

## 시호(*Bupleurum falcatum* L.)의 캘러스로부터 부정근 분화에 미치는 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid의 영향과 분화의 해부학적 고찰

배형화 · 조덕이\*<sup>1</sup> · 김성길 · 소응영 · 성낙선<sup>2</sup>  
전북대학교 생물학과, 전주우석대학교 생물학과, <sup>2</sup>국립보건원 생약규격과

### Effects of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid on Adventitious Root Formation from Callus of *Bupleurum falcatum* L. and Its Histological Observation

Hyung Hwa BAE, Duck Yee CHO\*<sup>1</sup>, Sung Gil KIM, Woong Young SOH, and Rock Seon SEONG<sup>2</sup>

Department of Biology, Chonbuk National University, Chonju, 560-75;

<sup>1</sup>Department of Biology, Chonju Woosuk University, Chonbuk, 565-800; and

<sup>2</sup>Division of Herb Drug Standardization, National Institute of Health, Seoul 122-040. \*Corresponding author.

Calli were induced from leaf explants of *B. falcatum*, and selected cell clumps of the calli (900-1,000  $\mu$ m) were cultured on MS medium supplemented with 0.1, 0.5, 1.0 or 2.0 mg/L 2,4-D for 7 days, respectively. The clumps were subsequently transferred onto MS basal medium and subcultured for four weeks. In order to investigate the effect of 2,4-D pretreatment, the selected clumps were cultured on MS medium supplemented with 0.1 mg/L 2,4-D for 24, 48, 72, 96, 120 or 144 hours and then transferred to liquid MS basal medium, wherein they were cultured for 4 weeks. Histological observation showed that root initial cells were developed from cells on the surface of clumps or from cells in the inner region. Clumps on the basal medium produced roots within 5 days of culture. The rate of protruding time was inversely proportional to the concentration of 2,4-D. The number of adventitious roots per clump pretreated with 0.1 mg/L 2,4-D was an average of 5.2, which was the highest level. On MS medium as control, the clumps formed 3.3 adventitious roots each. As the concentration of 2,4-D increased, the number of adventitious roots were declined accordingly. The number of adventitious roots as the period of pretreatment increased upto 120 h.

Key words: cell clump, root initial

## 서 론

부정근 형성에 관한 연구는 일반적으로 배측 및 잎의 절편을 재료로 이루어졌으며(Gonzalez et al., 1991) 부정근 형성을 촉진시키는 여러가지 물리 화학적 방법이 보고되어져 왔지만(Geuns, 1988) 특히 오옥신에 의한 촉진효과는 널리 알려져 있다(Cho., 1985 : Cho and Soh, 1981 : Ladeinde

and Soh, 1991). 부정근의 발생과정은 1) 탈분화(분열조직화)과정, 2) 근원기 형성기 및 3) 근 신장기등으로 구분할 수 있는데(Esau., 1977), 오옥신은 부정근 발생의 초기단계인 분열조직화 과정인 시원세포 및 근원기 형성기에 촉진적인 것으로 알려져있다(Cho, 1985). 오옥신은 시원세포 형성기 및 근원기 형성기뿐만 아니라 근 신장기에서도 촉진적이라고 보고가 있지만(Shibaoka, 1971), 오옥신은 부정근

형성에 있어 근원기 형성만을 유도하므로 부정근이 신장되려면 반드시 오옥신을 제거해야 한다는 보고도 있다(Reynolds, 1986). 이와같이 부정근 형성의 각 단계별 요구 조건이 다르게 보고되었으며 부정근의 형성은 재료식물, 절편 크기, 연령 및 배양실험의 물리 화학적 조건에 따라 서로 달라진다는 주장도 있다(Gonzalez et al., 1992).

부정근의 원기발생은 주로 유관속 형성층, 사부유조직의 세포가 횡단분열하여 일어나며 이어서 절선분열과 방사분열을 계속하여 일어나서 근원기를 형성한 다음 유관속초와 피층을 뚫고 신장된다(Soh et al., 1980). 그러나 Phillip (1984)은 자엽을 재료로 한 실험에서 부정근이 유관속초가 아닌 한 층의 표피세포에서 기원된다고 보고하고 있다. 이와같이 식물절편을 재료로 한 부정근의 기원에 관한 연구는 많이 있으나 탈분화된 캘러스 세포로부터 부정근의 기원에 관한 연구는 당근을 재료로 한 실험에서 캘러스 표면에서 기원된다는 보고가 있을뿐 이에 대한 연구는 미비한 실정이다(Halperin, 1966; Reynolds, 1986; Gonzalez et al., 1991).

따라서 식물절편으로 부터 기원되는 부정근형성의 조직학적 연구결과를 아직 기관이나 조직의 분화가 이루어지지 않은 캘러스 세포에 그대로 적용시키기는 어렵다고 생각된다. 본 실험은 탈분화된 캘러스 세포피에서 부정근 시원세포의 기원과 근원기 형성 및 부정근의 형성과정을 조직학적으로 관찰하고 부정근 형성단계에 미치는 2,4-D의 영향을 밝히고자 시도 하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

시호(*Bupleurum falcatum* L.)의 종자를 vermiculite에 파종하여 25°C, 1,900 lux의 연속광의 배양실에서 50일간 생육시켰다. 경엽부의 길이가 약 4 cm로 성장한 유식물로부터 제 1엽 (길이 2.5 cm × 폭 7-8 mm)을 채취하여 70% 에탄올로 1분간 침적시키고 멸균수로 3회 세척한 후 이를 1% sodium hypochlorite로 7분간 표면살균시켜 멸균수로 3회 세척하였다. 살균된 재료는 주맥을 중심으로 하여 주축방향으로 5 mm × 5 mm씩 절단하여 재료로 사용하였다.

### 캘러스의 유도

이와같은 잎 절편체는 MS(Murashige and Skoog, 1962)배지에 0.1 mg/L 2,4-D와 30 g/L 서당을 첨가한 한천배지상에 이식하였다. 한천을 넣기전 배지는 pH를 5.6으로 조정하여 120°C에서 10분간 고압멸균하였다. 이와 같은 배지

상에서 배양중인 잎 절편체로부터 캘러스 유도에 미치는 생장조절물질의 영향을 알아보기 위하여 2,4-D, IAA, NAA를 kinetin과 농도별로 조합처리 하였다. 배양은 1900 lux의 16시간 광주기로 25°C에서 2개월간 실시해서 캘러스를 유도하였다.

### 부정근 형성에 미치는 2,4-D의 영향

부정근 형성에 미치는 2,4-D의 영향을 조사하기 위하여 직경 700-1,000 μm의 선별된 배양세포를 2,4-D 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L가 첨가된 MS배지에 7일간 액체진탕 배양하였다. 이 때의 배양조건은 위의 캘러스 유도시와 동일하였다. 배양 7일후 각 배양세포피들은 생장조절물질이 첨가되지 않은 MS 배지에 4주 계대배양하여 부정근 발생시기 및 세포피당 신장된 부정근의 수와 길이를 조사하였다.

또한 2,4-D의 처리시간에 따른 부정근 형성율을 조사하기 위하여 0.1 mg/L 2,4-D가 처리된 MS배지에 균일한 크기로 선별된 세포피를 24, 48, 72, 96, 120, 144시간 동안 위와 동일한 방법으로 액체진탕 배양후 생장조절물질이 첨가되지 않은 MS배지에 계대배양하여 4주후 부정근의 수와 길이를 조사하였다.

### 조직학적 관찰

2개월간 배양하여 유도된 캘러스를 액체배지 20 ml가 들은 100 ml 삼각 플라스크에 200 mg씩을 넣고 100 rpm으로 액체진탕 배양하였다. 배양 24시간후에 직경 700-1,000 μm의 스테인레스망으로 균일한 배양세포피만을 선별하여 식물 호르몬이 첨가 되지 아니한 액체배지에서 배양하였다. 배양조건은 캘러스 유도시와 동일하였으며 해부학적 연구를 위하여 배양 24시간 간격으로 캘러스를 FAA에 고정하였다. 고정된 재료는 부탄을 시리트로 탈수하고 paraplast에 포매시켜 10 μm 두께로 절편을 만들어 hematoxylin과 fast green으로 이원염색한 후 광학현미경하에서 관찰하였다.

## 결 과

### 캘러스의 유도

시호의 어린잎으로부터 캘러스의 유도는 MS 기본배지에서 0.1 mg/L 2,4-D를 단독처리시 가장 효과적이었으며 0.1 mg/L 2,4-D와 카이네티를 조합처리시에는 농도에 영향을 받지 않고 잘 유도되었다(Table 1). 이와같이 시호잎의 캘러스 유도에는 카이네티의 처리에 의한 효과가 없었음을 나타내었다. 또한 NAA와 IAA처리시에 있어서는 캘러스

**Table 1.** Effect of auxins and cytokinin on callus induction from *B. falcatum* leaf explants.

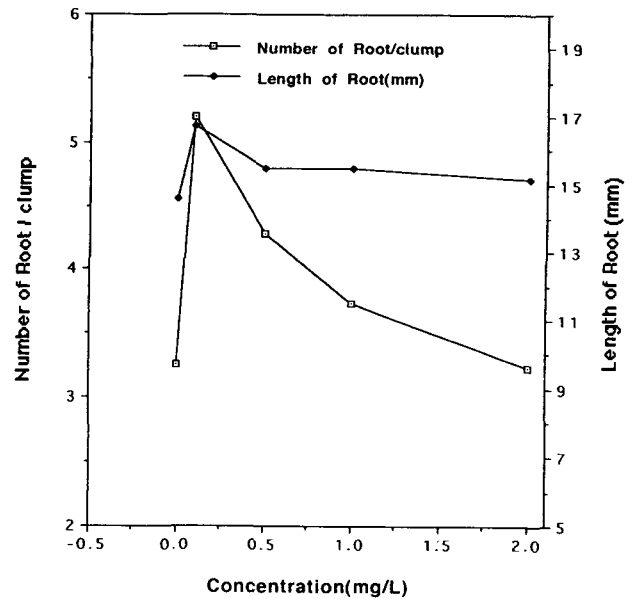
Auxin (mg/L)	Kinetin (mg/L) <sup>a</sup>			
	0.0	0.1	1.0	10
24-D	0	+	++	++
	0.1	+++	+++	+++
	1	++	++	+
	10	+	+	++
NAA	0	+	+	++
	0.1	-	-	-
	1	+	+	+
	10	+	+	+
IAA	0	++	++	+
	0.1	-	-	+
	1	-	++	+
	10	+	+	-

<sup>a</sup>+++; excellent, ++; very good, +; good, -; bad.

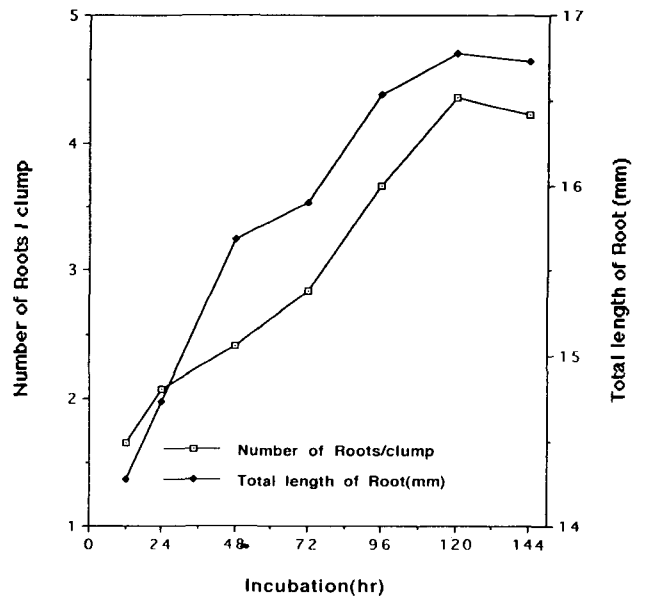
유도율이 0.1 mg/L 24-D와 비교하여 떨어졌다.

**부정근 유도에 미치는 24-D의 영향**

시호 켈러스로부터 부정근유도에 미치는 24-D의 영향은 부정근 발생초기에는 효과적이었으나 4주간 계속해서 처리시킬 경우 부정근의 형성은 극히 미약하거나 일어나지 않았다. 부정근 유도를 위한 24-D의 적정농도는 세포피에 농도별로 처리하여 7일간 배양후 다시 24-D가 제거된 배지에 계대배양하여 4주간 배양후 관찰한 결과 0.1 mg/L 24-D 전처리시 세포피당 평균 5.2개의 부정근을 형성하여 가장 높았으며 농도가 증가할수록 부정근의 수는 감소되었다. 이때 유도된 부정근의 길이는 평균 16.7mm 로 가장 길었으며 0.5 mg/L 24-D 처리시부터 고농도 처리시에는 부정근 길이가 짧고 약간 굵었다(Fig. 1). 또한 부정근의 발생은 대조구에 있어서는 배양 5일후부터 일어났으며 농도가 증가할수록 발생시기는 늦어졌다. 24-D의 처리 시간이 부정근 발생에 미치는 영향을 알아보기 위하여 0.1 mg/L 24-D를 시간별로 처리한 후 24-D 무첨가 MS배지에 4주간 액체진탕 배양하였다. 이 때 세포피당 부정근 수는 120시간 전처리시까지 점진적으로 높게 나타났으며 144시간 처리시 오히려 저해적이었다. 부정근 길이 역시 120시간 전처리시에 가장 길었고(16.77mm/부정근) 부정근수에 있어서와 같은 경향을 나타내었다. 즉 120시간 전처리시 가장 양호하였다(Fig. 2). 또한 24-D에서 계속적으로 배양할 경



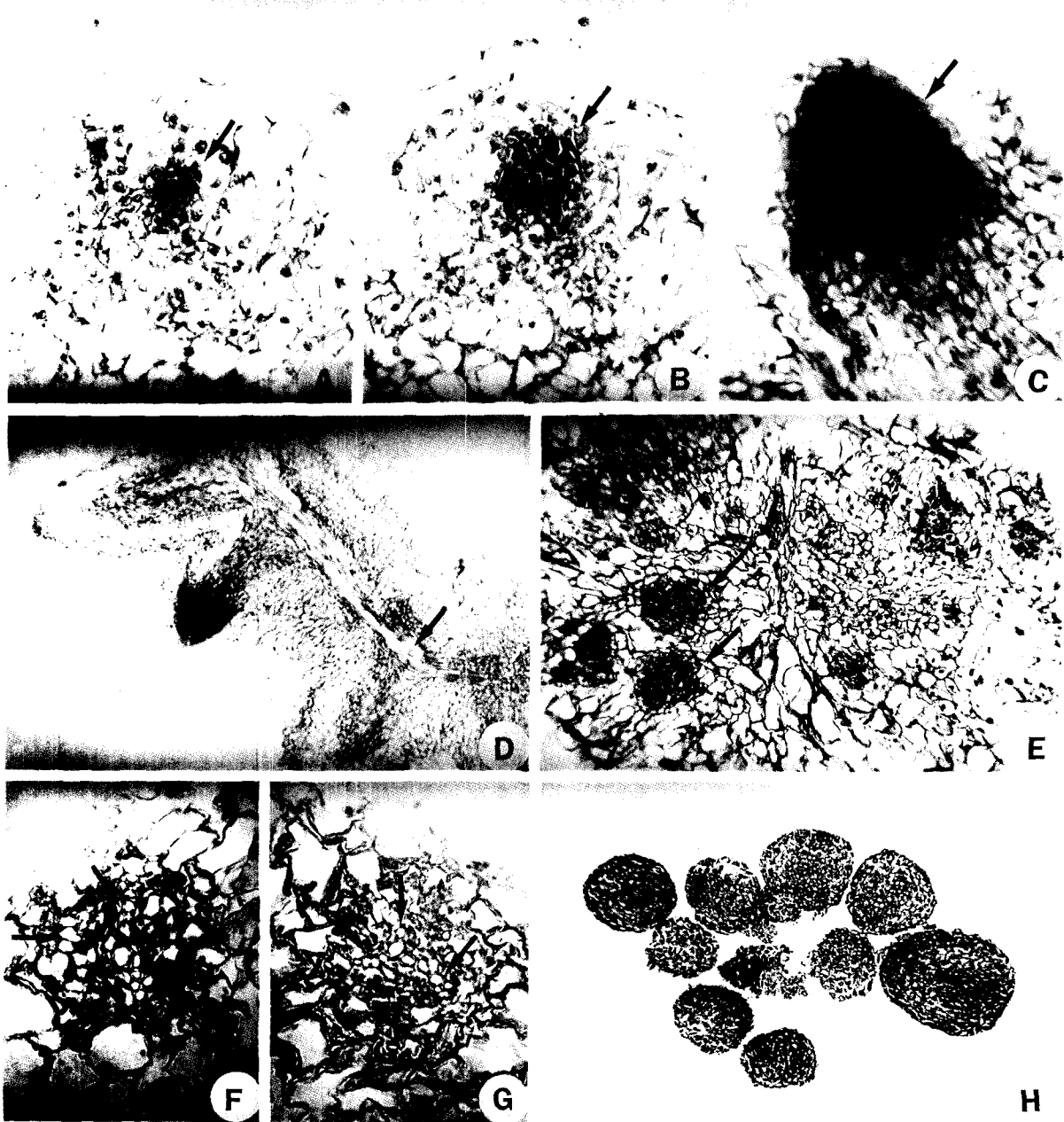
**Figure 1.** Effects of 24-D pretreatment for 7 days on the number and length of adventitious root. Data were collected after one month of culture on hormon-free medium.



**Figure 2.** Effects of 24-D pretreatment on the number and total length of adventitious root. Data were collected after one month of culture on hormon-free medium.

우 부정근의 신장은 거의 일어나지 않았으며 세포피의 모양이 여러개의 구형세포피를 모아놓은 것처럼 부풀어졌다(Fig. 3H).

**조직학적 기원**



**Figure 3.** Tangential and longitudinal section of cell clump in various developmental stages. A: initial cells near the callus surface(X271). B: promordium(X260). C: protruding adventitious root(X188). D: many roots formed along tracheid cambial(53). E: root initial cells and primordia formed at site randomly(X167). F: xylem in multipul origin root(X290). G: xylem in single origin root(X290). H: swelled cell clump without forming roots on medium containing 2,4-D(X81).

시호의 옆 절편 캘러스로부터 유도되는 부정근의 조직학적 발생과정은 식물절편조직에서 기원되는 부정근과 비슷하였다. 캘러스 세포피로부터 부정근의 형성시 시원세포는 캘러스의 표면에서부터 내부에 이르기까지 불규칙적인 위치에서 기원되어졌다(Fig. 3E). 그러나 시원세포형성은 캘러스 표면 및 내부세포에서 형태형 성능을 갖지 않는 주변

의 세포와는 달리 세포질이 풍부하고 액포화되지 않은 크기가 작은 세포가 식별되며 이 세포들이 부정근의 세포배열을 활발히 하는 시원세포로 된다(Fig. 3A). 이와같이 완성된 시원세포군이 캘러스 표면쪽을 향해 반원형 활동을 하면서 근원기를 형성 하였다(Fig. 3B). 이때 형성되는 근원기의 진행방향은 모두 표면쪽으로 향하고 있었다. 근원

기의 세포분열이 진행되며 점차로 신장생장이 이루어진 결과 하나의 뚜렷한 반원형 구조를 형성하였으며 이 구조의 세포배열이 규칙적으로 되면서 점차 주변의 액포화된 캘러스 세포와 구별되는 형태를 갖추기 시작한다(Fig. 3B). 근원기는 세포분열이 진행되면서 캘러스 표면밖으로 돌출하면서 근 신장 단계가 시작되며(Fig. 3C) 유관속 조직의 형성은 이루어지지 않고 있으며 2층의 근관조직을 형성하였다.

돌출된 부정근은 신장생장이 지속되면서 4-6층의 근관조직을 형성하고 (Fig. 3D Arrows). 이때 비로소 부정근은 도관이 형성 된다. 또한 캘러스 표면 밖으로 돌출된 부정근은 신장생장이 진행되어 길이 4-5 mm 정도 신장되고 캘러스 내부에서 형성되어 있던 도관과 연결되어진다(Fig. 3D Arrows). 하나의 세포괴로부터 다수의 부정근이 동시에 형성되는 경우에 있어서나 하나의 부정근이 형성되는 경우에 있어서 형성되는 부정근수와 관계없이 해부학적으로는 동일한 삼원형의 목부를 형성하였다(Fig. 3F, G).

## 고 찰

시호의 부정근 형성에는 2,4-D의 처리가 촉진적인 영향을 미치며 120시간의 전처리가 가장 효과적이었다. 이와같은 결과는 고구마를 재료로한 실험에서 1.0 mg/L 2,4-D가 첨가된 배지에서 1주일간 배양 후 MS 기본배지에 계대배양한 조직에서 부정근 발생빈도가 66.7%로 최대치를 보이며 2,4-D가 첨가된 배지에 배양기간이 길어질수록 부정근 발생빈도가 낮아진다는 Liu 등(1992)의 보고와 유사성이 있으며 부정근 형성초기에 2,4-D가 적절한 농도 및 배양기간에서는 부정근 원기형성에 촉진적인 효과를 나타내었다.

강남콩 하배축 절편에 있어서 IAA에 의한 부정근원기형성이 절편제작 후 근원기 형성 단계인 전반 24시간 처리시(0-24hr) 후반 24시간 처리시(24-48hr)보다 더욱 효과적이라는 것을 Cho와 Soh(1989)가 보고하였다. 이와같은 결과는 시호의 캘러스로부터 부정근의 형성과정에 있어서 부정근 시원세포 및 근원기 형성과정에만 저농도의 2,4-D가 효과적이었으며 신장기에 있어서는 2,4-D가 저해작용을 한 결과와 같은 경향으로 본다. 일반적으로 대부분 식물에서 부정근 유도에 오옥신이 필요하나 이는 근원기 형성과정까지이고 이 근원기가 생장하기 위해서는 오옥신이 제거되어야 효과적이라는 Pierik(1987)의 보고와 같은 경향을 보였다. 이와같은것은 오옥신이 근원기 형성과정에 필요하다는 것을 뜻한다. 또한 이 결과는 오옥신이 부정근 형성에 미치는 영향에 관한 보고중 초기 시원세포 및 근원기 형성단계까지는 저해적이라는 Ohyma(1980)의 보고와 다른 경향이고, 2,4-D는 부정근 형성에 있어서 근원기 형성만을 유도

하므로 부정근이 신장되려면 반드시 2,4-D가 제거 되어야 한다고 하는 Reynolds(1986)의 보고는 본 연구와 같은 경향이었다.

또한, 부정근 형성 전과정중 특히 근신장단계에서는 오옥신에 의해서만 촉진될 수 있다는 Shibaoka(1971)의 보고와 근원기 형성기와 근원기가 부정근으로 신장하는때는 오옥신이 촉진적인 영향을 미친다는 Davies(1982)의 보고와 상반된다. 그러므로 부정근 형성에 관한 오옥신의 영향은 재료의 크기, 조직의 부위(Ladeinde and Soh, 1991), 재료의 연령, 재료식물의 종류 및 물리, 화학적 환경(Gonzalez et al., 1991)에 따라 달라질 수 있는 것인가를 구명해 볼 필요가 있다.

캘러스 세포에 부정근의 발생은 특정조직에서 기원되는 것이 아니라 캘러스 표면 및 내부의 불규칙적인 위치에서 근시원세포가 형성되어 시작된다. 이 결과는 Halperin(1966)의 당근을 재료로한 실험에서 근원기는 캘러스 내부에 원형으로 형성된 tracheid-cambial로부터 발생된다는 보고와 Davies 등 (1986)의 *Ficus pumila* L.를 재료로 한 실험에서 부정근이 tracheid-element 주변에서 기원된다는 보고와는 상반되는 결과로 먼저 부정근이 형성된 후 캘러스 내부에 원형으로 형성된 tracheid-cambial에 연결되어졌다. 분열중인 시원세포에서 표면쪽으로 반원형의 분열조직이 형성되어 왕성한 분열을 보이는 것은 절편조직을 재료로한 실험에서도 볼 수 있는 현상으로 생각된다(Phillip, 1984). 캘러스에서 근원기가 형성되어 부정근으로 신장되는 과정중에 조직내부에 형성된 도관과 연결 되는 것은 자엽을 재료로 한 부정근의 분화에서 먼저 부정근 원기가 형성되고 나중에 모조직의 도관과 연결되는 경우와 유사한 결과이었다(Gonzalez et al., 1991).

## 적 요

시호의 어린 잎 절편으로부터 캘러스의 유도는 0.1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS배지에서 가장 우수하였다. 유도된 캘러스는 균일한 크기의 세포괴만을 선발하여 MS배지에 0, 0.1 mg/L, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L의 2,4-D를 첨가하여 7일간 배양한 다음, 세포괴를 부정근 유도를 위해 2,4-D가 제거된 MS배지에 계대배양하여 부정근의 형성과정 및 근원기 형성에 미치는 효과를 관찰하였다. 그 결과 부정근 형성은 0.1 mg/L 2,4-D를 처리후 호르몬 무처리 배지에 옮겨주었을 때 세포괴당 평균 부정근수 5.2개로 가장 우수하였고 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였다. 신장된 부정근의 길이에 있어서는 각 처리구별로 14-16 mm 로 농도차에 따른 차이를 보이지 않았다. 처리시간에 따른 부정근의 형성에서는 수록 세포괴당 부정근의 수가 증가 하였으며 120시

간에 이르러서 최대치를 보였다. 이 결과 부정근 발생에 있어 적정농도의 2,4-D는 부정근 시원세포기 및 근원기 발생기에 민감한 영향을 미치며 근원기가 캘러스 표면밖으로 돌출되는 시기에는 저해적인 것으로 생각된다. 조직학적 기원에 있어서는 특정한 조직의 기원이 아닌 캘러스 표면 세포 및 내부세포로부터 최초 여러개의 시원세포가 형성되어, 캘러스 표면쪽으로 왕성한 반원형의 분열조직을 형성한 다음에 신장 되었다.

### 인 용 문 헌

- Cho DY (1985) Distribution and quantitative determination of IAA by high performance liquid chromatography on adventitious root formation in *Azukia epicotyl* cuttings. Korean J Plant Tissue Culture 12: 79 - 87
- Cho DY, Soh WY (1981) Adventitious root formation from the hypocotyl of *Phaseolus vulgaris*. Korean J Plant Tissue Culture 8 : 23 - 26
- Cho DY, Soh WY (1989) Effect of endogenous IAA transport on adventitious root formation in *Phaseolus vulgaris* hypocotyl cuttings. Korean J Bot 32: 323 - 330
- Davies FJ, Lazarte JE, Joiner JN (1982) Initiation and development of root in juvenile and mature leaf bud cuttings of *Ficus pumila* L. Amer J Bot 69 : 804 - 811
- Esau K (1977) Anatomy of Seed Plants, Second Edition, John Wiley and Sons.
- Geuns JMC (1988) Synergism between IAA and cortical in the adventitious root formation in mung bean cuttings. J Plant Physiol 132: 370 - 377
- Gonzalez A, Casares A, Sanchez TR, Rodriguez R (1991) Adventitious root induction in *Corylus avellana* L. cotyledon slices in Vitro cell Dev Biol 279: 125 - 131
- Halperin W (1966) Alternative morphogenetic events in cell suspensions. Amer J Bot 53 : 443 - 452
- Ladeinde TAO, Soh WY (1991) Effect of different growth regulators on organogenesis and total fresh weight gain in cultured leaf tissue of cowpea <*Vigna unguiculata* (L.) Walp>. Phytomorphology 41 : 99 - 107
- Liu JR, Min SR, Yang SG (1992) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid at a single concentration determining various morphogenesis patterns in shoot apical meristem cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas*). Korean J Plant Tissue Culture 19 : 167 - 170
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15 : 473-497
- Ohyama K, Oka S (1980) Bud and root formation in hypocotyl segments of *Broussonetia Kazinoki* Siev in vitro. Plant Cell Physiol 21 : 487 - 492
- Pierik RLM (1987) Adventitious Root Formation In Vitro Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp 203 - 209
- Reynolds TL (1986) Somatic embryogenesis and organogenesis from callus culture of *Solaum crolinense*. Amer J Botany. 73 : 914 - 918
- Shibaoka H (1971) Effects of indoleacetic, P-chlorophenoxyisobutylic and 2,4,6-trichlorophenoxyacetic acid on three phase of rooting in azukia cuttings. Plant and Cell Physiol 12 : 193 - 209
- Soh WY, Jeon KB, Cho DY (1980) The effect of cadmium and auxin on the adventitious root formation in hypocotyl segments of *Phaseolus vulgaris* L. Korean J Plant Tissue Cult 7 : 43 - 48

(1993년 11월 19일 접수)