BA 영향 조사 실험을 근거로 신초, 부정근, 모용 및 캘러스 형성을 위한 결정시기를 조사한 결과 신초 형성 결정 기간은 1.0 mg/L NAA와 5.0 mg/L BA 혼용 처리에서 14일이었으며, 부정근은 1.0 mg/L NAA 처리에서 4일, 모용은 20 mg/L NAA 처리에서 6일, 그리고 캘러스는 100 mg/L NAA 처

**Table 1.** Effect of NAA and BA on the formation of adventitious shoots, roots, trichomes, and calli from leaf segments of *Arabidopsis thaliana* on MS agar medium after 4 weeks of culture.

	BA (mg/L)	NAA (mg/L)										
		0	0.05	0.1	0.5	1.0	2.0	5.0	10	20	50	100
0	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	-	+	+	++	+++	+	+	+	-	-	-
	T	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+	-
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+++
1.0	S	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-
	R	-	++	++	++	++	+	+	+	-	-	-
	T	-	-	-	-	-	++	++	++	++	+	-
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++
5.0	S	-	+	++	++	+++	+	-	-	-	-	-
	R	-	++	++	+	-	+	+	+	-	-	-
	T	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++
10	S	-	+	++	++	++	-	-	-	-	-	-
	R	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	T	-	-	-	-	-	++	++	+	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++
15	S	-	+	++	+	+	-	-	-	-	-	-
	R	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
	T	-	-	-	-	-	++	++	+	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++
20	S	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	R	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	T	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++

R: Root; T: Trichome; C: Callus; S: Shoot; +++: excellent; ++: good; +: moderate; -: none.

**Table 2.** Effect of NAA and BA on the formation of adventitious shoots from leaf explants of *Arabidopsis thaliana* cultured on MS agar medium after 4 weeks of culture.

BA (mg/L)	NAA (mg/L)								
	0	0.05	0.1	0.5	1.0	2.0	5.0	5.0	
0	1.5±0.49	2.7±0.48	3.0±0.50	3.5±0.49	11.3±0.65	3.5±0.49	3.5±0.49	3.0±0.50	
1.0	-	5.3±0.63	7.0±0.80	7.0±0.50	4.6±1.50	3.5±0.49	3.3±0.49	2.8±1.52	
5.0	-	5.8±1.53	5.4±0.93	3.2±1.45	-	2.5±0.88	2.6±0.48	2.8±1.52	
10	-	2.5±0.88	2.8±1.63	2.5±1.39	2.5±0.88	2.8±0.63	2.5±0.63	2.5±0.63	
15	-	-	-	2.5±1.29	2.7±0.24	2.7±0.87	2.6±1.50	2.5±0.63	

Each value represents the means ± SE of three independent experiments. - represents no response.

**Table 3.** Effect of NAA and BA on the formation of adventitious roots from leaf segments of *Arabidopsis thaliana* cultured on MS medium after 4 weeks of culture.

BA (mg/L)	NAA (mg/L)						
	0	0.05	0.1	0.5	1.0	2.0	
0	-	-	-	-	-	-	
1.0	-	-	7.4±0.40	7.4±0.40	7.6±0.88	-	
5.0	-	2.5±0.45	7.7±0.53	8.2±0.89	11.6±0.40	3.0±0.63	
10	-	2.5±0.45	5.4±0.49	4.6±0.00	7.4±0.93	-	
15	-	2.8±0.89	5.6±0.50	2.6±0.50	3.0±0.63	-	
20	-	3.0±0.88	2.2±0.45	2.5±0.45	2.8±0.85	-	

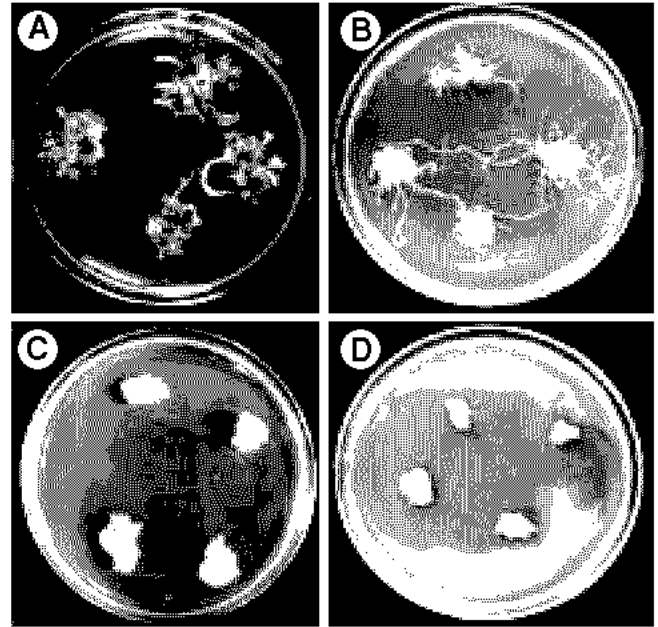
Mean number of adventitious roots per explants. Each value presents the means ± SE of three replicated petri-dishes with four explants. - represents no response.

리에서 18일이었다 (Figure 2).

## 고 찰

애기장대는 기관 형성이나 분자생물학적 연구에 폭넓게 사용되어 'Columbia', 'Wassilewskaja', 'Landsberg erecta', 'Bensheim', 그리고 'Nossen' 등, 각 생태종 별로 많은 연구가 진행되어 왔다. 그러나 Feldman과 Marks (1986)의 보고처럼 'Columbia'는 잎 절편에서 부정근 형성은 양호하나 신초 형성은 거의 되지 않았고 'Wassilewskaja'에서도 신초 형성이 다소 일어날 뿐 기관 형성 전반에 걸친 재분화가 낮게 나타났다. 그러므로 성장조절물질에 의하여 신초, 부정근, 모용 그리고 캘러스 형성에 대한 연구를 수행하기 위하여서는 이들 각각이 동일 성장조절물질 조합에 의하여 형성 빈도가 높은 생태종의 선발이 필요하였다. 이에 애기장대 생태종 중 잎 절편에서 신초를 비롯한 각 기관의 형성이 가장 좋은 'Nossen' (Chaudhury and Signer 1989)을 선택하여 NAA와 BA로 단독 및 혼용 처리해서 기관형성을 관찰하였다. 신초의 경우 1.0 mg/L NAA와 5.0 mg/L BA 혼용 처리시 12개의 잎 절편에서 각각 약 12개의 높은 형성 빈도를 보였는데 (Table 1), 이것은 'Columbia'의 잎 절편으로부터 신초를 유도한 것처럼 캘러스 유도과정을 거치지 않고 직접 신초를 분화시킨 것으로 Chaudhury와 Signer (1989)가 2단계 과정을 거쳐 재분화시킨 것보다 용이하며, 'Wassilewskaja'에서 신초를 재분화시킨 것 (Feldman and Marks 1986)에 비해서도 신초 형성 빈도가 높게 나타났다. 또한 NAA를 0~100 mg/L까지 단독 처리하여 부정근, 모용, 그리고 캘러스를 단독 또는 중복으로 관찰할 수 있었는데, 이것은 'Columbia'를 0~10 mg/L NAA 처리로 부정근, 모용, 그리고 캘러스를 유도한 것 (Han et al. 1999)과 동일한 변화 순서를 보인 것으로 저농도의 NAA가 부정근 형성을 촉진하다가 농도가 증가하면서 부정근이 짧아지면서 모용을 형성하고 결국 고농도의 NAA가 처리되면 캘러스를 형성하였다 (Table 1). Feldman과 Marks (1986)는 애기장대로부터 신초 형성 후 12 mg/L IBA와 0.1 mg/L kinetin에서 부정근을 유도하였으나, 본 실험에서는 1.0 mg/L NAA 단독으로 캘러스 형성 없이 가장 많은 부정근이 유도되었다 (Table 1, 3, Figure 1B). 모용은 부정근이나 캘러스 유도 과정에서 성장조절물질의 조합에 따라 다양하게 나타나는데, 20 mg/L NAA에서 가장 많은 유도를 보였다 (Table 1, Figure 1C). 캘러스는 NAA의 농도가 증가함에 따라 유도되기 시작하여 100 mg/L NAA에서 가장 많은 형성을 보였다 (Table 1, Figure 1D).

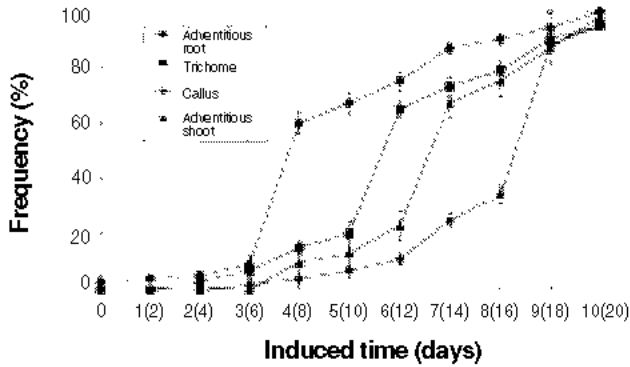
Auxin과 cytokinin은 식물의 발달과정과 성장에 상호 작용하는데, Skoog와 Miller (1957)가 auxin과 cytokinin의 비가 식물의 재분화 과정을 결정한다고 보고한 이래 실제로 auxin과 cytokinin의 생리적인 특성에 바탕이 되는 분자적인 수준에서의 접근은 아직까지 미흡하다. Christianson과 Warnick



**Figure 1.** Photographs of adventitious shoots, roots, trichomes, and calli from the leaf segments of *Arabidopsis thaliana* cultured on MS agar media treated with NAA and/or BA after 4 weeks of culture. A: Adventitious shoots (1.0 mg/L NAA + 5.0 mg/L BA); B: Adventitious roots (1.0 mg/L NAA); C: Trichomes (20 mg/L NAA); D: Calli (100 mg/L NAA).

(1983)은 식물성장조절물질에 의해 조직이 탈분화하여 기관 형성이 결정되는 시간인 *determination time*을 보고하였다. *Determination time*은 신초나 부정근 등, 특정 기관이 형성되는 배지에 조직 절편을 치상하였다가 일정 기간이 지난 후 성장조절물질이 없는 배지에 옮겨 배양하면서 기관이 형성되는 식물성장조절물질 처리 기간을 조사하여 결정하는데, 이는 기관 형성배지에 조직 절편을 치상하면 조직은 기관 형성배지 내에서 일정 기간이 경과되어 탈분화된 후 기관 형성이 결정되기 때문이다 (Walker et al. 1979). 성장조절물질에 의한 기관 형성 결정 시간인 *determination time*은 대두 자엽에서의 부정근 형성에는 5일 (Han 1994), 담배 잎 절편에서의 부정근 형성에는 3일 (Jeon et al. 1998), 그리고 담배 신초 형성에는 9일 (Han et al. 1996)이 필요하였다. 또한 애기장대 생태종 중 'Columbia'는 NAA 단독에 의해 부정근, 모용 및 캘러스 형성 시의 *determination time*이 각각 6일, 7일, 그리고 18일로 보고된 바 있으나 NAA나 BA의 단독 및 혼용 처리 모두에서 신초 형성이 유도되지 않은 반면 (Han et al. 1999), 'Nossen'에서는 NAA와 BA 혼용처리에 의해 신초 형성에 필요한 기간은 14일이었으며, 부정근은 4일, 모용은 6일, 캘러스는 18일로 나타났다 (Figure 2).

이처럼 애기장대의 생태종인 'Nossen'의 잎 절편을 이용하면 신초, 부정근, 모용 및 캘러스 모두를 유도할 수 있으므로 'Nossen'은 기관 분화에 관여하는 NAA와 BA의 역할을 구명하는 좋은 재료로 이용될 수 있으며, 또한 신초, 부정근, 모용 및 캘러스 형성이 결정되는 *determination time*시에는 이들을



**Figure 2.** Frequency of the formation of adventitious shoots, roots, trichomes and calli from leaf segments of *Arabidopsis thaliana* after 4 weeks on hormone free medium followed by different periods of preculture on hormone containing agar medium. Bars represent standard error. Parentheses represent precultured periods of leaf explants for adventitious shoots and calli.

각각 유도하는 유전자가 발현될 것이므로 이것을 이용하면 신초, 부정근, 모용 및 캘러스 분화 결정에 관여하는 유전자를 분리할 수 있게 될 것으로 기대된다.

**적 요**

애기장대 생태종 'Nossen'의 잎 절편을 MS 기본배지에서 배양시 신초, 부정근, 모용 및 캘러스 형성과 그 결정 시기에 미치는 NAA와 benzyladenine (BA)의 영향을 조사하였다. 신초, 부정근, 모용 및 캘러스는 광범위한 NAA와 BA 농도와 조합에 따라 형성되었다. 신초 형성을 위한 농도는 1.0 mg/L NAA와 5.0 mg/L BA 처리구였으며, 부정근은 1.0 mg/L NAA, 모용은 20 mg/L NAA, 캘러스는 100 mg/L NAA에서 각각 가장 많은 형성되었다. 한편, 생장조절물질 배지에 날짜별로 배양하였다가 생장조절물질 결제 배지로 옮겨 유기 결정 기간을 조사한 determination time은 신초 형성은 14일이었으며, 부정근은 4일, 모용은 6일 그리고 캘러스는 18일로 각각 나타났다.

사사 - 이 논문은 2000년도 한림대학교 교비연구비 (HRF-2000-36)에 의하여 연구되었음.

**인용문헌**

Chaudhury MA, Signer ER (1989) Relative regeneration proficiency

of *Arabidopsis thaliana* ecotypes. Plant Cell Rep 8: 368-369  
 Christianson ML, Wamick DA (1983) Competence and determination in process *in vitro* shoot organogenesis. Dev Biol 95: 288-293  
 Christianson ML, Wamick DA (1984) Phenocritical times in the process of *in vitro* shoot organogenesis. Dev Biol 101: 382-390  
 Christianson ML, Wamick DA (1985) Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis *in vitro*. Dev Biol 112: 494-497  
 Corner TW, Goekjian VH, LaFayette PR, Key JL (1990) Structure and expression of two auxin-inducible genes from *Arabidopsis*. Plant Mol Biol 15: 623-632  
 Feldman JH, Marks MD (1986) Rapid and efficient regeneration of plant of *Arabidopsis thaliana*. Plant Sci 47: 63-69  
 Han TJ (1994) Change in specific protein profiles during initiation of adventitious roots in soybean (*Glycine max* L.) cotyledon. Kor J Plant Tiss Cult 21: 123-129  
 Han TJ, Jeon MG, Jo HI (1996) Effect of polyamines on adventitious shoot formation from tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaf segments. Kor J Plant Tiss Cult 23: 45-50  
 Han TJ, Kim IH, Kim SL, Kim JC, Lim CJ, Jin CD (1999) Organ formation-The formation of adventitious roots, trichomes and calli from segments of *Arabidopsis thaliana* by Naphthaleneacetic acid concentrations, and their determination times. Kor J Plant Tiss Cult 26: 211-217  
 Jeon MG, Jo HI, Han TJ (1998) Effect of polyamines on adventitious root formation from tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaf segments. J Plant Biol 41: 31-36  
 Michalzuk L, Ribnicky DM, Cooke TJ, Chen JD (1992) Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures. Plant Physiol 100: 1346-1353  
 Miller CO, Skoog F, Okamura FS, von Saltza MH, Strong FM (1956) Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. J Am Chem Soc 78: 1345-1350  
 Miller CO, Skoog F, Von Saltza MH, Strong FM (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. J Am Chem Soc 77: 1292-1293  
 Mok DWS, Mok MC (1994) Cytokinins: Chemistry, Activity and Function. CRC Press, Boca Raton, FL  
 Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. Symp Soc Exp Biol 11: 118-140  
 Walker KA, Wendeln ML, Jaworski EG (1979) Organogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*. The temporal separation of induction process from differentiation processes. Plant Sci Lett 16: 23-30

(접수일자 2003년 3월 14일, 수리일자 2003년 4월 15일)