

땅두릅(*Aralia cordata* Thunb.)의 조직배양에서 체세포배의 자엽 수 변화에 미치는 ABA의 영향

이강섭 · 소웅영*

전북대학교 자연과학대학 생물학과

Effect of Absciscic Acid on the Number of Somatic Embryo Cotyledons in Tissue Cultures of *Aralia cordata* Thunb.

Kang Seop LEE and Woong Young SOH*

Department of Biology, Chonbuk National University, Chonju, 560-756. *Corresponding author.

In order to elucidate the effect of absciscic acid (ABA) on the abnormality of somatic embryos, somatic embryos were induced from embryogenic cell clumps derived from cotyledon segments of *Aralia cordata*. When embryogenic cell clumps were pretreated medium containing 0.2 mg/L ABA for 3 weeks before transferring to MS basal medium, the frequency of embryos with normal cotyledons enhanced 68% as compared with control. However, when clumps pretreated in medium containing 0.2 mg/L ABA were transferred to medium containing 0.1 mg/L ABA, the frequency decreased to about 29%. In the case of globular embryos cultures in medium containing various concentrations of ABA (0.01 to 1.0 mg/L), the frequency of dicotyledonary embryo formation decreased proportionally to ABA concentration. Also, when somatic embryos at various stages were cultured in medium containing ABA, those with polycotyledons appeared at higher frequency.

Key words: embryogenic cells, polycotyledonary embryos

여러 가지 식물의 접합자배 및 체세포배에 있어서 absciscic acid (ABA)는 조기발아를 억제하고(Ammirato, 1974; Choinski et al., 1981; Ackerson, 1984; Kim et al., 1986; Qureshi et al., 1989), 휴면을 유도할 뿐 아니라(Wareing and Phillips, 1981), 저장단백질의 축적을 증진시키며(Bray and Beachy, 1985; Walker-Simmons et al., 1989), 배의 성숙에도 관여한다(Akerson, 1984; Quatrano, 1987). 또한 ABA는 여러 식물로부터 체세포배발생을 촉진하거나(Rajasekaran et al., 1987; Kochba et al., 1978; Nitsch and Nitsch, 1969; Imamura and Harada, 1980b), 억제하기도 한다(Kim et al., 1986).

ABA를 처리하면 caraway, 당근 및 참죽나무로부터 각각 접합자배와 유사한 정상적인 체세포배의 발생이 유도된다(Ammirato, 1974, 1977; Kamada and Harada, 1981; Soh et al., 1990). 그런데, 정상적인 체세포배의 유도를 위하여 기왕의 연구에서는 ABA를 배발생세포에 일시적으로 처리한 조건에서 배양하였으므로, 체세포배발생의 전과정에서 연속적으로 ABA가 처리될 경우의 영향을 이해하는데 미흡한

것으로 보인다. 따라서 본 연구에서는 접합자배 발생중에 내재 ABA의 일정함량이 유지되는 것을 감안하여(Quatrano, 1987; Hocher et al., 1991), 배발생세포에 ABA의 일시적인 처리에 의한 체세포배의 발생 및 농도를 반감시켜 계속처리한 조건하에서 체세포배 발생에 대한 영향을 특히 자엽발생 관계를 비교 검토하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료는 다년생 초본인 땅두릅(*Aralia cordata* Thunb.)의 종자를 70% 에탄올에 1분, 그리고 1% sodium hypochlorite 용액에 약 10분간 침적시켜서 표면살균하여 멸균수로 3-4회 세정한 다음 해부현미경하에서 자엽기의 배를 적출하여 일회용 배양접시(87 × 15 mm)에 이식하여 발아 후 3주간 성장된 유식물의 자엽절편을 사용하였다. 배지는 MS 기본배지(Murashige and Skoog, 1962)에 sucrose 30 g/L,

한천 7 g/L를 첨가하여 pH를 5.8로 조절한 후, 121°C, 1.5기압하에서 15분간 멸균하여 사용하였다. ABA는 22 µm의 membrane filter를 사용하여 여과한 후 농도별로 배지에 첨가하여 사용하였다.

배양은 온도 25°C, 광도 2000 lux, 그리고 16/8(명/암) 시간의 광주기하에서 약 7주간 실시하였고 이로부터 유도된 캘러스로부터 배발생캘러스를 선발하였다. 배발생캘러스는 1.0 mg/L의 2,4-D가 첨가된 액체배지에서 90 rpm의 속도로 약 3주간 현탁배양하였고, 이 배양물을 직경 100-200 µm의 stainless sieve로 여과하여, 4주간 계대배양하면서 배발생 세포괴를 증식시켰다. 배발생 세포괴, 구형배, 심장형배 및 어뢰형배 그리고 자엽시기의 배 등의 시료는 액체배지 20 mL씩 분주한 50 ml 삼각플라스크에 0.2 mL씩 첨가하여 처리구당 3개씩 3반복하여 배양을 수행하였다.

체세포배의 자엽발생에 미치는 ABA의 영향을 구명하기 위하여, 배발생 세포괴, 구형, 심장형, 어뢰형 및 자엽시기의 배를 각각 생장조절물질이 첨가되지 않은 MS 기본배지에 5주간 배양한 대조구와 0.2 mg/L의 ABA를 처리하여 3주간 배양한 후 ABA가 첨가되지 않은 기본배지에 2주간 계속배양하거나(A처리구), ABA의 농도를 0.1 mg/L로 반감한 배지에서 2주간 배양한 경우(H처리구)의 세 처리구로 구분하여 체세포배의 자엽수를 관찰하였다. 또한, 자엽발생에 미치는 ABA의 농도별 영향을 구명하기 위하여, 구형배를 각각 0.01, 0.1, 0.2, 0.5 및 1.0 mg/L의 ABA가 첨가된 액체배지에 3주간 배양한 후 생장조절물질이 첨가되지 않은 배지와 ABA의 농도를 처음 농도의 반으로 줄인 배지에 각각 2주간 계속배양하여 자엽수를 해부현미경하에서 관찰하였다.

결 과

배발생 세포괴로부터 발생한 배의 자엽 변이와 ABA

배발생세포괴를 대조구, A처리구 및 H처리구의 세 처리구로 구분하여 체세포배의 자엽수를 관찰한 결과, 1개의 자엽배의 빈도는 세 처리구 모두에서 유사한 경향이었으며, 2개의 자엽배는 대조구에 비하여 A처리구에서는 증가하였으나 H처리구에서는 약 2배 정도 감소하였다. 3개의 자엽배는 대조구에 비하여 A처리구에서는 감소하였고 H처리구에서는 대조구와 유사하였다. 또한 4개의 자엽배는 대조구에 비하여 A처리구에서는 감소하였으나 H처리구에서는 대조구에 비하여 약 2배 정도 증가하였고, 5개의 자엽배는 대조구와 A처리구에서는 나타나지 않았으나 H처리구에서는 상당한 출현빈도를 보였다(Fig. 1).

체세포배의 자엽발생에 미치는 ABA의 농도별 영향

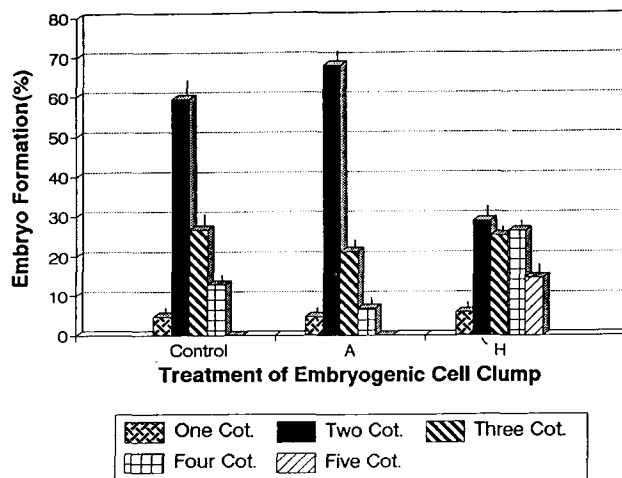


Figure 1. Effect of ABA on the cotyledon number of somatic embryo in cell cultures of *Aralia cordata*. Cell clumps were treated with 0.2 mg/L ABA for 3 weeks and transferred to the basal medium (A) or medium (H) containing 0.1 mg/L ABA, and then cultured for 2 weeks, respectively. Cot.: cotyledon. Data represent the mean of three independent experiments and Bar lines indicate standard errors.

구형배를 대조구와 ABA의 농도를 0.01, 0.1, 0.2, 0.5 및 1.0 mg/L로 다르게 하여 각각의 농도별로 A처리구(0.01A, 0.1A, 0.2A, 0.5A, 1.0A) 및 H처리구(0.01H, 0.1H, 0.2H, 0.5H, 1.0H)의 세 처리구로 구분하여 배양한 결과, 1개의 자엽을 갖는 배의 빈도는 전구간에서 10%이내로 거의 일정하였으며, 2개의 자엽을 갖는 배는 ABA의 농도가 높을수록 감소하여 1.0A처리구에서 최저치가 13%로 나타났다. 3개의 자엽을 갖는 배는 0.01A에서 0.5A처리구까지는 대조구(25.1%)에 비하여 약간 많이 나타났으나 1.0A처리구(24.8%)에서는 유사한 경향을 나타내었다. 그런데 4개의 자엽을 갖는 배는 대조구(15.1%)에 비해 전구간에 걸쳐 최저 19.4%(0.5A처리구)에서 최고 26.2%(0.01A처리구)로 높게 나타났으며, 5개 이상의 자엽을 갖는 배는 0.01A에서 0.1A처리구까지는 대조구와 유사하였으나 0.2A에서 1.0A처리구에서는 농도에 비례하여 증가하는 경향이였다(Fig. 2A). 한편 H처리구의 경우에 0.01H처리구에서 1.0H처리구까지 1-5개의 자엽수 변이경향은 A처리구의 0.01A처리구에서 1.0A처리구까지 자엽수의 변이 경향과 거의 일치하였다(Fig. 2B).

배발생 단계별 자엽수변이에 미치는 ABA의 영향

대조구, A처리구 및 H처리구로 구분하여 배양한 결과, 구형배에 0.2 mg/L ABA를 처리한 경우에 1개의 자엽을 갖는 배는 거의 일정한 수준이었으며, 2개의 자엽을 갖는 배는 대조구에 비해 감소하였으나 3개, 4개 및 5개 이상의 자엽을 갖는 배는 각각 대조구에 비해 높은 비율로 나타났다

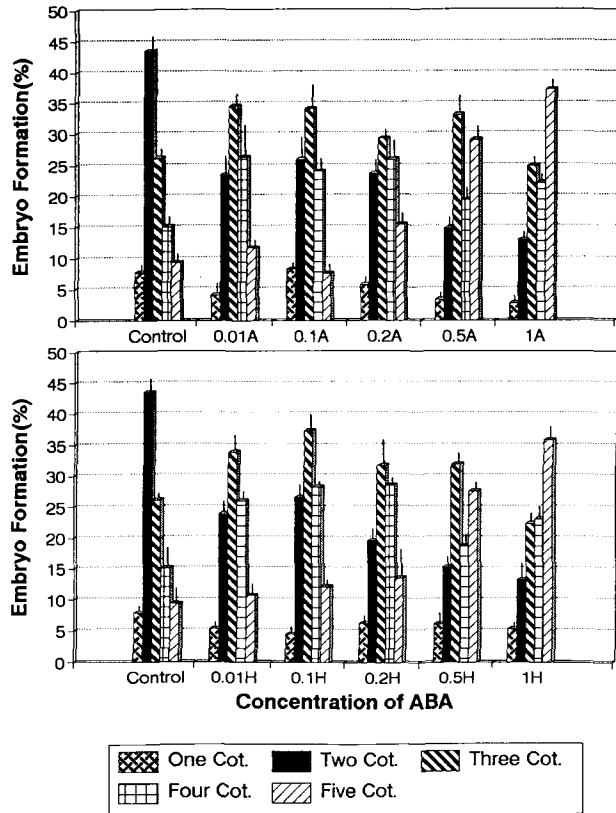


Figure 2. Effect of ABA concentrations on the cotyledon number of somatic embryos formed from cultured cells of *Aralia cordata*. Grobular embryos were treated with 0.01 to 1.0 mg/L ABA for 3 weeks and then transferred to the basal medium (A) or to the half strength (1/2 × 0.01 to 1/2 × 1.0 mg/L ABA) medium (H) and then cultured for 2 weeks, respectively. Cot.: cotyledon. Data represent the mean of three independent experiments. Bar lines indicate standard errors.

(Fig. 3-A).

심장형배의 ABA처리실험에서 1개의 자엽을 갖는 배는 대조구에 비해 약간 감소하는 경향이있으며 2개의 자엽을 갖는 배는 대조구에 비해 A처리구 및 H처리구 모두 감소하였다. 3개의 자엽을 갖는 배는 대조구에 비해 A처리구 및 H처리구 모두 약간 증가하는 경향이있다. 4개의 자엽을 갖는 배는 대조구에 비해 A처리구 및 H처리구 모두 약간 증가하였으며, 5개 이상의 자엽을 갖는 배는 대조구에 비해 A처리구 및 H처리구 모두 증가하였다(Fig. 3-B).

어뢰형배의 경우에 1개의 자엽을 갖는 배는 대조구와 두 처리구에서 유사한 경향이있으며, 2개의 자엽을 갖는 배는 대조구에 비해 A처리구 및 H처리구 모두 약 반정도로 감소하였다. 3개의 자엽을 갖는 배는 대조구에 비해 A처리구 및 H처리구 모두 약간 많이 나타나는 경향이있다. 4개의 자엽을 갖는 배는 대조구에 비해 A처리구 및 H처리구 모두 다소 증가하였으며, 5개 이상의 자엽을 갖는 배는 대조구에 비해 A처리구 및 H처리구 모두 높은 비율을 나타내었다

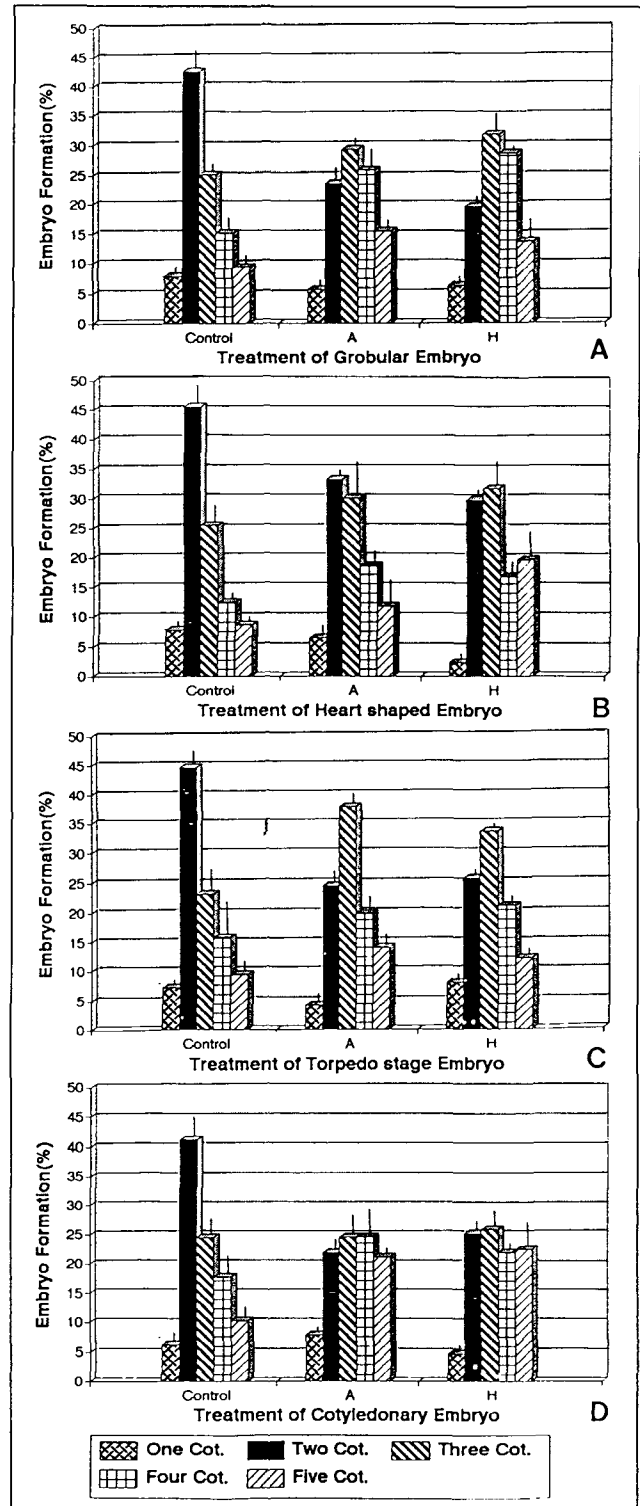


Figure 3. Variations of cotyledon number of somatic embryos treated with ABA at various stage. Embryos were treated with 0.2 mg/L ABA for 3 weeks and then cultured in basal medium (A) or medium (H) containing 0.1 mg/L ABA for 2 weeks, respectively. A: Globular stage, B: heart-shaped stage, C: torpedo stage, D: cotyledonary stage embryo. Cot.: cotyledon. Data represent the mean of three independent experiments. Bar lines indicate standard errors.

(Fig. 3-C).

자엽시기의 배의 경우에 있어서 1개의 자엽을 갖는 배는 대조구와 두 처리구에서 유사한 경향이었으며, 2개의 자엽을 갖는 배는 대조구에 비해 A처리구 및 H처리구 모두 적게 나타났다. 자엽발생이 완성된 자엽시기의 배에 ABA를 처리한 경우에는 기존의 자엽이 분지되어 자엽수가 증가되었는데, 3개의 자엽을 갖는 배는 대조구에 비해 A처리구 및 H처리구 모두 유사한 경향이었으며, 4개의 자엽을 갖는 배는 대조구에 비해 A처리구 및 H처리구 모두 약간 증가하는 경향이였다. 5개 이상의 자엽을 갖는 배는 대조구에 비해 A처리구 및 H처리구 모두 약 2배 정도 많이 나타났다 (Fig. 3-D).

고 찰

본 연구에서 배발생세포에 ABA를 처리하여 3주간 배양한 후 ABA가 첨가되지 않은 배지에 2주간 배양하였을 때 2개의 자엽을 갖는 정상적인 배의 발생은 caraway와 당근 및 참죽나무 등에서의 결과와 유사한 경향이었는데 (Ammirato, 1974; Kamada and Harada, 1981, Ammirato, 1983; Soh et al., 1990), 이상의 연구는 ABA의 일시적 자극에 대한 관찰결과임을 알 수 있다.

그런데, 밀, 콩 등 여러 식물의 자연종자 형성중의 배발생 과정에서 배의 성숙과 내재 ABA의 사이에는 밀접한 연관성이 있으며 (Quatrano, 1987), 토마토와 대두의 접합자배의 경우에 배발생의 진행에 따른 내재 IAA와 ABA의 양적변화가 있을 뿐 아니라 (Hochoer et al., 1992; Hien et al., 1984), 당근의 체세포배발생에서도 내재 ABA양이 증가된다 (Kamada and Harada, 1981). 그리고 celery의 구형 체세포배에 ABA를 1주일간 처리한 후 ABA가 첨가되지 않은 배지에 배양하면 처리기간이 짧아 ABA에 의한 배의 동조화효과가 없어진다 (Nadel et al., 1990). 이러한 두가지 문제를 감안하여 본 연구에서 ABA의 농도를 반감시켜 계속처리한 배양에서 배발생세포에 0.2 mg/L ABA를 처리하여 3주간 배양한 다음 ABA의 농도가 반감된 0.1 mg/L 처리구에 2주간 계대배양한 결과, 정상적인 2개의 자엽을 갖는 배에 비하여 3개 이상의 다자엽배의 형성률이 높게 나타났다. 이와 같은 결과는 배발생세포에 ABA를 처리하여 배양하는 동안에 진행된 배에 다시 저농도의 ABA를 처리하여 얻은 결과이다. 그러므로 caraway의 배양기간이 다른 배발생세포에 ABA를 처리하면 배양기간이 짧을수록 정상적인 배의 발생이 잘 이루어는 결과에서와 마찬가지로 (Ammirato, 1974), 배발생 진행과 ABA와의 연관성은 본 실험결과와 유사한 것으로 볼 수 있다.

본실험에서 구형배, 심장형, 어뢰형, 자엽시기 등 배발생 단계별로 배에 각각 ABA를 3주간만 처리하거나 여기에 다

시 반감된 농도에서 계속처리한 경우에 있어서도 다자엽배의 형성률은 대조구에 비하여 높게 나타났으나, ABA의 두 처리구간에 다자엽배의 형성률에는 거의 유사한 경향을 보였다. 따라서 구형배 이상의 단계에 ABA를 단기간 처리하든 계속처리하든 2개의 정상적인 자엽수를 갖는 배는 감소하고 3개 이상의 비정상적인 배의 출현이 높게 나타나므로 ABA처리하는 배의 발생단계를 고려하여 처리해야 다자엽배 발생을 조절하는데 도움이 될 것으로 사료된다.

다자엽배의 형성은 땅두릅의 경우에 본 실험에서는 ABA 처리시에 이루어졌으나, cytokinin을 처리한 경우에도 높은 빈도로 이루어짐이 밝혀진 바 있다 (Lee and Soh, 1993). 그리고 caraway의 경우에는 배양세포에 ABA와 Zeatin 및 GA₃의 조합처리할 경우 처리농도의 비율에 따라 체세포배의 발생양상 및 자엽의 수적변이가 일어나므로 (Ammirato, 1977), 자엽발생의 변이는 여러 식물생장조절물질의 상호작용에 따라 일어나는 것으로 보인다. 또한 다자엽배는 당근의 경우에 고체배지에 비하여 액체배지에서 더 증가되며 (Soh, 1993), 더덕의 경우에는 0.5-2.0%의 낮은 sucrose의 농도에서는 2개의 자엽배가 형성되지만 3.0% 이상의 높은 서당 농도에서는 다자엽배의 형성률이 높아진다는 것이 지적된 바 있어서 (Soh, 1993), 다자엽배의 형성은 식물생장조절물질외에도 다른 요인이 관여함을 알 수 있다.

땅두릅의 경우 배발생캘러스를 2,4-D배지에 계대배양없이 계속배양하거나 (Lee and Soh, 1993), 대두의 경우 미숙배를 0.2-4.0 mg/L 2,4-D 배지에 배양하면 나팔형의 이상배가 많이 유도되며 (Choi et al., 1994), 그리고 이러한 나팔형 이상배는 *Brassica juncea*의 구형 접합자배를 TIBA 등의 옥신이동 억제제를 처리하면 유도되어 옥신의 극성이동 억제가 이상배 형성과 관련성이 있음이 지적되어 있으며 (Liu et al., 1993), 이러한 이상형배는 발아가 되지않아 식물체재생이 어려운 과제로 남아 있다 (Soh, 1993). 그러므로 자엽의 수 및 형태에 관한 연구는 학술적 및 산업적 응용의 극대화를 위해 가치가 있을 것으로 사료된다.

본 실험에서 자엽시기의 배에 ABA를 처리한 경우에도 자엽수의 증가를 보인 것은 자엽원기의 증가에 의한 것이 아니고 기존의 자엽이 분지되어 다자엽으로된 것을 해부학적으로 확인할 수 있었다. 이와같이 ABA에 의한 자엽수의 증가와 자엽분지형성의 원인은 아직 분명치 않으나 해부학적인 관찰결과를 정리중에 있다.

적 요

땅두릅에 있어서 이상체세포배의 형성에 미치는 ABA의 영향을 구명하기 위하여 체세포배는 1.0 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS 기본배지상에서 자엽유래 배발생 세포로부터 유도되었다. 배발생세포에 0.2 mg/L의 ABA를 처리하여 3주

간 배양한 후 ABA가 첨가되지않은 기본배지에 2주간 계속 배양한 경우에 2개의 정상적인 자엽수를 갖는 배는 68%로, 생장조절물질이 첨가되지않은 MS 기본배지에 5주간 배양한 대조구에(59.4%) 비하여 높게 나타났다. 그러나 0.2 mg/L의 ABA를 처리하여 3주간 배양한 후 ABA의 농도를 0.1 mg/L로 반감한 배지에서 2주간 배양한 경우에는 정상 의 자엽을 갖는 배는 28.6%로 감소된 반면에 3개 이상의 자엽을 갖는 다자엽배의 형성률이 높게 나타났다. 구형배에 ABA를 농도별(0.01-1.0 mg/L)로 처리한 경우에 정상 의 자엽을 갖는 배의 형성률은 농도에 비례하여 감소되었으며, 다자엽배의 형성률은 높게 나타났다. 또한 심장형, 어뢰형 및 자엽시기 등 배발생 단계별로 배에 ABA를 각각 상기와 같이 단기간 처리하거나 계속처리한 경우에도 다자엽배의 형성률은 높게 나타났다.

인 용 문 헌

- Akerson RC (1984) Abscisic acid and precocious germination in soybeans. *J Exp Bot* 35: 414-421
- Akerson RC (1984) Regulation of soybean embryogenesis by abscisic acid. *J Exp Bot* 35: 403-413
- Ammirato PV (1974) The effects of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway(*Carum carvi* L.). *Bot Gaz* 135: 328-337
- Ammirato PV (1977) Hormonal control of somatic embryo development from cultured cells of caraway. Interactions of abscisic acid, zeatin and gibberellic acid. *Plant Physiol* 59: 579-586
- Bray EA, Beachy RN (1985) Regulation and β -conglycin in proteins in cultured developing soybean cotyledons. *Plant Physiol* 79: 746-750
- Choi PS, Soh WY, Cho DY, Liu JR (1994) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in seedling explant cultures of melon (*Cucumis melo* L.). *Korean J Plant Tissue Culture* 21: 1-6
- Choinski JS, Jr, Trelease RN, Doman DC (1981) Control of enzyme activities in cotton cotyledons during maturation and germination. III. In vitro embryo development in the presence of abscisic acid. *Planta* 152: 428-435
- Hein MB, Brenner ML, Brun WA (1984) Concentrations of abscisic acid and indole-3-acetic acid in soybean seeds during development. *Plant Physiol* 76: 951-954
- Hochar V, Sotta B, Maldiney R, Miginiac E (1992) Changes in abscisic acid and its- β -D-glucopyranosyl ester levels during tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed development. *Plant Cell Reports* 10: 444-447
- Imamura J, Harada H (1980b) Effects of abscisic acid and water stress on the embryo and plantlet formation in anther cultures of *Nicotiana tabacum* cv. Samsun. *Z Pflanzenphysiol* 100: 285-289
- Kamada H, Harada H (1981) Changes in the endogenous levels and effects of abscisic acid during somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Plant Cell Physiol* 22: 1423-1429
- Kim YH, Kim HI, Chung TY, Harn C (1986) Induction of somatic embryos and germination of encapsulated embryos in celery. *Korean J Plant Tissue Culture* 13: 129-136
- Lee KS, Soh WY (1993) Somatic embryogenesis and structural aberrancy of embryos in tissue cultures of *Aralia cordata* Thunb. *Korean J Plant Tissue Culture* 20: 77-83
- Lee KS, Soh WY (1993) Effects of cytokinins on the number of cotyledons of somatic embryos from cultured cells of *Aralia cordata* Thunb. *Korean J Plant Tissue Culture* 20: 171-175
- Liu CM, Xu ZH, Chua NH (1993) Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell* 5: 621-630
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Nadel BL, Altman A, Ziv M (1990) Regulation of somatic embryogenesis in celery cell suspensions. 2. Early detection of embryogenic potential and the induction of synchronized cell cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 20: 119-124
- Nitsch JP, Nitsch C (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science* 163: 85-87
- Quatrano RS (1987) The role of hormone during seed development. In PJ Davies, ed, *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp 494-514
- Qureshi JA, Kartha KK, Suzanne R (1989) Modulation of embryogenesis in early and late-stage embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.) under the influence of (+)-abscisic acid and its analogs. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 18: 55-69
- Rajasekaran K, Hein MB, Vasil IK (1987) Endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid and somatic embryogenesis in cultured leaf explants of *Pennisetum purpureum* Schum. *Plant Physiol* 84: 47-51
- Soh WY, Yeo UD, So SS (1990) Artificial seed production and somatic embryogenesis from the cultured cells of *Cedrela sinensis* Juss. *Korean J Plant Tissue Culture* 17: 231-238
- Soh WY (1993) Developmental and structural diversity of regenerated plants in cell and tissue cultures. In Proc 7th Symposium on Plant Biotechnology, Molecular approach to plant cell differentiation, (July 9), pp 1-35
- Walker-Simmons M, Crane KE, Yao S (1989) Synthesis of acid-soluble, ABA-inducible proteins in wheat embryos from dormant grain. In RB Taylorson, ed, *Recent Advances in the Development and Germination of Seeds*, Plenum Press, New York, NATO ASI Series A, Life Sciences 187: 47-55
- Wareing PF, Phyllips IDJ (1981) *Growth and differentiation in plants*. 3rd ed, Pergamon, Oxford, pp 259-297