

In Vitro 시스템에 의한 花芽形成 研究

劉 長 烈¹. 李 幸 順¹. 李 光 雄²

(¹韓國科學技術研究院 遺傳工學센터 植物細胞生物學研究室;

²서울大學校 自然科學大學 植物學科) .

In Vitro Flowering System

Liu, Jang Ryol¹, Haeng Soon Lee¹, and Kwang-Woong Lee²

(¹Plant Cell Biology Lab., Genetic Engineering Center,

Korea Institute of Science & Technology, Seoul;

²Dept. of Botany, Seoul National University, Seoul)

Abstract

In vitro flowering system may minimize the confounded influence of non-floral meristem parts of plants in studying the relationship of a given treatment and flowering responses. We have induced flower buds from plantlets regenerated from zygotic embryo-derived somatic embryos of ginseng, which circumvented the normal 2-year juvenile period before flowering. The result suggests that the adulthood of ginseng root explants in the experiment previously conducted by Chang and Hsing (1980; Nature 284: 341-342) is not prerequisite to flowering of plantlets regenerated through somatic embryogenesis. We have also induced flower buds from elongated axillary branches from cotyledonary nodes by culturing ginseng zygotic embryos, seedlings, and excised cotyledonary nodes. It was found that 6-benzyladenine (BA) supplemented to the medium was essential for flowering, whereas abscisic acid (ABA) was inhibitory. Gibberellic acid(GA₃) was also required for flowering when ABA was present

with BA in the medium. The results suggest that cytokinins, gibberellins, and inhibitors play primary, permissive, and preventive roles, respectively, in the induction of flowering of ginseng.

Tran Thanh Van (1980; Int. Rev. Cytol., Suppl. IIA: 175-194) has developed the "thin cell layer system" in which the induction of shoots, roots, or flower buds from epidermal layer explants were controlled by culture conditions and exogenous growth regulators in the medium. Utilizing the thin cell layer system, Meeks-Wagner et al. (1989; The Plant Cell 1: 25-35) have cloned genes specifically expressed during floral evocation. However, the system is too tedious for obtaining a sufficient amount of plant materials for biochemical and molecular biological studies of flowering. We have developed a garlic callus culture system and one obvious advantaging over the thin cell layer system is that an abundant cells committed to develop into flower buds proliferate. When the above cells were compared by two-dimensional gel electrophoresis with those which have just lost the competence for developing into flower buds, a few putative proteins specific to floral evocation were detected. The garlic callus culture system can be further explored for elucidation of the molecular biological mechanism of floral evocation and morphogenesis.

서 론

지난 60 여년간의 花芽形成에 관한 수 많은 연구는 다음과 같은 주제가 주축을 이루어 왔다(Bernier et al., 1981) :

1. 光週期나 溫度와 같은 환경인자에 의한 조절;
2. "1"에 의하여 花芽形成이 유도된 식물과 유도되지 않은 식물간의 접촉에 의한 florigen (花成 호르몬)의 이동과 확산;
3. 외부 生長調節劑(plant growth regulator : PGR)의 처리에 의한 조절.

이러한 연구 결과, 식물은 특정 환경인자에 의하여 花芽形成의 反應能(competence)이 결여된 단계 [幼形期(juvenile phase)]를 거쳐 발현되는 단계 [成形期

(adult phase)]로 발달한다는 것이 보편적인 사실로 인정되었다. 또한 광주기에 의해 花芽形成이 조절되는 식물에서는 잎이 광주기에 따라 florigen을 합성하는 장소이며 頂端分裂組織(apical meristem)이 이 호르몬의 受容處(receptor site)라는 것을 밝혔다(Zeevaart, 1976). Florigen에 의한 花芽形成의 조절에 대하여서는 種 특이성이 없는 단일성분(Chailakhyan, 1937) 혹은 두개 이상의 상호 보완적인 성분으로 구성된 것에 의하거나(Chailakhyan et al., 1974), 촉진제들(promoters; florigen)과 저해제들(inhibitors; antiflorigen)의 상호작용에 의하여 이루어지는 것으로 보고 있다(Evans, 1969; Bernier et al., 1981). 그러나 florigen은 화학적으로 규명되지 않고 있으며 다만 이러한 물질이 존재한다는 것에 대한 생리화학적 증거만을 확보하고 있다(Zeevaart, 1976).

花芽形成에 관한 연구에서 밝히고자 하는 주된 내용은 :

1. 식물이 花成자극 혹은 신호(floral stimulus or signal)에 대한 反應能을 갖는 단계로 발달되는 메카니즘의 규명;
2. Florigen의 화학적 규명;
3. 花成자극에 의하여 頂端分裂組織의 생화학적 및 분자생물학적 변화의 규명 등이다(Zeevaart, 1976 ; Bernier, 1988).

In vitro 花芽形成 기법을 上記한 花芽形成의 제문제를 해결하기 위하여 사용할 때의 잇점은 :

1. 식물체 전체는 대단히 복잡한 구조를 이루고 있으며, 외부 환경의 변화에 적절히 대응하기 위하여 기관간에 끊임없는 상호 작용 내지 조절이 일어나고 있다. 따라서 외부 환경의 변화는 비단 花芽形成 뿐만 아니라

식물체의 다른 기관의 제반 현상에도 영향을 미치며 이 영향은 花芽形成에 다시 feedback 되므로 어떤 외부 환경의 변화에 대한 花芽形成 단독간의 관계 규명을 위하여서는 상호영향(correlative influence)을 최소화해야 할 필요가 있다. In vitro 배양에서는 식물체 전체, 일부 기관을 제거한 식물체, 특정 기관, 조직 나아가서는 세포 혹은 원형질체만 따로 떼어서 배양할 수 있으므로 실험의 목적에 따라 복잡성의 수준을 정한 材料(explant)를 배양하고 이 材料를 특정 환경에 노출시킴으로써 환경인자와 해당 材料간의 花芽形成에 있어서의 관계를 보다 정확히 규명할 수 있다(Nitsch, 1972; Scorza, 1982);

2. Microsystem이므로 실험 디자인, 반복 실시, 처리구의 확보 등의 용이하며 화학성분의 영향을 in situ 시스템보다 훨씬 정확하게 측정할 수 있다;
3. In situ 시스템에서 花芽形成은 식물체의 특정 위치의 花芽에 국한되며, 또한 이 花芽에서 頂端分裂組織이 차지하는 용적은 1%에 미치지 못하므로 頂端分裂組織에서 일어나는 생화학적 현상 관찰은 실제적으로 불가능하나 in vitro 시스템에서는 식물의 조직으로부터 직접 혹은 캘러스를 통해 간접적으로 많은 수의 花芽의 de novo 형성이 가능하므로 이들의 분열조직 부위의 화학적 분석이 이루어질 수 있다.

본 논문에서는 上記한 in vitro 시스템의 잇점의 실제적인 예를 소개하고 이러한 예를 통하여 초두에 제시한 花芽形成의 해명에 직간접적으로 얼마만큼 공헌할 수 있는지를 평가해 보려고 한다.

1. 幼形性(Juvenility)와 花芽形成

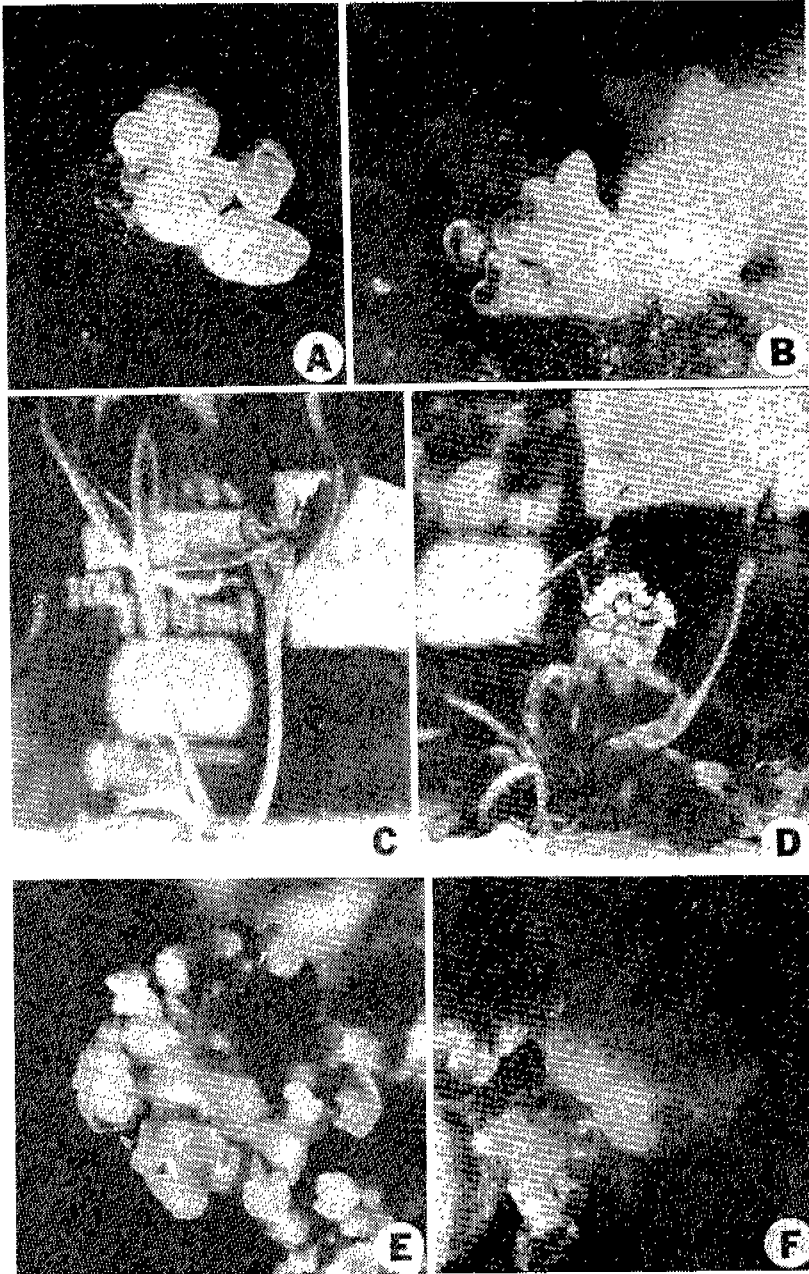


Fig. 1. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of ginseng. A, Globular to torpedo-shaped somatic embryos derived from cotyledonary tissue of zygotic embryos. B, Multi-cotyledonary somatic embryos. C, A plantlet converted from a somatic embryo. D, A flowered plantlet. E, Flowers with well-developed anthers. F, An immature fruit. (Lee *et al.*, 1989a).

모든 被子植物은 자연적으로는 花芽가 형성될 수 없는 幼形期를 거치게 되는데 이러한 기간에 있는 식물체로부터 유래된 材料에서의 花芽形成은 드문 현상이다. Chang과 Hsing (1980)은 6년생의 人蔘 뿌리에서 얻은 캘러스를 배양하여 體細胞胚를 얻었으며 이 體細胞胚에서 발달한 幼植物體에서 花芽가 형성되는 것을 관찰하였다. 人蔘은 圃場에서 2년간의 幼形期를 가지므로 이들의 幼植物體가 花芽를 형성할 수 있었던 것은 體細胞胚가 6년생의 成形期에 있는 뿌리에서 유도된 캘러스에서 발달하였기 때문일 것이라는 추론을 하게 하였다. 따라서 幼形期에 있는 뿌리로부터 유도된 幼植物體에서도 花芽形成이 가능한 지 여부에 대한 의문이 제시되었다(Scorza, 1982).

필자들은 上記한 의문을 해결하고자 接合胚의 조직과 같은 幼形期の 극히 초기에 있는 조직으로부터 유도된 體細胞胚에서 발달한 幼植物體도 花芽形成이 가능한 지 여부를 조사하였다(Lee et al., 1989a). 그 결과 接合胚의 조직에서 얻은 캘러스에서 유도된 體細胞胚에서 발달한 幼植物體도 6년생의 人蔘 뿌리에서 발달한 幼植物體와 마찬가지로 높은 빈도의 花芽形成이 가능하였다(Fig. 1). 따라서 Chang과 Hsing(1980)의 花芽形成에는 成形期の 조직을 材料로 사용하였던 점이 花芽形成에 영향을 미치지 않았으며 圃場에서 자라는 人蔘의 실제적인 幼形期間은 2년이 아니라 수주 혹은 그 이하일 수 있다는 결론에 도달하였다 (배지에 첨가한 BA 혹은 GA_3 에 의하여 幼形性이 극복된 것이 아니라면).

2. 生長調節劑와 花芽形成

In vitro 花芽形成에서 가장 많은 연구가 되어진 것은 외부 PGR의 花芽形成에 미치는 영향에 관한 것이다. 각각의 PGR의 효과에 대한 충분한 논의는 여기에서는 생략하기로 한다. 지금까지 이루어진 외부 PGR의 처리 실험에 대하여서는 다

음 두가지 견해가 대립되고 있다 :

1. 외부 PGR의 花芽形成에 있어서의 영향은 순전히 약리학적(pharmacological)인 현상으로만 받아들이고 이러한 연구는 花芽形成의 메카니즘 규명에 거의 도움을 주지 않는다고 본다(cf. Zeevaart, 1976);
2. Florigen은 현재까지 알려져 있는 内生 PGR의 하나 혹은 두개 이상으로 이루어진 것으로 보고 외부 PGR 처리에 의한 花芽形成 효과는 in vivo에서의 생리학적 현상과 동일하다고 보는 것이다(Evans, 1969). 이때의 문제점은 동일 PGR이 동일 식물체 내에서 지나치게 많은 생리적 현상을 조절하게 된다는 것을 쉽게 받아들이기 어려우며, 또한 식물의 종류에 따라 동일 PGR가 花芽形成을 촉진 혹은 저해하는 것을 설명하는 것이 용이하지 않다는 것이다. 그러나 하나의 열쇠(PGR)로 여러 문을 열 수 있듯이 식물체의 발달 단계별 부위별로 동일 열쇠 구멍을 가진 다른 방으로 통하는 문이 제공된다면 PGR로 서로 다른 생리학적 현상을 조절하는 것이 가능할 수 있다. 한편, 花芽形成에서 다중인자가 관련되어 있다고 보고 어떤 특정 内生 PGR가 제한 인자로 작용하고 있어서 花芽가 형성되지 못하는 경우에만 외부 PGR의 처리에 의하여 花芽形成이 된다는 보다 소극적인 견해도 있다(Bernier et al., 1981; Bernier, 1988).

이러한 외부 PGR에 의한 in situ 혹은 in vitro 花芽形成의 연구는 단일 PGR을 처리한 경우가 대부분이며 극히 일부에서 2종류 이상의 PGR의 상호 관계를 밝히고 있다(Scorza, 1982). 필자들은 앞서 人蔘의 體細胞胚에서 발달한 幼植 物體로부터 花芽形成이 가능하다는 사실에 힘입어 接合胚가 發芽한 實生에서 花芽形成이 가능한 지 여부에 대하여 알아보기 위하여 각각 5 μ M의 BA, GA₃,

ABA, indole-3-acetic acid(IAA) 등 4종류의 외부 PGR의 상호작용을 조사하였다 (Lee et al., 1989b).

接合胚를 材料로 하였을 때 BA에 의해 花芽形成이 가능하였지만 ABA와 함께 존재하게 되면 花芽形成은 일어나지 않았다. 그러나 여기에 GA₃를 첨가시켰을 경우 花芽形成 능력이 회복되어 BA, BA + GA₃, BA + GA₃ + ABA의 3처리구에서 花芽形成이 이루어졌다. 그러나 ABA는 接合胚의 發芽 자체를 저해하였으므로 花芽形成에 미치는 영향을 관찰할 수 없었다. 따라서 接合胚를 White(1943) 배지에서 1주일 동안 發芽시킨 幼植物體를 材料로 하여 花芽形成을 조사해 본 결과(Fig. 2), ABA를 단독으로 처리하였을 경우에는 幼植物體의 성장이 억제되었



Fig. 2. *In vitro* flowering of ginseng seedlings. A, A seedling employed as explant. B, A seedling bearing flowers (arrows). C, An umbel with 8 flowers. D, Immature fruits from flowers. (Lee et al., 1989b).

으며 花芽形成도 일어나지 않았다. 다른 처리구에서의 花芽形成 양상은 接合胚를 材料로 하였을 경우와 마찬가지로이었으나 BA + ABA 처리구에서도 花芽形成이 가능하였다. 식물체의 잎, 뿌리 등의 여러 기관이 花芽形成에 미치는 상호 영향을 줄이기 위하여 花芽를 형성하는 가지로 발달될 腋芽를 가진 子葉 마디에서 子葉을 제거시킨 것(子葉 마디 材料)을 사용하였을 때에는 接合胚의 경우와 마찬가지로 BA, BA + GA₃, BA + GA₃ + ABA의 3처리구에서 花芽形成이 가능하였다(Table 1). 식물체의 생장은 接合胚와 幼植物體를 材料로 하였을 경우, GA₃에 의하여

Table 1. Interactions among BA, GA₃ and ABA on flowering of ginseng of cultured seedling and cotyledonary node explants. Presence of any one hormone of 5 μM is designated as '+' and its absence as '-'

Treatment			Percentage of flowering explants		
BA	GA ₃	ABA	Zygotic embryo	Seedling	Cotyledonary node
+	+	+	80.0 ± 23.9	80.3 ± 14.2	74.0 ± 20.0
+	+	-	80.5 ± 24.8	84.4 ± 16.7	100.0
+	-	+	0	56.0 ± 20.7	0
+	-	-	78.0 ± 20.0	84.0 ± 12.7	54.0 ± 17.7
-	+	+	0	0	0
-	+	-	0	0	0
-	-	+	0	0	0
-	-	-	0	0	0

(± standard deviations) (Lee et al., 1989b)

촉진되었고 BA에 의하여 더욱 왕성하게 자랄 수 있었지만 ABA에 의하여 저해되었다. 子葉 마디를 材料로 사용하였을 경우에는 上胚軸이 없고 측지들만 갖춘 식물체로 자랐다. 그러나 花芽形成의 빈도에는 3가지 材料에서 거의 비슷한 정도를 보였으며, 특히 子葉 마디 材料의 경우 BA + GA₃ 처리구에서 100%의 花芽形成의 빈도를 나타내었다. 모든 경우에 있어서 花芽가 형성되는 위치는 材料에 관계없이 앞서 밝힌 바와 동일하였다. 꽃의 질도 사용된 材料로 인한 차이는 심하지 않았지만 BA에 의하여서는 花芽가 유도되었고 GA₃가 첨가됨에 따라 그 발달이 촉진되었다. 接合胚나 子葉 마디를 사용한 경우에는 BA가 있다 하더라도 ABA가 花芽形成을 완전히 저해하였는데 이것은 GA₃에 의하여 상쇄될 수 있었다. 그러나 幼植物體에서는 ABA가 있다 하더라도 GA₃의 도움없이 BA만으로 花芽形成이 가능하였다. 子葉 마디를 材料로 하여 상기한 실험에서 처럼 BA, GA₃, ABA 처리에 IAA를 더 첨가시켜 IAA가 花芽形成에 미치는 영향을 조사하였던 바 IAA는 花芽形成에 아무런 영향을 미치지 않았으며 花芽形成은 IAA 존재와는 관계없이 BA, BA + GA₃, BA + GA₃ + ABA를 포함하는 6개의 처리구에서 이루어졌다. 아울러 IAA가 식물체의 성장을 억제시키는 ABA에 대응함으로써 식물체가 정상적인 성장을 할 것으로 기대하였지만 ABA는 IAA의 존재에 상관없이 식물체의 성장을 억제하였다.

또한 莖頂(apex)(길이 : 4-6 mm)을 材料로 해서 위의 방법처럼 BA, GA₃, ABA, IAA를 처리하여 花芽形成 여부를 조사하였는데 모든 처리구에서 花芽形成이 이루어지지 않았으며 여전히 葉芽로 남아 있었다. 또한 人蔘은 圃場에서 1년생 식물 때 출현하는 上胚軸에서 花芽가 형성되지 않은 것으로 보아 기존의 葉芽가 花芽로 변하는 것이 아님을 알 수 있다. 그 보다는 子葉 마디에 존재하는 腋芽가 신장한 측지에서 花芽形成이 이루어졌다.

결국 人蔘의 花芽形成에는 BA가 필수적이었다. 또한 BA와 GA₃를 함께 처리한

경우에 꽃의 수가 더 많고 질적으로 더 나왔던 것으로 보아 GA_3 는 花芽形成의 보조적인 역할을 하는 것으로 사료된다. 그러나 BA와 함께 ABA가 존재하면 子葉 마디를 재료로 하였을 경우에는 花芽形成이 완전히 억제되었다(接合胚를 재료로 하였을 때는 發芽 자체가 되지 않았다). ABA의 이러한 저해 작용은 GA_3 에 의하여 효과적으로 극복되었다. 이러한 결과는 人蔘의 花芽形成에 있어서 cytokinin은 주된(primary) 역할을 하며, ABA는 저해(preventive) 작용을 하고, gibberellin은 ABA의 저해 작용을 극복하여 cytokinin의 작용을 허용하는(permissive) 역할을 한다는 가설을 가능케 한다. 다만 이러한 가설이 성립하는데 장애가 되는 것은 幼植物體 전체를 材料로 하였을 경우이다. 즉, BA 외에 ABA가 함께 존재함에도 불구하고 花芽形成이 가능하였다는 점이다. 그러나 이것 역시 幼植物體는 상대적으로 부피가 훨씬 작은 子葉 마디와는 달리 内生 gibberellin을 상당한 정도 생성하고 있어서 처리하여 준 ABA를 외부의 gibberellin 처리가 없더라도 스스로 극복할 수 있었다고 보면 해결된다.

이런 가설은 種子의 發芽에 관여하는 生長調節劑 중 gibberellin이 發芽의 주된(primary) 역할을 하고, 저해제(inhibitor)는 저해(preventive) 작용을 하지만, cytokinin이 저해제의 작용을 극복하여 gibberellin의 작용을 허용하는(permissive) 역할을 수행한다는 Khan(1971)의 가설과 비교하여 볼 수 있다. 種子 發芽에서는 gibberellin이, 人蔘의 芽形成에서는 cytokinin이 주된 역할을 하고, 種子 發芽에서는 cytokinin이, 花芽形成에서는 gibberellin이 각각 저해제의 효과를 상쇄시킨다는 것은 대단히 흥미롭다. 이제까지 보고된 生長調節劑에 의한 모든 花芽形成 연구는 주로 1종류 혹은 2종류의 生長調節劑를 사용하였으며, 2종류를 사용하였을 경우 상호간의 관계를 규명한 예가 있으나(Miginiac and Lacombe, 1973), 본 연구에서와 같이 3종류 이상의 生長調節劑를 사용하여 花芽形成에 있어서 상호간의 관계를 규명한 보고는 아직 없었다.

또한 일반적으로 GA_3 가 자연상태의 식물체의 花芽 유도에 중요한 역할을 한다고 알려져 왔는데(Evans, 1971), 본 실험 결과는 GA_3 가 花芽形成의 필수적인 요인이 아니라 花器의 발달에 도움을 주는 보조적인 것으로 작용한다는 Lang (1965)의 이론을 뒷받침하였다. Cytokinin은 많은 器內 花芽形成 시스템에서 필수적인 요인으로 보고되고 있다(Nitsch and Nitsch, 1967; Wardell and Skoog, 1969; Srinivasan and Mullins, 1978; Scorza and Janick, 1980). 그러나 담배(Wardell and Skoog, 1969)나 Passiflora(Scorza and Janick, 1980)에서 밝혀진 바와 같이 成形期の 조직과는 달리 幼形期の 조직으로부터는 cytokinin이 함유된 배지에서 花芽形成이 불가능 하였다. 따라서 본 연구는 cytokinin에 의하여 幼形期の 材料로부터 花芽를 早期 유도한 새로운 例가 될 수 있을 것이다. 이에 반하여 auxin은 人蓼의 器內 花芽形成 조절에 중요하게 관여하는 것 같지 않다.

人蓼의 器內 花芽形成에서는 기존 葉芽가 花芽로 전환되는 것이 아니라 子葉 마디에 존재하는 腋芽가 신장한 측지에서 花芽가 형성 되었는데, 이 측지는 圃場 조건의 1년생 幼植物體에서는 보통 성장하지 않고 休止(quiescent) 상태로 있으며 2년생 이후에 신장을 개시하게 되는 것으로 추측된다. 또한 본 연구 결과로 미루어 볼 때 人蓼이 圃場에서 幼形期 동안 花芽形成을 하지 못하는 것은 内生 cytokinin이 충분하지 못하기 때문이라고 할 수 있겠다. (앞서 幼植物體에서 추측한 바와 같이 内生 gibberellin은 충분할 것이므로 ABA와 같은 저해 호르몬에 의한 花芽形成이 억제된다는 가정은 성립되기 어렵다). Cytokinin은 주로 뿌리에서 생합성된다는 견해가 폭넓은 지지를 받고 있다는 것을 감안한다면(Latham, 1978) 幼形期 동안 人蓼은 뿌리가 작아서 그만큼 cytokinin을 충분히 생합성하지 못하므로 花芽를 형성하지 못한다고 할 수 있겠다. 長日植物인 Sinapis alba는 長日 처리에 의한 花芽 유도 조건에서 뿌리의 滲出物에 cytokinin의 양이 증가하였다는 것은(Lejeune et al., 1938) 人蓼의 幼形期에 대한 본 설명과 일맥 상

통한다. 人蔘의 경우 圃場에서 뿌리가 성숙하면 cytokinin을 충분히 합성하게 되고 이 cytokinin이 子葉 마디에 위치한 休止 상태의 腋芽의 성장을 촉진하여 花芽가 형성되는 것으로 사료된다. 그러나 BA를 첨가한 배지에서 莖頂端으로부터 花芽가 형성되지 않은 것은 人蔘의 花芽形成에 cytokinin 외에 다른 요인이 결정적으로 관여하고 있음을 시사한다. 이는 다른 연구자들이 cytokinin을 花芽形成에 관여하는 복합 요인 중의 하나로 이해하고 있는 것과 맥을 같이 한다 (Cleland, 1978; Scorza and Janick, 1980).

3. 細胞簿層 시스템(Thin Cell Layer System)

In vitro 花芽形成 시스템 중에서 특별한 관심을 끌게 하는 것은 Tran Thanh Van(1973, 1980)과 그 동료들(Cousson and Tran Thanh Van, 1981 ; Tran Thanh Van and Trinh, 1986)에 의하여 개발된 細胞簿層 시스템이다. 이것은 表皮細胞와 같이 고도로 분화된 세포로만 細胞簿層(表皮細胞 단독 혹은 表皮細胞와 함께 붙은 2-6층의 세포를 포함)을 大葉脈이나 花莖에서 1 X 5 mm 혹은 1 X 10 mm로 벗긴 材料를 고체(Tran Thanh Van, 1973) 혹은 액체(Cousson and Tran Thanh Van, 1981) 배지에서 배양하였다(Fig. 3). 이 시스템에서는 :

1. 材料로부터 직접 줄기, 뿌리, 花芽 혹은 캘러스를 각각 임의대로 조절하여 유도할 수 있으며;
2. 일반적으로 器官發生에 필요한 시간(e.g., 45일) 보다 훨씬 짧은 시간(e.g., 12일)이 소요되며;
3. 材料 표면의 단위 면적당 발생하는 기관의 수가 대단히 많으며(e.g., 50 花芽/1 X 10 mm 材料 : 500-600 葉芽/ 1 X 10 mm 材料);



Fig. 3. Thin cell layer system (K. Tran Thanh Van, 1980). A, Longitudinal section showing composition of thin cell layers *Nicotiana tabacum* (epidermal layer, subepidermal layer, and a few parenchyma layers). B, Flower formed directly - without intermediate callus - on the epidermal surface of the explant.

4. 배양 초기에 모든 세포는 G2 단계에 있으므로 발달이 비교적 同調的이며;
5. 材料의 용적이 작으므로 内生 PGR의 양도 그만큼 적다고 볼 수 있다.

상호 영향을 최소화한 이러한 특징 때문에 본 시스템을 이용하면 각각의 器官發生이나 캘러스 유도에 필요한 외부의 물리화학적 조건을 보다 정확히 규명할 수 있게 된다.

*Nicotiana tabacum*의 花莖의 細胞簿層 시스템의 器官發生 프로그램을 예로

들면 표피 세포층에서 花芽를 포함하는 器官發生에는 배지에 첨가한 전통적인 auxin과 cytokinin의 비율 외에도 탄수화물의 종류와 양 그리고 광도, 온도, pH 와 같은 물리적인 요인등이 심도있게 관여하고 있음이 밝혀졌다. 한편, 花莖의 절편을 배양하면 形成層 細胞(cambial cell)에서만 캘러스와 花芽가 형성되지만 形成層만을 따로 떼어 배양하면 약간의 캘러스와 花芽가 형성되었다. 반면에 表皮와 皮下(subepidermal) 세포는 다른 조직과 분리시켰을 때만 花芽形成이 관찰되었다. 形成層 조직은 表皮와 皮下細胞와 연합되면 器官發生 능력이 회복되지 않았다. 이와같이 서로 인접하고 있는 조직 사이에도 器官發生에 있어서 세포 접촉에 의한 길항작용이 있음이 드러났다.

4. Florigen으로서 Oligosaccharin

Auxin이나 cytokinin 등의 PGR은 앞서 밝힌 것과 같이 多面發見的(pleiotropic)이다. 즉, 形態發生 뿐만 아니라 많은 생리학적 현상에 관여하고 있다. 따라서 이러한 PGR를 花成 자극의 화학적 메세지로 보는 데는 무리가 있다는 견해를 가진 연구자들에게 매력을 주는 물질 중의 하나가 바로 oligosaccharin이다 (Darvill and Albersheim, 1984). 이것은 細胞壁을 구성하는 탄수화물을 효소로 분해하여 얻은 oligosaccharide 중 낮은 농도(e.g., 1 nM-10 nM)에서 식물의 성장과 분화에 영향을 주는 그룹이다. Oligo의 구조를 가지므로 무수한 유도체가 가능한데 실제로 細胞壁에 이러한 유도체가 구성 성분으로 존재하는 것으로 알려져 있다. 따라서 이들의 식물의 발달 과정에서 발생하는 각각의 현상에 대해 고유한 화학적 메세지가 되는 oligosaccharide가 존재할 수 있다는 것이다.

Tran Thanh Van 등(1985)은 sycamore의 細胞壁을 endo- α -1,4-polygalacturonase로 처리하여 얻은 1-10 μ g/ml의 oligosaccharin을 花芽가 유도되도록 kine-

tin과 indole-3-butyric acid(IBA)의 PGR과 배지의 pH를 조절한 *N. tabacum*의 花莖의 細胞簿層에 첨가하였더니 花芽 대신 葉芽가 유도되었으며, 葉芽가 유도되도록 조건을 준 배지에 첨가하였을 때는 花芽가 형성되는 것을 관찰하였다. 또한 sycamore의 細胞壁을 KOH로 가수분해하여 얻은 oligosaccharin을 葉芽가 유도되도록 조건을 준 배지에 첨가하였을 때는 葉芽 대신 뿌리가 발생하였다. 이들은 oligosaccharin의 종류에 따라 다른 *in situ* 形態發生이 조절된다고 믿고 있다. 또한 담배의 花莖의 細胞簿層을 배양하여 뿌리가 유도되도록 조건을 준 배지에 현탁 배양한 담배와 sycamore 세포에서 얻은 oligosaccharin을 첨가하였을 때 細胞簿層의 전 부위에서 뿌리가 형성되는 대조구와는 달리 기저 부위에만 뿌리가 형성되도록 함으로써 極性에도 영향을 준다는 것이 보고되었다(Eberhard *et al.*, 1989).

5. 細胞特異反應能(Cell-Specific Competence)

식물이 빛을 받으면 phytochrome에 의하여 전달되는 신호에 대해 반응하여 특별한 발현을 하도록 결정된 세포에서만 光形態發生(photomorphogenesis)이 극한 되는데 이와 같이 특정 신호에 대해 形態發生을 나타내는 능력을 Mohr(1978)는 反應能(competence)이라고 하였다. 이런 의미에서 光形態發生은 :

1. Phytochrome의 신호에 의해 細胞特異反應能을 확립하는 과정 즉, 典型特異化(pattern specification)라는 내부적 변화를 거쳐;
2. Phytochrome의 신호에 의하여 전형을 형상화(pattern realization)하는 외부적 형태변화가 표출된다고 보았다.

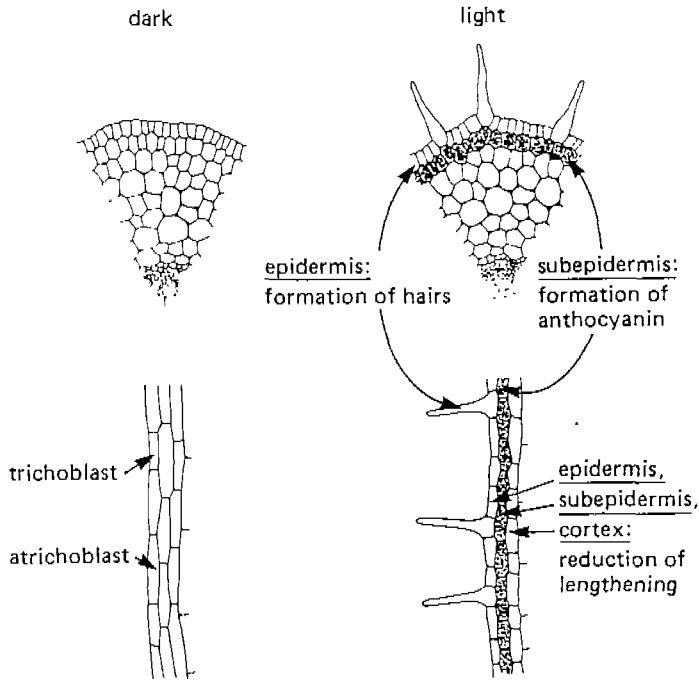


Fig. 4. Microscopic sections through the hypocotyl of dark-grown and light-grown mustard seedlings. Top, cross-sections; bottom, longitudinal sections through the outer cell layers. These drawings illustrate the spatial aspect of developmental responsiveness to phytochrome action (pattern specification). While particular epidermis cells (trichoblasts) are pre-programmed to form hairs (but no anthocyanin) under the influence of phytochrome, all cells of the subepidermis are able to accumulate anthocyanin. Irrespective of this specific response pattern, the cells of epidermis, subepidermis, and cortex respond to phytochrome by an inhibition of cell lengthening. (P. Schopfer, 1984).

Hong과 Schopfer(1981)는 典型形象化를 외부 형태 변화라는 공간적인 개념외에도 種子의 發芽 과정에서 보여지듯이 동일한 phytochrome 신호에 의해서 시간의 경과에 따라 다른 종류의 효소가 *de novo* 생합성되는 시간적인 개념의 두 요소로 분류하였다. 또한 Schopfer(1984)는 phytochrome 신호에 의한 光形態發生의 세포 수준에서의 典型特異化 과정은 PGR에 의해서 조절되는 形態發生에도 동일한 원리가 확대 적용될 수 있다고 보았다(Fig. 4). 그러나 反應能이 세포에 확립되는 기본 메카니즘은 알려지지 않고 있다. 反應能의 원리를 花芽形成에 적용한다면

花成 신호는 florigen의 기본 개념과 같이 아직 밝혀지지 않은 "신비한" 어떤 것일 필요가 없이 일반적인 PGR 하나 혹은 두개 이상의 혼합물이라고 볼 수 있으며 다만 頂端分裂組織이 花芽를 형성할 수 있는 反應能을 얻게 되는 메카니즘을 규명하는데 초점을 맞출 수 있을 것이다. 이런 가정에서 花芽形成이 유도되는 葉芽(花芽形成 反應能을 가진)와 유도되지 않은 葉芽(反應能이 결여된)의 생화학적 차이를 규명하고 이러한 두 종류의 葉芽에 花成신호(e.g., PGR)를 준 뒤 두 葉芽의 생화학적 변화를 시간에 따라 추적한다면 花芽形成의 메카니즘 규명에 보다 접근할 수 있을 것이다. 그러나 기존 기법으로는 상기한 두 종류의 葉芽의 생화학적 분석에 필요한 頂端分裂組織의 양을 충분하게 얻는다는 것은 불가능하다.

필자들은 최근에 마늘(*Allium sativum* L.)의 花芽의 花被(perianth)로부터 cytokinin을 첨가한 배지에서 유도한 어떤 특이한 캘러스를 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)를 첨가한 배지에서 진탕 배양에 의하여 2년 동안 계대 배양한 후에도 cytokinin을 첨가한 배지에 plating하면 거의 전 캘러스 표면에

Table 2. Characterization of florigenic callus on media containing various concentrations of α -naphthaleneacetic acid (NAA) and BA

BA NAA (mg/1)	0	1	3	10
	(mg/1)			
0	D	F	F	F
1	C	F	F	F
3	C	F	F	F
10	C	F	F	F

D : Degeneration
 C : Callus
 F : Flowering
 (Lee et al., 1989c)

花芽를 형성하며 기타 기관은 전혀 발생하지 않음을 관찰하였다. 그러나 PGR을 첨가하지 않은 배지에 plating하면 자라지 못하고 죽었으며, auxin과 cytokinin의 비율을 다양하게 한 배지에 plating하면 cytokinin을 첨가한 배지에서는 auxin의 존재 유무와 관계없이 花芽가 형성되었고, auxin 만 첨가한 배지에서는 세포가 증식되었다(Table 2). 따라서 필자는 본 세포(캘러스)가 cytokinin 신호에 의하여 花芽形成을 하도록 운명된 反應能을 가졌다고 보며 상기한 花成신호에 의하여 花芽를 형성하는 葉芽의 頂端分裂組織과 기본적으로 동일하다고 보고 있다. 만일 이러한 가정이 성립된다면 상기한 花芽形成의 메카니즘 규명을 위한 생화학적 연구에 필요한 조직을 충분히 확보한 것이 될 것이다. Cytokinin 신호에 의하여 花芽形成을 하도록 운명된 反應能을 가진 캘러스와 cytokinin에 의하

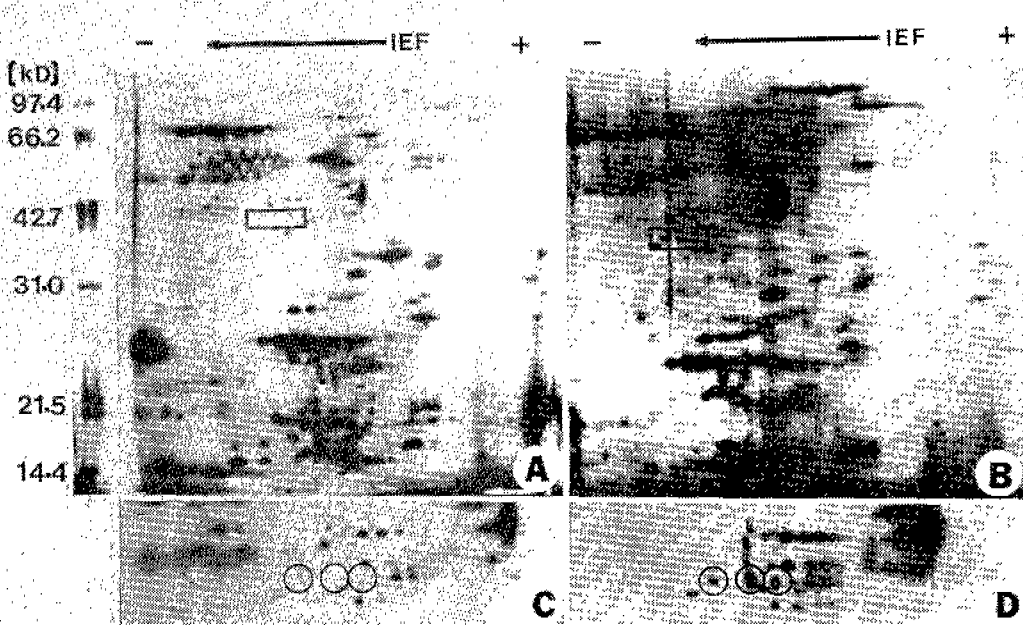


Fig. 5. Silver-stained two-dimensional gel electrophoretic patterns of proteins from non-florigenic callus and florigenic callus of garlic. Molecular-mass markers are indicated on the left. The squares mark the areas compared with each other and the circles indicate the locations of putative proteins specific to floral evocation. A. Total proteins of non-florigenic callus. B. Total proteins of florigenic callus. C. Enlargement of the square on 'A'. D. Enlargement of the square on 'B' (Lee *et al.*, 1989c).

여도 反應能을 갖지 못했거나 또는 이미 反應能을 얻었다가 잃어버린 캘러스로부터 전 단백질(total proteins)을 전기영동으로 분리하였다. 먼저 IEF(isoelectric focusing) 겔로 분리한 결과 40여개의 band가 출현하였으며 이를 다시 SDS-PAGE로 분리한 결과 300여개의 spot으로 나타났다. 이 중 pI 8 부근의 분자량이 42 kD인 위치에 3개의 spot이 花芽發生 캘러스에서만 새롭게 출현하였는데 이것을 잠정적 花芽發生 特異蛋白質(putative floral evocation-specific protein)이라고 생각할 수 있다(Lee et al., 1989c) (Fig. 5). 필자들은 마늘에서 花芽發生 캘러스 외에도 cytokinin 신호에 의하여 葉芽(vegetative bud)만을 발생하는 莖發生 캘러스(caulogenic callus)를 개발할 수 있으리라고 보고 있는데, 이렇게 되면 花成 反應能을 가진 葉芽와 가지지 못한 葉芽의 생화학 내지 분자생물학적 메카니즘을 밝히고 시간적 典型形象化의 실체를 밝히는데 일익을 담당하리라 사료된다.

결 론

器官發生과 體細胞胚發生에 관한 연구는 *in vitro*에서 전자의 경우 auxin/cytokinin의 비율이 높으면 뿌리가, 낮으면 줄기가 발생하며 후자의 경우 2,4-D와 같은 합성 auxin에서 유도된 특별한 종류의 캘러스 [embryogenic callus]를 PGR를 첨가하지 않은 배지로 옮김으로써 유도할 수 있다는 protocol이 확립되어 광범위한 종류의 식물에 대하여 일상적으로 유사한 protocol을 적용하고 있다. 이러한 시스템을 이용하여 PGR에 의한 器官發生이 전사수준에서의 유전자 발현의 조절로 이루어진다는 증거를 확보해 가고 있다(e.g., auxin에 의한 根發生(rhizogenesis))(Dhindsa et al., 1987). 體細胞胚發生은 분자수준에서의 발생 메카니즘이 接合胚發生과 동일하다고 보고 발달 단계에서 나타나는 특이 단백질 혹은

poly(A⁺) RNA를 찾아 내어서 이에 대한 cDNA clone을 만들었으며, 해당 유전자의 發生 生物學的 역할 규명을 시도하는데 까지 이르고 있다(Choi et al., 1987; Borkird et al., 1988). 그러나 花芽發生(florigenesis)은 환경 인자에 의하여 지배되는 in situ 현상과 복잡한 식물체의 구조 내에서 일어나는 상호 영향에 비하여 花芽가 형성되는 頂端分裂組織이 지나치게 작으며 신호와 유전자 발현이라는 큰 줄기에서가 아니라 신호와 일차 혹은 이차적인 생리학적 변화의 관찰에 치우쳐 생화학적 내지 분자생물학적 연구가 거의 이루어지지 못하고 있다. 이렇게 된 연유는 in vitro 器官發生이나 體細胞胚發生과 같은 PGR 처리에 의하여 높은 빈도와 재현성은 가지고 花芽만 다수 유도하는 시스템을 갖고 있지 못하였기 때문이다.

일반적인 in vitro 花芽形成 기법은 花芽形成 연구에 있어서 상호 영향을 줄이고 외부 화학물질의 영향에 대하여 정량·정성화를 용이하게 한다. 특히 細胞簿層 시스템은 in vitro 花芽形成에 관하여 현재까지 알려진 것 중 상호 영향을 최소화한 것일 수 있으며 높은 빈도의 花芽形成이 보장된다는 점에서 많은 관심을 끌고 있다. Meeks-Wagner등(1989)은 N. tabacum의 細胞簿層 시스템을 이용하여 cDNA library로부터 花芽形成 직전에 특이적으로 전사되는 clone들을 분리하였는데 이들 중 두개의 clone이 花芽의 頂端에서 발현되는 것을 보고하였다. 그러나 細胞簿層 시스템을 운용하는 데에는 작은 크기(e.g., 표피 조직 1 x 10 mm)의 材料를 생화학적 분석에 쓰여질 수 있을 만큼 충분한 양을 얻기가 대단히 어렵다는 단점을 가지고 있다. 이런 맥락에서 上記한 마늘의 花芽發生 캘러스를 이용하면 캘러스로부터 分化되는 花芽 分裂組織에서 花芽形成에 관련된 생화학적 변화의 폭넓은 관찰을 가능하게 할 것으로 전망된다.

花芽發生이 전사 수준의 유전자 발현 조절에 의하여 이루어진다고 할 때 花芽發生 조절 유전자(regulatory gene)가 분리되면 constitutive promoter에 연결

하여 일반 식물에서 발현되도록 함으로써 환경 조건에 관계없이 花芽가 형성되도록 조절할 수 있을 것이다. 또한 조절 유전자의 antisense RNA를 발현시키면 다른 발달 과정에는 영향을 주지 않고 花芽形成 만을 차단함으로써 花芽形成 메카니즘의 분자생물학적 분석이 가능하게 될 것이다.

참 고 문 헌

1. Bernier, G. 1988. The control of floral evocation and morphogenesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39:175-219.
2. Bernier, G., J.M. Kinet and R.M. Sachs. 1981. The physiology of flowering, Vol. II. Boca Raton : CRC
3. Borkird, C., J.H. Choi, Z.H. Jin, G. Franz, P. Hatzopoulos, R. Chorneau, U. Bonas, F. Pelegri and Z.R. Sung. 1988. Developmental regulation of embryonic genes in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6399-6403.
4. Chailakhyan, M. Kh. 1937. Concerning the hormonal nature of plant development processes. *C.R. (Dokl.) Acad. Sci. URSS* 16 : 227.
5. Chailakhyan, M. Kh., N.P. Aksenova, T.N. Konstantinova and T.V. Bavrina. 1974. Use of tobacco stem calluses for the investigation of some regularities of plant flowering. *Phytomorphology* 24:86-96.
6. Chang, Wei-Chin and Y. Hsing. 1980. *In vitro* flowering of embryoids derived from mature root callus of ginseng(*Panax ginseng*). *Nature* 284: 341-342.
7. Choi, J.H., L.S. Liu, C. Borkird and Z.R. Sung. 1987. Cloning of genes developmentally regulated during plant embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1906-1910.
8. Cleland, C.F. 1978. The flowering enigma. *BioScience* 28:265-269.
9. Cousson, A. and K. Tran Thanh Van. 1981. *In vitro* control of *de novo* flower differentiation from tobacco thin layers cultured on a liquid medium. *Physiol. Plant.* 51:77-84.
10. Darvill, A.G. and P. Albersheim. 1984. Phytoalexins and their elicitors-a defence against microbial infection in plants. *Ann.*

Rev. Plant Physiol. 35:243-275.

11. Dhindsa, R.S., G. Dong and L. Lalonde. 1987. Altered gene expression during auxin - induced root development from excised mung bean seedlings. *Plant Physiol.* 84:1148-1153.
12. Eberhard, S., N. Doubrava, V. Marfa, D. Mohnen, A. Southwick, A. Darvill and P. Albersheim. 1989. Pectic cell wall fragments regulate tobacco thin-cell-layer explant morphogenesis. *The Plant Cell* 1:747-755.
13. Evans, L.T. 1969. In, L.T. Evans(ed). The induction of flowering. Some case histories. Cornell Univ. Press, Ithaca, N. Y. pp. 457-480.
14. Evans, L.T. 1971. Flower induction and the florigen concept. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 22:365-394.
15. Hong Y.-N. and P. Schoper. 1981. Control by phytochrome of urate oxidase and allantoinase activities during peroxisome development in the cotyledons of mustard(*Sinapis alba* L.) seedlings. *Planta* 152:325-335.
16. Khan, A. A. 1971. Cytokinins : permissive role in seed germination. *Science* 171:853-859.
17. Lang. A. 1965. Physiology of flower initiation. In, W. Ruthland(ed.) *Encyclopedia of plant physiology.* Springer-Verlag, New York. pp. 1380-1536.
18. Lee, H.S., K.-W. Lee, S.G. Yang, J.H. Jeon and J.R. Liu. 1989a. Plant regeneration through somatic embryogenesis from cultured mature zygotic embryos of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) and flowering of plantlets. *Kor. J. Bot.* (In press)
19. Lee, H.S., K.-W. Lee, S.G. Yang and J.R. Liu. 1989b. Control of in vitro flowering of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) by growth regulators. *Kor. J. Bot.* (In press)
20. Lee, H.S., K.-W. Lee, S.G. Yang and J.R. Liu. 1989c. Induction of florigenic callus and identification of putative floral evocation-specific proteins by two-dimensional gel electrophoresis in garlic (*Allium sativum* L.). (In preparation).
21. Lejeune, P., J.-M. Kinet and G. Bernier. 1988. Cytokinin fluxes during floral induction in the long day plant *Sinapis alba* L. *Plant Physiol.* 86:1095-1098.

22. Letham, D.S. 1978. Cytokinin. In, D.S. Letham, P.B. Goodwin and T.J.V. Higgins(eds.). Vol. 1, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam. pp.205-263.
23. Meeks-Wagner, D.R., E.S. Dennis, K. Tran Thanh Van and W.J. Peacock. 1989. Tobacco genes expressed during in vitro floral initiation and their expression during normal plant development. The Plant Cell 1:25-35.
24. Miginiac, E. and N. Lacombe. 1973. Influence de phenomenes d'antagonisme entre organes et entre regulateurs sur le developpement floral de bourgeons cotyledonaires chez le Scrofularia arguta Sol. Can. J. Bot. 51:465-473.
25. Mohr, H. 1978. Pattern specification and realization in photomorphogenesis. Bot. Mag. Tokyo Special Issue 1:199-217.
26. Nitsch, C. 1972. The role of growth regulators in flowering as demonstrated by in vitro techniques. In, H. Kaldewey and Y. Vardar(eds.) Hormonal regulation in plant growth and development. Proc. Adv. Study Inst. Izmir 1971. Verlag Chemie, Weinheim. pp. 413-421.
27. Nitsch, C. and J.P. Nitsch. 1967. The induction of flowering in vitro in stem segments of Plumbago indica L. II. The production of reproductive buds. Planta 72:371-384.
28. Schopfer, P. 1984. Phytomorphogenesis. In, Advanced plant physiology pp. 380-407.
29. Scorza, R. 1982. In vitro flowering. Horticultural Reviews. Vol. 4: 106-127.
30. Scorza, R. and J. Janick. 1980. In vitro flowering of Passiflora suberosa. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105:892-897.
31. Srinivasan, C. and M.G. Mullins. 1978. Control of flowering in the grapevine(Vitis vinifera L.). Formation of inflorescences in vitro by isolated tendrils. Plant Physiol. 61:127-130.
32. Tran Thanh Van, K. 1973. In vitro control of de novo flower, bud, root, and callus differentiation from excised epidermal tissues. Nature 246:44-45.
33. Tran Thanh Van, K. 1980. Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers. Int. Rev. Cytol., Suppl. 11A:175-194.

34. Tran Thanh Van, K., P. Toubart and A. Cousson. 1985. Manipulation of the morphogenetic pathway of tobacco explants by oligosaccharins. *Nature* 314:615-617.
35. Tran Thanh Van, K. and T.H. Trinh. 1986. Fundamental and applied aspects of differentiation *in vitro* and *in vivo*. In, D.A. Evans, W.R. Sharp and P.V. Ammirato(eds.) *Handbook of plant cell culture. Techniques and application. Vol 4.* Macmillan. New York. pp. 316-335.
36. Wardell, W.L. and F. Skoog. 1969. Flower formation in excised tobacco stem segments. I. Methodology of effect of plant hormones. *Plant Physiol.* 44:1402-1406.
37. White, P.R. 1943. Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient for cultivation of excised tomato roots. *Growth* 7: 53-65.
38. Zeevaart, J.A.D. 1976. Physiology of flower formation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27:321-348.

저 자 약 력

유 장 령 (劉長烈) 박사

- 1952. 1. 3. 생
- 1974. 2 서울대학교 식물학과 (이학사)
- 1977. 미국 California주립대학교 생물학과 (이학석사)
- 1981. 미국 Michigan주립대학교 원예학과 (농학박사)
- 1977 - 81 미국 Michigan주립대학교 연구조교
- 1981 - 84 미국 Florida대학교 연구원
- 1985 - 현재 한국과학기술연구원 유전공학센터 선임연구원
- 1989 - 현재 등 식물세포생물학연구실장

이 광 응 (李光雄) 박사

- 1940. 2 21. 생
- 1963. 2 서울대학교 식물학과 (이학사)
- 1967. 2 서울대학교 대학원 식물학과 (이학석사)
- 1976. 2 서울대학교 대학원 식물학과 (Ph. D.)
- 1973. 2. - 현재 서울대학교 식물학과 교수
- 1976. 10. - 77. 10. 미국 California대학교 Berkeley 식물학과 연구원
- 1987. 9. - 88. 8. 미국 Cornell대학교 생화학, 분자 및 세포생물학과 객원교수