

강활(*Ostericum koreanum*)과 지리강활(*Angelica purpuraeifolia*)의 미숙종자로부터 고빈도의 체세포배 발생과 식물체 재분화

최은경* · 박학봉

전북대학교 농과대학 원예학과

High Frequency Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Cultured Immature Seeds of *Ostericum koreanum* Kitagawa and *Angelica purpuraeifolia* Chung

Eun Gyung CHOI and Hark Bong PARK

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

The objective of this study is to establish an efficient cell culture system for somatic embryogenesis in *Ostericum koreanum* and *Angelica purpuraeifolia*. The highest frequency of embryogenic callus on immature seeds of *O. koreanum* and *A. purpuraeifolia* was obtained when seeds were cultured on MS medium containing 0.1 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L BA. However, somatic embryos were formed directly from the edge of cotyledon and hypocotyl of plant which regenerated on medium supplemented with 0.1-3.0 mg/L NAA. Immature seed explants cultured at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ after 10 days treatment at 5°C produced embryogenic callus and somatic embryos, and these differentiated into whole plants. Addition of glutamine and coconut milk to media did not enhance the frequency of somatic embryogenesis in immature seed cultures of *A. purpuraeifolia*. However, in immature seed culture of *O. koreanum*, the frequency of somatic embryogenesis were increased on media supplemented with glutamine and 10% coconut milk. Especially, addition of glutamine to the medium substituted effect of NH_4NO_3 in constant to coconut milk. The highest frequency of conversion somatic embryos into plantlet was 89.1% on MS basal medium. Embryogenic calli were grown vigorously when maintained on medium with 0.01 mg/L 2,4-D and 0.01 mg/L BA.

Key words: coconut milk, cold treatment, glutamine

당근과 셀러리를 비롯한 산형과 식물은 體細胞胚 발생이 잘 되어 體細胞胚에 관한 生理, 生化學的인 연구의 주요 대상작물로서 이용되고 있으며 당근과 셀러리는 器內에서 人工種子가 생산되어 토양에 직접 播種한 바 있다 (Redenbaugh et al, 1991) 本 實驗에 공시재료인 강활과 지리강활은 산형과에 속하는 多年草로서 강활은 *Angelica koreana* Maxim로 命名되던 것이 1971년에 다시 *Ostericum koreanum* Kitagawa로 再命名되었으나 아직도 일부 같이 사용되고 있으며 지리강활(*Angelica purpuraeifolia* Chung)은 소백산과 지리산에 주로 분포하는 우리나라 特産植物로서 두 식물 모두 鎮痛, 解熱, 發汗, 貧血 등에 사용하는 藥用植物이다. 지금까지 강활에 관한 연구는 주로 成分의 分析과 藥

理 效果에 관한 연구가 대부분이었고 같은 *Angelica*屬內 참당귀(*Angelica gigas* Nakai)와 *Angelica acutiloba*에서 體細胞胚 發生이 보고되었다(Choi and Soh, 1993; Nakagawa et al., 1982). 당근이나 셀러리와 같이 안정된 體細胞胚 발생시 스템이 확보되고 器內에서 眞正種子보다 높은 發芽率과 植物體 轉換率이 유지된다면 대부분의 식물은 人工種子 생산이 가능해진다. 뿐만 아니라 강활과 지리강활은 우리나라 中部 山岳地帶에 자생하는 藥用植物이기 때문에 당근이나 셀러리보다 環境適應力이 뛰어나므로 體細胞胚 發生과 人工種子 生産에 관한 폭넓은 연구가 가능하리라고 생각된다. 本 實驗은 강활과 지리강활의 人工종자 생산을 위한 기초 연구로서 안정되고 再現性이 있는 고빈도 體細胞胚 발생시

스텝을 확보하기 위하여 體細胞胚 發生에 미치는 生長調節物質과 glutamine, coconut milk 影響을 알아보고 培養體로 사용한 未熟種子의 低溫處理에 의한 培養 效率 증가를 조사하였다.

재료 및 방법

공시재료 및 배지조성

배발생 캘러스와 체세포배 발생을 위하여 강활(*Ostericum koreanum* Kitagawa)과 지리강활(*Angelica purpurafolia* Chung)의 개화 3주된 미숙종자를 사용하였다. 개화 3주된 미숙종자를 70% 에칠알콜에서 7-10초간 표면을 살균하고 7% calcium hypochlorite(W/V) 수용액에서 10분간 침지소독한 다음 살균수로 3-4회 수세하여 소독액을 제거하였다. 무균 상태에서 종피를 제거하고 20×19 mm 크기의 시험관에 3개씩 10개 치상하였고 모든 실험은 3반복하였다. 배발생 캘러스와 체세포배 발생을 위한 배지 조성은 Murashige와 Skoog(1962) 기본배지에 0.1-3.0 mg/L 2,4-D나 NAA 단독처리와 0.1 또는 1.0 mg/L 2,4-D나 NAA에 0.1 또는 1.0 mg/L BA나 TDZ를 조합처리한 배지에 3% sucrose를 첨가한 후 pH는 5.8로 조정하고 0.8% 한천을 넣어 121°C의 고압증기 살균기에서 15분간 살균하여 사용하였다(Table 1). 다량의 체세포배를 얻기 위하여 NH₄NO₃ 1650 mg/L를 첨가한 MS 기본배지와 NH₄NO₃를 제거한 MS 기본배지에 생장조절물질로서 0.1 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BA를 혼용처리하거나 1.0 mg/L 2,4-D를 단독처리 하였다. Glutamine과 coconut milk의 NH₄NO₃의 대체효과를 알아보기 위해 Glutamine은 1500 mg/L와 500 mg/L를 처리하였고 coconut milk는 10%를 첨가하여 동일조건 하에서 배양하였다(Table 3).

배발생 캘러스 증식 및 식물체 발달을 위한 배지 조성

유도된 배발생 캘러스를 다량으로 증식한 후, 계속적으로 유지시키기 위하여 MS 기본배지에 0.01 mg/L 2,4-D 단독처리와 0.01 mg/L BA 혼용처리 또는 0.01 mg/L NAA와 0.05 mg/L BA처리와 0.1 mg/L NAA와 0.5 mg/L BA를 각각 혼용처리한 배지에 계대배양하여 배양 2주후와 4주후 캘러스 증식 정도와 색깔, 체세포배 발생률을 조사하였고 체세포배로부터 정상적인 줄기와 뿌리를 가진 식물체로 발달을 위하여 MS 기본배지와 0.2 mg/L NAA와 0.5 mg/L BA 혼용처리 그리고 0.2 mg/L NAA와 0.5 mg/L TDZ를 조합 첨가한 배지에 배양하여 줄기와 뿌리 발달 양상을 관찰하였다.

배양환경 및 조직학적 관찰

배양온도는 25 ± 2°C로 16시간 일장과 1,500 lx 형광등 조명하에서 배양하였으며 3개월간 25 ± 2°C에서 배양하였으나 반응이 없는 미숙종자를 5 ± 1°C 저온항온배양기에서 10일간 배양한 후, 25 ± 2°C에서 재배양하여 그 반응을 관찰하였다. 기내에서 얻어진 체세포배는 MS 기본배지에 계대배양하여 정상적인 식물체로 발달되었고 이 식물체는 pH가 5.0-7.0 Ball 상토가 든 57 × 57 mm 크기에 pot에 이식하여 관수시설이 되어진 하우스내에서 순화시켰다. 강활과 지리강활의 배발생 캘러스와 체세포배, 치상당시 진정종자의 발달상태를 알아보기 위하여 FAA에 고정하고 TBA로 탈수하여 조직편을 paraplant로 매몰시켰다. 이 조직편은 회전식 마이크로톰을 사용하여 8 μm 크기의 절편을 만들어 2% hematoxylin로 염색한 다음 영구프레파라트를 제작하여 현미경 하에서 관찰하였다.

결 과

生長調節劑의 影響

개화 3주된 강활과 지리강활의 未熟種자를 채취하여 여러 가지 생장조절물질이 첨가된 배지에 배양하였더니 培養 3주 후 未熟種子의 幼根이 발아되거나 연갈색의 유연한 캘러스를 발생하기 시작하였고 培養 4개월 후 캘러스 발생 및 줄기 분화를 관찰한 결과, 강활과 지리강활 모두 캘러스 발생은 2,4-D와 NAA 단독처리는 3.0 mg/L의 고농도보다 0.1 나 1.0 mg/L 처리가 양호하였고 BA나 TDZ와 혼용처리의 경우에는 2,4-D는 1.0 mg/L보다 0.1 mg/L과 혼용처리가 더욱 효과적이었으나 NAA는 0.1 mg/L보다 1.0 mg/L 혼용처리가 캘러스 發生이 양호하였다. 다른 처리구에 비해 0.1 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BA 혼용처리구에서 강활이 23.1%, 지리강활이 31.2%로 가장 높은 胚發生 캘러스 發生率을 나타내었다(Fig. 1-A, B). 캘러스는 未熟種子의 幼根이 나올 부위로부터 주로 발생하였는데 연갈색이며 스폰지처럼 많은 물기를 흡수한 非胚發生 캘러스와 연노란색이며 부서지기 쉬운 胚發生 캘러스가 관찰되었고 배양기간이 길어짐에 따라 非胚發生 캘러스 표면에 二次的으로 胚發生 캘러스를 형성하기도 하였다. 뿐만 아니라 培地와 접촉되어진 잎의 葉肉組織이나 幼根이 나올 부위, 子葉이나 胚軸부위와 같이 分裂이 왕성한 어린 조직으로부터 초기 心臟形이나 魚雷形의 體細胞胚가 직접 발생되기도 하였다(Fig. 1-C, D) 강활이나 지리강활의 種子 표면으로부터 발생되어진 胚發生 캘러스는 培養期間이 길어질수록 백색의 球形 體細胞胚는 心臟形, 魚雷形, 子葉期의 발달과정을 거쳐 정상적인 식물체로 발달되었다. 캘러스로부터 氣管分化양상을 관찰한 결과, 뿌리 분화는 줄기분화에 비하여 전처리구에서 매우 저조하였고 줄기와 뿌리 발달은 0.1 mg/L NAA 처리구에서 가장 양

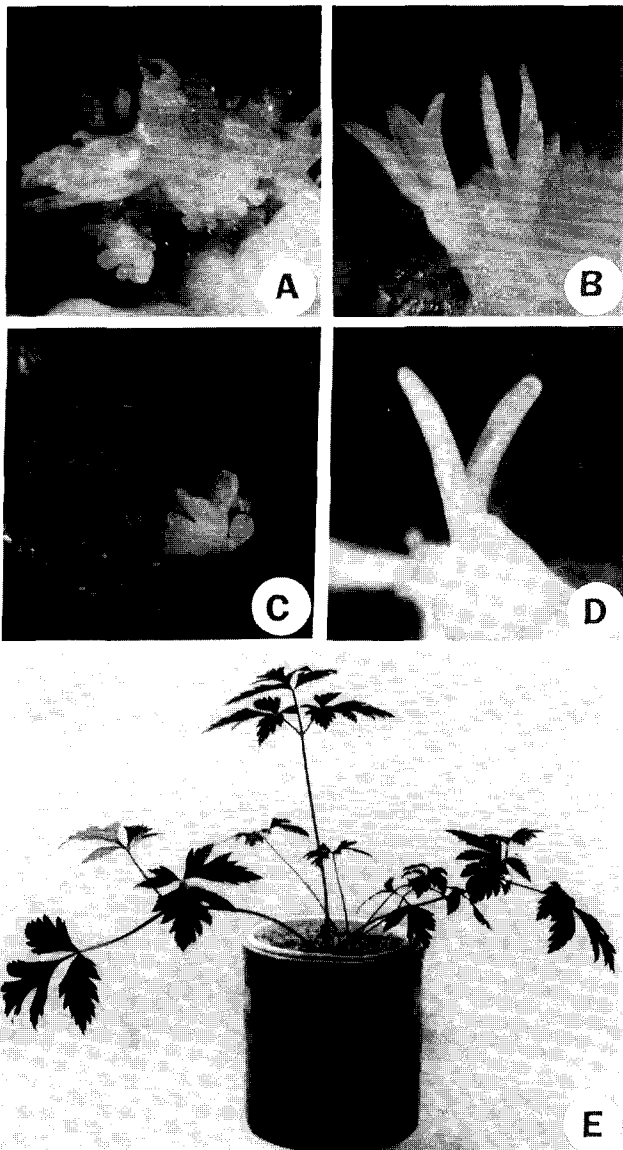


Figure 1. Somatic embryogenesis derived from immature seeds of *O. koreanum* and *A. purpuraefolia* on MS medium containing 0.1 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L BA. A, B: Somatic embryos derived from embryogenic callus *O. koreanum* and *A. purpuraefolia*, C, D: Direct somatic embryos derived from the radicle of immature seed *O. koreanum* and *A. purpuraefolia*, E: Plant converted from somatic embryos.

호하였으나 배지에 첨가된 TDZ는 캘러스나 줄기 발생은 BA처리구와 차이가 없었으나 뿌리 발생을 억제하였다. 體細胞胚 발생은 0.1 또는 1.0 mg/L NAA처리, 1.0 mg/L 2,4-D 처리 또는 0.1 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BA 혼용처리구에서 주로 관찰되었다. 그러나 NAA처리구에서는 胚發生 캘러스 발생없이 직접 體細胞胚가 발생되었고 2,4-D 단독처리구나 BA와 조합처리구에서는 다량의 胚發生 캘러스를 얻을 수 있어 액체배양에 의한 大量增殖에 더욱 효과적이었다(Table 1, 2).

Table 1. Effect of growth regulators on organogenesis and somatic embryogenesis from immature seeds of *O. koreanum*.

Growth regulators (mg/L)				No. of callus(%)		No. of shoots(%)		No. of embryos(%)	
2,4-D	NAA	BA	TDZ	25°C	5°C	25°C	5°C	25°C	5°C
0.1				20.0±6.1		19.6±2.7	30.3±5.8	16.3±1.9a	
1.0				35.5±10.7					
3.0				31.6±8.4		29.0±7.2			
	0.1			24.3±7.5		31.6±5.7	16.5±5.2		
	1.0			9.8±1.3		4.6±1.5			
	3.0			6.2±3.1	23.5±2.9	16.1±3.1		7.8±4.3	
0.1		0.1		58.0±9.6	36.4±8.0	58.4±4.7	22.2±1.2	23.1±4.9	9.6±1.8
1.0		0.5		14.6±4.7		16.9±1.3		19.0±1.3	
	0.1	0.1		7.9±3.3	34.0±11.4	4.2±1.1			
	1.0	0.5		23.3±4.5	13.7±2.9	2.7±2.7			
	0.1		0.1	27.3±7.3	54.3±3.0	28.0±6.2	3.28±3.0		18.1±3.1
	1.0		0.5						
0.1		0.1		23.6±5.3	25.0±4.2	18.5±4.5	2.72±2.3		
1.0		0.5		49.6±10.1		18.4±3.6	34.2±4.9		29.0±2.0

^aData represent the mean values (±S.E) of three replicates containing 30 explants each.

Table 2. Effect of growth regulators on organogenesis and somatic embryogenesis from immature seeds of *A. purpuraefolia*.

Growth regulators (mg/L)				No. of callus(%)		No. of shoots(%)		No. of embryos(%)	
2,4-D	NAA	BA	TDZ	25°C	5°C	25°C	5°C	25°C	5°C
0.1				7.6±1.5	22.5±4.0	27.4±7.1	16.0±2.7		17.7±2.6 ^a
1.0				24.2±1.5	44.6±3.7	14.6±2.7	16.5±2.3		
3.0				11.6±0.8	2.7±2.7				
	0.1			6.7±1.2	25.0±4.0	33.6±3.5		23.8±4.1	
	1.0				33.3±6.9	33.5±2.7	26.0±3.2	25.1±6.0	13.2±1.8
	3.0			18.1±1.1	15.2±1.7	10.0±2.5		12.5±2.5	
0.1		0.1		46.5±5.3	35.5±4.4	25.8±5.9	15.5±4.6	31.2±4.9	21.5±1.8
1.0		0.5							
	0.1	0.1		21.2±1.6		46.2±5.4	69.2±1.6		
	1.0	0.5		29.0±2.0	26.6±4.0	12.2±3.9	16.6±1.5		
	0.1		0.1		8.8±1.9			50.6±2.5	
	1.0		0.5	48.0±2.0	26.6±7.8	32.6±7.6	14.3±2.5		
0.1		0.1		21.0±1.5	8.2±2.1	35.0±8.1	24.6±4.3		
1.0		0.5		13.3±2.0		14.3±5.3			

^aData represent the mean values (±S.E) of three replicates containing 30 explants each.

溫도의 影響

培養 3개월 후 일부 반응이 없는 培養體를 種子의 休眠打破에 효과가 인정되는 5°C에서 10일간 低溫處理한 다음 25±2°C에서 다시 培養한 결과는 Table 1, 2와 같다. 대조구에서는 거의 반응이 없었으나 5°C에서 10일간 처리에 의하여 種子의 發芽, 캘러스, 器官分化率이 상당히 향상되었다. 低溫에 의한 촉진효과는 지리간황에서 보다 강황에서 확실하게 나타났고 生長調節物質에 따른 胚發生은 25°C 항온배양에서와 유사하였으나 培地內 2,4-D나 NAA와 TDZ의 혼용처리구에서 높은 體細胞胚 發生率을 보였다. 그러나 2,4-D

Table 3. Effect of glutamine and coconut milks on organogenesis and somatic embryogenesis from immature zygotic embryo of *O. koreanum* and *A. purpuraeifolia*.

Media and growth regulators (mg/L)	No. of callus		No. of shoots		No. of embryos	
	A	B	A	B	A	B
MS with NH ₄ NO ₃ 1650mg/L						
2,4-D(0.1)+BA(0.1)	38.6±1.9	32.6±6.7	30.1±2.6	16.2±0.2	9.3±0.7 ^a	16.2±2.6
2,4-D(1.0)		36.0±7.4		11.9±1.5		
Glutamine(500)						
2,4-D(0.1)+BA(0.1)	34.6±5.0	13.7±1.8	15.3±1.5	3.6±2.4	17.7±1.3	10.2±1.1
2,4-D(1.0)	18.0±1.7		35.6±7.2	18.7±1.0		
10% Coconut Milk						
2,4-D(0.1)+BA(0.1)	38.1±7.1	10.0±1.2		15.6±2.9	22.3±1.3	4.9±1.3
2,4-D(1.0)	13.1±1.5			4.3±2.4	12.4±1.4	
MS without NH ₄ NO ₃ 1650mg/L						
Glutamine(1500)						
2,4-D(0.1)+BA(0.1)	19.3±2.9	6.28±4.6	3.72±4.5	4.43±4.4	20.7±1.7	9.5±1.2
2,4-D(1.0)	18.7±3.1	17.2±1.6	35.5±5.8	27.0±1.7	16.6±2.0	8.6±2.7
10% Coconut Milk						
2,4-D(0.1)+BA(0.1)	18.6±2.3	11.0±1.3	25.3±3.6	8.6±2.0	10.5±0.9	
2,4-D(1.0)	12.3±1.2	16.4±2.7	10.0±1.1	10.0±2.3		

^aData represent the mean values (±S.E) of three replicaties containing 30 explants each:
A: *Ostericum koreanum*; B: *Angelica purpuraeifolia*.

0.1 mg/L와 TDZ 0.1 mg/L 혼용처리구나 NAA 1.0, mg/L와 TDZ 0.5 mg/L 혼용처리구에서 형성된 體細胞胚는 캘러스 발생없이 어린 식물체의 子葉이나 幼根부위 또는 種子로부터 직접 발생되어졌다. 따라서 다량의 體細胞胚를 얻기에는 부적합하였으며 2,4-D 0.1 mg/L와 BA 0.1 mg/L 혼용처리구에서 얻어진 胚發生 캘러스와 體細胞胚는 生長調節物質이 첨가되지 않은 기본배지에 繼代培養하여 배양 3주후 다량의 정상 식물체를 획득하였다(Fig 1-E).

Glutamine과 Coconut Milk의 效果

培養體로부터 胚發生 캘러스를 유기하는데 效果가 있는 培地內 암모늄태 질소와 아미노산중 glutamine 그리고 coconut milk의 效果를 알아보기 위하여 MS 기본배지로부터 NH₄NO₃을 완전히 제거하고 1500 mg/L glutamine과 10% coconut milk를 첨가한 구와 NH₄NO₃를 가진 MS 기본배지에 500 mg/L glutamine과 10% coconut milk를 첨가한 培地와 비교하여 보았다. 지리강활에서는 glutamine이나 coconut milk의 첨가에 의해 胚發生 캘러스의 발생이 촉진되거나 NH₄NO₃ 대체효과가 인정되지 않았다. 그러나 강활에서는 NH₄NO₃가 없는 기본배지에 10% coconut milk가 첨가된 구에서만 胚發生率이 10.5%로 대조구인 9.3%에 비해 약간 증가하였고 다른 培地내에서는 胚發生率이 상당히 증가되었으며 2,4-D 1.0 mg/L 처리구에서는 대조구는 胚가 발생하지 않았으나 1,500 mg/L glutamine과 10% coconut milk 첨가구

Table 4. Effect of various growth regulators on production and proliferation of embryogenic callus of *O. koreanum* and *A. purpuraeifolia*.

Growth regulators (mg/L)			Growth of callus		Formation of somatic embryos	Color of callus
2,4-D	NAA	BA	2weeks	4weeks		
0.01			a+	++	+	LY, LB
0.01		0.01	++	+++	-	LY, DY
	0.01	0.01	++	+++	+++	DY
	0.1	0.5	++	+++	++	DY

a-: non response; +: Poor; ++: Good; +++: Very good; LY: Light yellow; LB: Light brown; DY: Dark yellow.

Table 5. Effects of growth regulators on plant regeneration from somatic embryos of *O. koreanum* and *A. purpuraeifolia*.

Growth regulators (mg/L)			No. of explants	No. of shoots (%)	No. of roots (%)
NAA	BA	TDZ			
Control			28	89.1±1.7 ^a	89.1±1.9
0.2	0.5		25	68.6±1.2	70.6±2.1
0.2		1.0	25	60.5±0.8	0

^aData represent the mean values (±S.E) of three replicaties containing 30 explants each.

에서는 각각 16.6%, 12.4%의 胚發生率을 보였다. 강활의 未熟種子培養에서 1,500 mg/L glutamine는 胚發生을 유도하는데 중요한 役割을 하는 NH₄NO₃ 질소의 대체 效果와 胚發生 캘러스 및 體細胞胚 발생을 촉진 效果도 인정되었다. 또한 10% coconut milk는 암모늄태 질소의 대체효과를 인정되지 않았으나 胚發生率은 촉진시켰다(Table 3).

胚發生 캘러스의 增殖 및 식물체 再分化

초기 胚發生 캘러스는 그 표면이 단단하여 縣濁培養을 위한 캘러스로는 부적당하였으나 여러 차례 繼代培養에 의하여 유연하고 胚發生能이 높은 캘러스를 얻을 수 있었다. 胚發生 캘러스 增殖을 위하여 2,4-D, NAA, BA가 첨가된 고체배지에 배양하였더니 2,4-D단독이나 BA와 조합처리에서는 體細胞胚 발생없이 캘러스 增殖이 양호하였고 NAA와 BA를 조합처리한 培地는 胚發生 캘러스 增殖은 양호하였으나 體細胞胚로 발달이 많았다. 따라서 0.01 mg/L 2,4-D와 0.01 mg/L BA 혼용처리구에서 胚發生 캘러스 增殖이 가장 效果적 이었다(Table 4). 유연한 胚發生 캘러스는 액체배지에서 90 rpm으로 縣濁培養하고 7-10일 간격으로 100, 50, 40 stainless steel sieve를 사용하여 物理的으로 同質化하여 고체배지에서와 같은 균일한 여러단계의 體細胞胚를 다량으로 얻을 수 있었다. 획득한 體細胞胚의 식물체로 轉換率을 높이기 위해 기본배지와 NAA 0.2 mg/L와 BA 0.5 mg/L 혼용



Figure 2. Histological observation of zygotic seed and somatic embryos. A: Three-week-old zygotic seed had topedo-stage immature embryo, B: Mature seed had two cotyledons and shoot apex, C: Topedo-shape somatic embryos, D: Cotyledon-shape somatic embryo and secondary embryos.

처리, NAA 0.2 mg/L와 TDZ 0.5 mg/L 조합 처리구에培養하였던 결과(Table 5), 대조구와 NAA와 BA 조합처리구에서는 줄기와 뿌리 발생이 양호하였고 NAA와 TDZ 처리구에서는 줄기 分化는 왕성하였으나 뿌리 발생은 이루어지지 않았다. 정상적인 子葉과 뿌리를 가진 幼植物體는 Ball 床土에 利殖하여 噴霧裝置된 시설하우스의 반그늘상태에서 3주 馴化시켜 化분에 定植하였다.

組織學的 觀察

本 實驗에서는 지리강황과 강황의 개화 후 3週된 未熟種子를 사용하였는데 지리강황과 강황의 種子는 2개의 납작한 偏課가 서로 맞붙어 있었으며 胚와 胚乳를 가진 有胚種子로서 細胞質이 풍부하고 hematoxylin에 짙게 염색되는 核을 가진 작은 細胞들이 조밀하게 구성되어 있는 胚組織과 核이 뚜렷하지 않고 큰 細胞들이 엉성하게 배열되어 있으면서 hematoxylin에 연하게 염색되어진 胚乳組織으로 구분

되었고 種子에 있어서 胚의 위치는 胚乳의 중앙부위에 線形으로 배열되어 있었다. 受精에 의해서 자극을 받은 珠皮組織이 분화하여 細胞膜이 비후되거나 細胞膜의 물질이 변화하여 형성되는 種皮組織은 核이 없는 일정크기의 細胞들이 일정하게 배열되어진 網狀構造를 가지고 있었으며 종자가 성숙함에 따라 偏課의 양쪽 가장자리에 날개모양으로 배치 되었다. 개화후 3주된 未熟種子內 胚는 魚雷形의 未熟胚 상태였고 개화후 8주 이후에 채취한 성숙종자를 관찰한 결과, 發芽孔 부위에 幼根과 生長點, 그리고 짧은 胚軸과 2개의 子葉梢를 가진 成熟胚를 관찰할 수 있었다(Fig. 2-A, B).

2,4-D 0.1 mg/L와 BA 0.1 mg/L가 첨가된 培地에서 발생되어진 胚發生 캘러스와 體細胞胚는 胚發生 캘러스는 여러 개의 돌기를 가진 球形의 原胚가 혼재되어 있었으며 核과 細胞質이 진하게 염색되는 細胞들이 조밀하게 구성되어진 眞正種子의 胚組織과 유사하였다. 胚發生 캘러스로부터 體細胞胚의 발생은 주로 2-3층 表皮組織으로부터 유래되었고 球形胚로부터 胚柄이 신장되어진 心腸形과 魚雷形, 子葉期 體細胞胚로 배 발달이 이루어졌으며 魚雷形 體細胞胚에서는 뚜렷한 全形成層 조직이 관찰되었고 이 形成層 조직은 모조직과 연결되지 않고 단독으로 분화되어졌다. 子葉期の 體細胞胚는 2개의 葉原起와 幼根 잘 발달되어진 生長點을 가진 정상배로서(Fig. 2-C, D) 모조직과는 분리되어 있었으나 胚軸과 子葉의 表皮組織으로부터 二次胚 발생을 관찰할 수 있었다. 胚發生 캘러스를 0.01 mg/L 2,4-D가 첨가된 배지에서 계속적으로 배양하면 異常胚 발생율이 많은데 이와 같은 異常胚를 조직학적으로 보면 子葉에서 뿌리까지 全形成層組織은 정상적으로 발달되어 있으나 子葉이 1개로 되어 있고 幼根는 정상적으로 발달되어진 볼링핀形 體細胞胚로서 비정상적인 全形成層과 生長點組織의 미발달로 體細胞胚가 정상 식물체로 發芽하지 못하였다.

고 찰

본 실험에 사용한 未熟種子의 상태는 魚雷形단계의 未熟胚 상태였으며 未熟胚培養은 완두(Kysely and Jacobsen, 1990), papaya (Fitch and Manshardt, 1990), oak와 linden (Chalupa, 1990), *Abies nor dmanniana* LK.(Norgaard and Krogstrup, 1991) 등에서 보고되었다. 未熟種子로부터 胚發生은 未熟種子의 幼根이나 發芽孔 부위 또는 再分化된 植物體의 胚軸이나 子葉 등에서 관찰되었는데 papaya에서는 子葉마디와 幼根의 分裂組織(Fitch and Manshardt, 1990), 완두에서는 未熟種子의 胚軸組織과 幼根 頂端部位에서 體細胞胚가 發生되어 본 실험과 유사하였다. 그러나 인삼에서는 본 실험에서와 같은 魚雷形 단계의 接合子胚는 發芽하지도 胚를 發生하지도 않았고 성숙한 接合子를 培養하였을

때 배발생이 이루어졌으며 胚軸部位에 幼莖과 幼根에 頂端 分裂組織이 體細胞胚 發生을 억제시켜 본 실험과 다른 경향을 나타내었다(Choi, 1994). 그러나 Kysely와 Jacobsen (1990)은 조직학적인 관찰을 통해 배발생은 분열조직과 깊은 관련이 있음을 확인하였다.

體細胞胚 발생은 배양기간이 길어짐에 따라 繼代培養 없이 갈변된 非胚發生 캘러스로부터 二次的으로 誘導되었는데 이러한 경향은 매실(Park and Choi, 1992), 새머루(Park et al., 1993) 샬리리(Nadal et al., 1990)에서 이미 보고되었고 Choi와 Soh (1993)에 연구에 따르면 참당귀의 활발하게 증식하는 캘러스를 繼代培養하는 것보다 增殖이 정지된 캘러스를 生長調節物質이 없는 培地에 옮겼을때 體細胞胚의 發生率이나 정상적인 胚發生이 양호하였다고 하는 결과와 일치하였다. 그밖에도 繼代培養期間이 짧으면 胚發生能이 빨리 소실된다는 보고와(Michaux-ferriere and Carron, 1989) 장기간 培養으로 培地內 영양물질의 濃度가 감소됨으로 인해서 캘러스가 老化되기 때문이라는 보고도 있어 세포의 노화와 체세포배의 발생과 관련지어 생각할 수 있었다.

發芽가 되지않은 未熟種子에 5°C에서 10일간 低溫處理는 반응이 없는 未熟種子로부터 캘러스 發生과 植物體 再分화를 촉진시켰고 低溫處理하지 않고 25°C에서 계속培養한 것과 生長調節物質에 대한 반응에도 약간의 변화를 일으켰다. 未熟種子의 低溫處理 효과는 강활과 지리강활의 眞正種子 休眠打破時 低溫處理 효과가 眞正種子에 관한 실험에서 이미 인정되었으므로 培養前에 低溫處理는 培養效率을 높일 수 있으리라고 생각되어지며 강활의 未熟種子를 低溫處理한 후, 培養하였을때 0.1-1.0 mg/L 2,4-D와 0.1-1.0 mg/L TDZ 混用處理구에서 높은 體細胞胚 發生을 나타내었는데 培地에 첨가된 tidiazuron (N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea)은 최근 작약의 體細胞胚 發生 및 植物體 再분화에 효과가 있었고(Kim, 1992) 참외에서도 여러 가지 사이토키닌과 비교한 바, 5 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L TDZ 혼용처리구에서 치상체당 49%, 한 치상체당 3.3개 體細胞胚가 發生하여 가장 높은 胚 發生을 나타낸 바 있어 TDZ의 체세포배 발생 효과가 인정되었다.

培地內 질소원과 아미노산 첨가 효과를 검토해 본 바, 강활과 지리강활 모두 glutamine 1500 mg/L 첨가는 1650 mg/L NH₄NO₃를 완전히 제거한 培地에서 NH₄⁺대 질소의 대체효과가 인정되었으나 1650 mg/L NH₄NO₃와 500 mg/L glutamine를 같이 처리한 경우에는 對照區에 비해 胚發生이 감소되었다. 그러나 coconut milk 10%를 NH₄NO₃대신 처리했을때는 효과가 없었고 1650 mg/L NH₄NO₃와 10% coconut milk를 混用處理 하였을때는 胚發生 수를 증가시킨 결과를 가져 왔다. 이 결과는 Norway spruce와 목화에서 NH₄NO₃ 대신에 5 mM glutamine를 첨가하거나 혼용첨가하여 높은 빈도의 體細胞胚를 얻은 결과와 일치하며(Verhagen and Wann, 1989) Skokut 등(1985)이 알팔파에서 glutamine이

나 glycine처리시 對照區보다 胚發生이 저조하고 alanine과 proline 50 mM 處理區에서는 5-10배까지 體細胞胚 發生이 증가되었다고 하는 결과와는 차이를 나타냈다. Stuart와 Strickland(1984)는 여러 가지 아미노산이 첨가된 培地에서 형성된 體細胞胚의 크기와 植物體로 전환율을 조사한 결과, 胚의 크기는 arginine ≥ glutamine > alanine > proline > NH₄⁺순으로 증가되었고 이에 따른 植物體로 전환율은 glutamine > alanine ≥ arginine > proline > NH₄⁺ 순으로 높은 경향을 찾아내었다. 이 결과로 glutamine이나 alanine 처리로 질적으로 우수한 다량의 체세포를 얻을 수 있었다. 따라서 체세포배 발생은 배지내 첨가된 질소원과 아미노산 등의 함량에 의해 조절 가능하고 glutamine를 비롯한 L-glutamine과 L-proline, L-prolyl- L-alanine 混用處理에 의해 우수한 품질의 體細胞胚를 생산할 수 있으리라고 생각된다.

식물의 다양성때문에 처음 體細胞胚를 誘起하였을때 胚發生 캘러스와 非胚發生 캘러스를 육안으로 구분하는 것은 많은 어려움이 있다. Sohn와 Lee (1992)는 알팔파의 胚發生 캘러스의 생리적인 특성을 조사한 결과, 胚發生 캘러스는 DNA함량 증가되고 peroxidase의 活性 감소되며 새로운 isozyme생성, polyamine類中 cadaverine의 특이한 축적을 나타내었다고 하였다. 그밖에도 당근과 Asclepias에서 Wilson 등(1991)이 실시한 실험에 의하면 胚發生 캘러스와 非胚發生 캘러스의 差異는 胚發生 캘러스는 培地內 오옥신의 첨가 여부에 따라 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene(DPH)로 표지된 原形質膜의 유동성의 차이를 나타내고 非胚發生 캘러스는 차이가 없다고 하였다. 따라서 原形質膜의 유동성의 차이에 따라 胚發生 캘러스와 非胚發生 캘러스의 구분이 가능하고 특히 이 방법은 人工種자와 같이 大量生産을 목적하는 懸濁培養時 더욱 유용하리라고 생각된다.

유기된 체세포배로부터 植物體로 전환율은 生長調節物質이 없는 培地에서 87.2%로 가장 양호하였으나 인삼(Wang, 1990)에서는 0.5 mg/L IBA와 0.1 mg/L NAA 處理하였고 Mussaenda (1993)에서는 37 μM adenine sulphate를 Himalayan blue poppy에서는 10시간 동안 明狀態와 14시간 동안 暗狀態를 거친 후 體細胞胚로부터 식물체로 發芽되었다(Sulaiman et al., 1991).

본 실험에서 강활과 지리강활의 미숙종자 배양시 저온처리와 培地내 glutamine과 coconut milk를 첨가하므로써 體細胞胚 발생율을 높일 수 있었고 MS 기본배지에서도 식물체로 전환이 용이하여 인공종자 생산에 관한 기초 研究에 적절한 재료로 생각되었다.

적 요

本 實驗은 강활(*O. koreanum*)과 지리강활(*A. purpureaefolia*)의 體細胞胚 發生을 위한 효율적인 細胞培養시스템을 확립

하고자 실시하였다. 강활과 지리강활의 개화후 3주된 未熟種子는 0.1 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BA 혼용처리구에서 胚發生캘러스와 體細胞胚 發生이 가장 양호하였고, 0.1-3.0 mg/L NAA가 처리된 배지에서 再分化된 식물체의 子葉과 胚軸의 가장자리로부터 직접 體細胞胚가 발생하였다. 未熟種子의 休眠을 고려하여 低溫處理한 결과, 5°C에서 10일동안 貯藏 後, 25 ± 2°C에서 배양하였을때 반응이 없던 培養體로부터 胚發生 캘러스와 體細胞胚가 발생하였고 이 體細胞胚는 줄기와 뿌리로 분화되었다. 지리강활에서는 培地內 첨가한 glutamine과 coconut milk의 뚜렷한 효과가 인정되지 않았다. 그러나 강활의 경우에는 대조구에 비하여 glutamine과 10% coconut milk가 포함된 배지에서 體細胞胚 發生率이 향상되었고 특히 glutamine은 coconut milk에 비해 培地內 NH₄NO₃ 대체효과가 인정되었다. 體細胞胚의 器內 식물체 轉換率은 MS 기본배지에서 89.1%로 가장 양호하였고 胚發生 캘러스의 增殖用 培地로는 0.01 mg/L 2,4-D와 0.01 mg/L BA 혼용처리구에서 가장 좋았다.

인용문헌

- Chalupa V (1990) Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured immature embryos of oak (*Quercus robur* L.) and linen (*Tilia cordata* Mill.). Plant Cell Reports 9: 398-401
- Choi YE, Soh WY (1993) Effect of culture on somatic embryo formation from callus of *Angelica gigas* Nakai. Korean J Plant Tissue Culture 20: 199-204
- Das P, Rout GR, Das AB (1993) Somatic embryogenesis in callus culture of *Mussaenda erythrophylla* var Queen siritik and Rosea. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 35: 199-201
- Fitch MM, Manshardt RM (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). Plant Cell Reports 9: 320-324.
- Kysely W, Jacobsen HJ (1990) Somatic embryogenesis from pea embryos and shoot apices. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 20: 7-14
- Michaux-ferriere N, Carron MP (1989) Histology of early somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*: the importance of the timing of subculturing. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 19: 243-256
- Nadal BL, Altman A (1990) Regulation of somatic embryogenesis in celery cell suspension. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 20: 119-124
- Norgaard JV, Krogstru P (1991) Cytokinin induced somatic embryogenesis from immature embryos of *Abies nordmanniana* LK. Plant Cell Reports 9: 509-513
- Park HB, Choi EG (1992) Plant regeneration and somatic embryogenesis from immature embryo of japanese apricot (*Prunus mume* Sieb et Zucc). Korean J Plant Tissue Culture 19: 261-266
- Park HB, Choi EG, Park BM (1993) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature ovule of *Vitis flexuosa* Thunberg. Korean J Plant Tissue Culture 20: 109-112
- Redenbaugh K, Fujii JA, Slade D (1991) Synthetic seed technology: Vasil IK, Scale-up and automation in plant propagation, Vol 8. Academic press, San Diego, California. pp 35-74
- Shon JK, Lee GH (1992) Effect of sorbitol on somatic embryogenic callus and embryoid formation in callus culture of rice (*Oryza sativa* L.). Korean J Plant Tissue Culture 19: 179-184
- Skokut TA, Manchester J, Schaefer J (1985) Regeneration in alfalfa tissue culture. Plant Physiol 79: 579-583
- Stuart DA, Strickland SG (1984) Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L. I. The role of amino acid additions to the regeneration medium. Plant Science Letters 34: 165-174
- Sulaiman IM, Rangaswamy NS, Babu CR (1991) Formation of plantlets through somatic embryogeny in the Himalayan blue poppy, *Meconopsis simplicifolia* (Papaveraceae). Plant Cell Reports 9: 582-585
- Verhagen SA, Wann SR (1989) Norway spruce somatic embryogenesis: high-frequency initiation from light-cultured mature embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 16: 103-111
- Wang AS (1990) Callus induction and plant regeneration of American ginseng. HortScience 25: 571-572
- Wilson KJ, Stillwell W, Maxam T, Baldrige T (1991) Membrane fluidity changes in embryogenic and non-embryogenic cultures of *Aslepias* and *Daucus* in response to auxin removal. Physiologia Plantarum 82: 633-639

(1995년 10월 11일 접수)