

애기장대 줄기 조직배양에 있어서 식물생장조절제가 캘러스 형성과 기관분화에 미치는 영향

박정안, 박종범^{1*}

성균관대학교 유전공학과, ¹신라대학교 생명과학과

Effect of Plant Growth Regulators on Callus Initiation and Organogenesis from Tissue Culture of *Arabidopsis thaliana* Stem

Jung-An Park, Jong-Bum Park^{1*}

¹Dept. of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

Dept. of Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea

ABSTRACT This experiment was carried out to investigate the effects of plant growth regulators on the organogenesis from the tissue culture of *Arabidopsis thaliana* stem, and the origin of the callus development. When the stem segments were cultured on medium with 2 mg/L IAA or NAA, adventitious roots and trichomes were differentiated after 11 days of culture. Callus vigorously formed on medium with 2 mg/L 2,4-D after 7 days of culture, but adventitious roots and trichomes were not differentiated. On 2 mg/L picloram, callus formed after 5 days of culture and adventitious roots and trichomes were differentiated from callus after 10 days of culture. This results suggesting that picloram is very effective auxin for the callus formation and organogenesis. Callus weakly formed on 0.05 mg/L kinetin, and formed on combination of auxins (2 mg/L) with 0.05 mg/L kinetin. But the effect of combination of auxins and kinetin on the callus formation was less than 2,4-D or picloram alone. A histological examination of callus formed on picloram showed that phloem parenchyma cells were divided and enlarged after 2 days of culture. Cortex parenchyma cells were divided and meristematic nodules were developed from these cells after 4 days of culture. Finally, callus formed on outside of cortex and epidermis by division of meristematic nodules after 7 days of culture.

Key words: Adventitious root, auxin, kinetin, picloram, trichome

서 론

식물조직배양에서 주로 사용되어지는 생장조절물질에는 크게 auxin과 cytokinin으로 나눌 수 있는데, auxin은 세포신장에 관여하여 부정근, 정아, 배발생을 촉진시키고 cytokinin은 세포분열에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Crocomio et al. 1976; Peters et al. 1976). 보통 auxin과 cytokinin의 혼합조성비

에 의해 세포분열과 신장이 이루어지고 기관분화가 촉진되는데, auxin의 비율이 높을 때 부정근이 형성된다 (Peters et al. 1976; Cho and Soh 1981). 그러나 auxin 중 picloram은 단독사용만으로도 세포분열과 기관분화가 이루어져 캘러스로부터 직접 식물재생이 가능한 것으로 보고되어 있다 (Eisenger and Morre 1971; Collins et al. 1978).

Picloram은 1963년 Dow Chemical Company에 의해 Tordon이란 이름의 제초제로 처음 소개되어졌는데 (Eisenger and Morre 1971; Collins et al. 1978; Denchev and Conger 1995), 낮은 농도에서도 좋은 효과를 나타내어 상업적으로 유

*Corresponding author Tel 051-309-5472 Fax 051-309-5176
E-mail jbpark@silla.ac.kr

용하게 사용되어져 왔다 (Kefford and Caso 1966; Patton and Meinke 1998). Picloram은 다른 auxin에 비하여 조직배양에 뒤늦게 사용되어져 그 연구결과가 미흡하나 2,4-D와 그 기능이 흡사하고 용해성에서 오히려 2,4-D보다 높은 것으로 알려져 있고, 뜨거운 물에서 비교적 손쉽게 용해되어진다. Picloram은 2,4-D와 유사하게 캘러스 유도과 식물체 재생에 효과가 있는 것으로 보고되었다 (Denchev and Conger 1995; Furmanowa et al. 1997).

애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)는 북반구 온대에 걸쳐서 많이 분포하고 십자화과 장대나물속의 초본식물로서 전형적인 개화식물이면서 그 크기가 작아 좁은 공간의 실험실내에서나 멸균된 배양 배지에서도 배양이 가능하고, 한 식물로부터 10,000개 이상의 많은 종자를 생산하며, 고등식물 중 비교적 작은 genome 크기를 가지고 있다 (70 Mb/haploid nucleus). 또 6~8주의 짧은 생활사를 가지고 있어서 약 10여 년 전부터 식물학의 여러 분야에서 model plant로 광범위하게 이용되고 있다 (Shirley et al. 1992; Patton and Meinke 1998).

본 연구에서는 애기장대 생태형 'Columbia'의 줄기 절편 조직배양 시 picloram이 캘러스 형성과 기관분화에 미치는 영향을 조사하고, 조직배양결과 형성된 캘러스의 발생기원에 관하여 연구하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 배양

애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) 종자는 미국 Ohio State University의 Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC)에서 분양받아 본 실험재료로 사용하였다.

애기장대 종자를 피트모스와 질석, 펄라이트가 각각 1:1:1로 혼합된 인조 흙이 담긴 묘판에 파종한 후 랩을 씌워 2일 동안 4°C에서 저온 처리한 다음 생장조절상에 옮겨서 배양하였다. 생장조절상 내의 환경조건은 16시간의 명처리와 8시간의 암처리로 조절된 광주기하에서 온도는 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도는 50~80%로 유지되도록 조절하였다. 배양 약 2주 후면 싹이 나오는데 이때 랩을 제거하고 3~4일마다 계속 수분상태를 점검하여 적절한 습도가 유지되도록 수시로 영양액을 공급하였다.

캘러스 형성 및 기관분화 유도

생장조절상에서 45일 정도 배양된 애기장대의 줄기를 약 3 cm 길이로 절단하여 증류수로 세척한 다음 3% sodium hypochloride 용액으로 약 10분간 표면을 살균하고 멸균수로 5번 세척한 후, 배지가 들어있는 시험관에 넣어 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 암배양하여 캘러스 형성 및 기관분화를 유도시켰다. 캘러스 형성 및 기관분화를 위한 배지의 조성은 MS (Murashige and Skoog

1962) 기본배지에 sucrose (30 g/L)를 첨가하여 사용하였다. 식물 호르몬은 auxin으로 IAA, NAA, 2,4-D, picloram을 사용하였으며, cytokinin으로는 kinetin을 사용하였다. 배지의 pH는 5.7~5.8로 조절하였고 1% Difco-bacto agar를 첨가하여 녹인 뒤, 시험관에 분주하여 121°C 에서 20분간 고압 멸균하였다.

캘러스의 해부학적 관찰

애기장대 줄기 절편을 치상하여 매 1일 간격으로 줄기절편과 캘러스 조직을 formalin-acetic acid-alcohol (FAA) 고정액으로 48시간 실온에서 고정하였다. 고정이 끝난 재료는 알코올 상승농도 순으로 탈수하여 xylene으로 치환한 다음 LR white를 침투, 매물시켜서 65°C 에서 2일 동안 열중합반응시켜 block을 만들었다. 제조된 LR white block은 ultramicrotome과 유리 칼을 사용하여 2~3 μm 두께로 절단한 후 0.05% toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰하고 촬영하였다.

결과 및 고찰

애기장대 줄기 조직 절편을 여러 식물생장조절제가 들어있는 MS 배지에서 배양한 결과, cytokinin을 첨가하지 않고 여러 종류의 auxin (IAA, NAA, 2,4-D, picloram)만을 2 mg/L로 첨가한 배지에서는 각각 다른 결과가 나타났다. NAA만 첨가된 배지에서는 배양 11일 후 모용이 형성되었고, IAA만 첨가된 배지에서는 배양 11일 후 부정근이 발생하였다 (Table 1, Figure 1). 반면에 2,4-D만 첨가된 배지에서는 배양 7일 후 캘러스 형성이 왕성하게 나타났으나, 배양기간이 10일 이후 경과되어도 모용과 부정근 등 기관분화가 일어나지 않았으며, picloram만 첨가된 배지에서는 배양 5일 후부터 캘러스가 왕성하게 형성되다가 배양 10일 후에는 캘러스로부터 모용과 부정근이 발생되었다 (Table 1, Figure 1). 이러한 결과로 IAA와 NAA는 애기장대 줄기 조직배양에서 모용과 부정근 형성을 촉진시켜 기관분화에 효과적인 생장조절물질인 것을 알 수 있었으며, 2,4-D는 기관분화 없이 단순히 캘러스 형성만을 촉진시켜 캘러스 유도에 효과적인 것을 알 수 있었다. 그러나 picloram은 배양초기에는 캘러스가 왕성하게 형성되다가 일정기간이 경과한 후에는 캘러스로부터 모용과 부정근이 발생되어 캘러스 형성 및 기관분화에 매우 효과적인 생장조절제임을 알 수 있었다.

Auxin을 첨가하지 않고 cytokinin인 kinetin만을 0.05 mg/L 첨가한 배지에서는 캘러스 형성이 미약하게 나타났을 뿐만 아니라 모용과 부정근 등의 기관분화도 유도되지 않아 애기장대 줄기 조직배양시 배지에 auxin 없이 cytokinin 첨가만으로는 캘러스 형성 및 기관분화가 매우 어려운 것으로 나타났다 (Table 1, Figure 1). 한편 각각의 auxin (IAA, NAA, 2,4-D, Picloram; 2 mg/L)에 cytokinin (kinetin; 0.05 mg/L)을 혼합한

배지에서는 4개 모두 비슷한 캘러스 형성 정도를 나타내었으나, 2,4-D나 picloram만을 첨가한 배지에서의 캘러스 형성보다는 효과적이지 못한 것으로 나타났다 (Table 2).

Auxin과 cytokinin 같은 각각의 식물생장조절물질들은 조직배양시 식물체내에서 다양하게 작용하는 것으로 알려져 있다 (Dodds and Roberts 1995). 본 실험에서도 애기장대 줄기 절편을 auxin만 첨가한 배지와 cytokinin만 첨가한 배지 및 auxin

과 cytokinin을 혼합하여 첨가한 각 배지에서 배양한 결과, 조금씩 다른 결과를 나타내었다. 즉, cytokinin이 첨가되지 않고 NAA만 첨가한 배지에서 배양 11일 후 모용이 형성된 것은 Han 등(1999)의 실험결과와 일치하는 것으로 애기장대가 부정근 형성 농도와 캘러스 형성 농도 사이에서 모용이 발생하는 것은 부정근과 캘러스만 형성되는 일반적인 식물과는 다른 특성이라고 할 수 있다 (Gonzalez et al. 1991). 고등식물의 조직배양 결과 유도되는 기관분화와 관련한 분자생물학적 연구는 본격적으로 이루어지지 못하고 있으나 최근 애기장대 잎과 줄기에서 형성되는 모용 형성 유전자가 일부 밝혀져 있으며 (Marks and Feldmann 1989; Han et al 1999), 이러한 연구 결과는 앞으로 기관분화 유전자에 대한 연구에 이용할 수 있을 것이라고 생각된다.

애기장대 줄기 절편을 2,4-D만 첨가된 배지에서 조직배양하면 배양기간이 어느 정도 경과되어도 기관분화는 관찰되지 않고 캘러스 형성만이 두드러지게 나타났는데, 이것은 Kang 등 (1996)의 실험결과와도 일치하는 것으로 2,4-D는 다른 auxin에 비해 캘러스 유도에 매우 효과적임을 알 수 있었다 (Dodds and Roberts 1995). 한편, picloram만 첨가된 배지에서는 배양초기에 캘러스 형성이 왕성하게 일어나다가 일정기간 배양된 후에는 부정근과 모용이 발생되었는데, 조직배양식물의 기관분화는 식물조직 절편을 배양하는 배지 내 auxin과 cytokinin 조성비에 좌우되며, auxin의 비율이 높을 때 부정근이 형성된다는 보고 (Cho and Soh 1981; Cho 1985)와는 상반된 결과를 나타내었다. 그러나 본 실험결과는 배지에 첨가하는 식물생장조절제로 picloram의 단독사용만으로도 캘러스 유도와 기관분화가 이루어졌기 때문에 picloram만을 첨가한 배지를 사용하여 캘러스의 성장을 증가시켰으며, 캘러스로부터 직접 식물재생이 가능하다는 연구 보고와는 일치하는 것이다 (Collins et al. 1978; Furmanowa et al. 1997). 또, 기장속 식물의 1종인 *Panicum virgatum*의 종자를 BA와 2,4-D 및 picloram을 혼합한 MS 배지에서 배양하면 shoot 재생에서도 BA와의 혼합배지에서 2,4-D보다 picloram을 첨가한 배지가

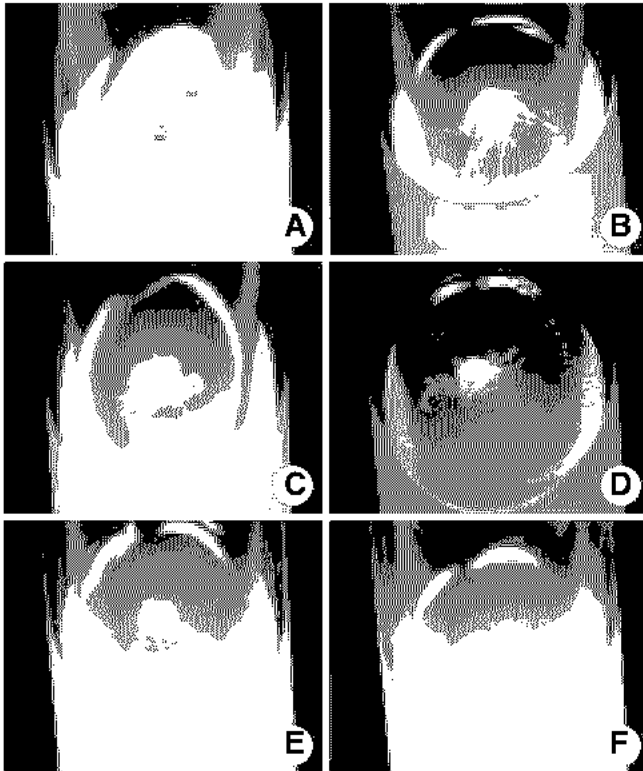


Figure 1. Morphological views of differentiation in *Arabidopsis* tissue cultures on auxin (IAA, NAA, 2,4-D, picloram) and cytokinin (kinetin). A, Stem segments used in tissue culture (control); B, Adventitious roots on the surface of callus in IAA (2 mg/L); C, Trichomes on the surface of callus in NAA (2 mg/L); D, Adventitious roots and trichomes on the surface of callus in picloram (2 mg/L); E, Calli formation in 2,4-D (2 mg/L); F, Calli formation in kinetin (0.05 mg/L).

Table 1. Effect of growth regulators on the formation of adventitious roots, trichomes and calli from the stem segments of *Arabidopsis thaliana* cultured on MS media after 3 weeks.

Growth Regulators	Days									
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
IAA (2 mg/L)	-	-	+	++	+++	+++ (R)	+++ (R)	+++ (R)	+++ (R)	+++ (R)
NAA (2 mg/L)	-	-	+	++	+++	+++ (T)	+++ (T)	+++ (T)	+++ (T)	+++ (T)
2,4-D (2 mg/L)	+	++	+++	+++ (C)	+++ (C)	+++ (C)	+++ (C)	+++ (C)	+++ (C)	+++ (C)
picloram (2 mg/L)	+	++	+++	+++ (C)	+++ (T)	+++ (T, R)	+++ (T, R)	+++ (T, R)	+++ (T, R)	+++ (T, R)
kinetin (0.05 mg/L)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

++++, excellent; +++, good; ++, moderate; +, rare; -, none
*C, calli; R, adventitious root; T, trichome

더 효과적이라는 연구보고와 일치하였다 (Denchev and Conger 1995).

이와 같은 결과로 미루어 애기장대 줄기 조직배양에서 배지에 첨가하는 식물생장조절제 중에서 auxin의 일종인 picloram의 단독 첨가만으로도 캘러스 형성 및 기관분화가 발생되었으며, 완전한 식물체로의 재분화가 가능할 것으로 생각된다. 애기장대 줄기 절편을 auxin과 kinetin을 혼합하여 첨가한 배지에서 조직배양한 결과 각 배지에서 비슷한 캘러스 형성정도를 나타내었으나 2,4-D나 picloram만을 첨가한 배지에서보다는 효과적이지 못한 것으로 나타났다. 그러나, 식물의 조직배양에서 절편체의 성숙시기 및 크기뿐만 아니라 (Han et al. 1999), auxin과 cytokinin의 조성비에 따라서도 캘러스 형성 및 기관분화에 차이가 있기 때문에 (Haissig 1988) 이 부분은 앞으로 좀 더 연구해야 할 과제이다.

Cytokinin의 첨가없이 picloram만을 첨가한 배지에서 애기

장대 줄기를 치상하여 매 1일 간격으로 줄기절편과 캘러스 조직을 조직해부학적 방법으로 절단하여 광학현미경으로 내부구조를 관찰한 결과, 배양 1일 후부터 조직절편이 부풀어오르기 시작하였고 2일 후부터는 사부 유조직세포의 세포분열이 일어나기 시작하여 4일 후에는 피층 유조직의 세포분열과 meristematic nodules이 형성된 것이 관찰되었다 (Figure 2). 배양 7일 후에는 세포분열이 피층과 표피 바깥부위로 매우 빠르게 확산되어 10일 후에는 왕성하게 캘러스를 형성하였다 (Figure 2). 캘러스는 보통 meristematic nodules의 형성으로 분열능력을 가지게 되는데 본 실험에서도 meristematic nodules의 형성으로 세포분열이 왕성하게 일어남을 관찰할 수 있었다. Meristematic nodules는 줄기 정단, 근원기 또는 배발생을 유도하는 근원이 된다고 보고되어 있다 (Nutti 1981; Anzidei et al. 1996).

Table 2. Effect of mixed growth regulators on the formation of callus from the stem segments of *Arabidopsis thaliana* cultured on MS media after 3 weeks.

Growth Regulators \ Days	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
IAA (2 mg/L)+ kinetin (0.05 mg/L)	-	+	+	+	++ (C)	++ (C)	+++ (C)	+++ (C)	+++ (C)	+++ (C)
NAA (2 mg/L)+ kinetin (0.05 mg/L)	-	+	+	+	++ (C)	++ (C)	+++ (C)	+++ (C)	+++ (C)	+++ (C)
2,4-D (2 mg/L)+ kinetin (0.05 mg/L)	-	+	+	+	++ (C)	++ (C)	+++ (C)	+++ (C)	+++ (C)	+++ (C)
picloram (2 mg/L)+ kinetin (0.05 mg/L)	-	+	+	+	++ (C)	++ (C)	+++ (C)	+++ (C)	+++ (C)	+++ (C)

+++ , excellent; ++ , good; + , moderate; - , none
*C, calli

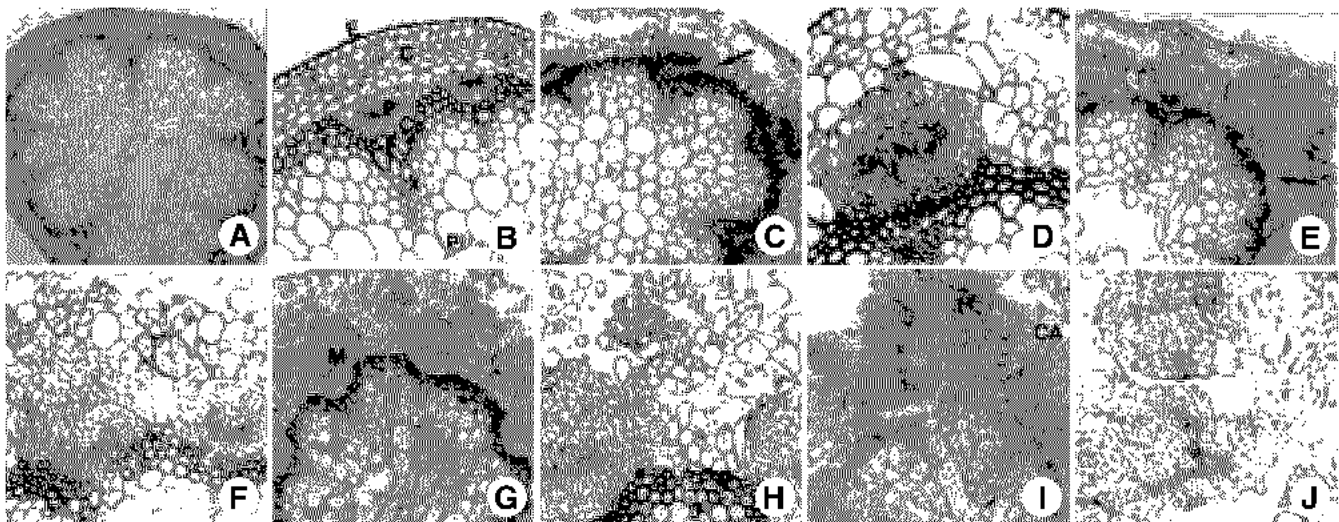


Figure 2. Transverse sections of cultured stem and callus in various developmental stages. A, After 1 day of culture ($\times 40$); B, Enlarged photograph of Fig. A ($\times 100$); C, Enlarged phloem parenchyma (arrow) after 3 days of culture ($\times 40$); D, Enlarged photograph of Fig. C ($\times 100$); E, Cell division of cortex and epidermis after 5 days of culture ($\times 40$); F, Enlarged photograph of Figure. E ($\times 100$); G, Formation of meristematic nodule (M) after 7 days of culture ($\times 40$); H, Enlarged photograph of Fig. G ($\times 100$); I, Callus (CA) formation by cell division of meristemoids after 10 days of culture ($\times 40$); J, Enlarged photograph of Fig. I ($\times 100$). C, cortex; Ca, cambium; E, epidermis; P, phloem; Pi, pith; X, xylem.

적 요

애기장대 생태종 'Columbia'의 줄기절편 조직배양시 캘러스 형성과 기관분화에 미치는 식물생장조절제의 영향과 캘러스 조직의 발생기원을 조사하였다. Cytokinin을 첨가하지 않은 auxin 단독배지 중에서 2 mg/L NAA 단독배지에서는 배양 11일 후 모용이 형성되었고, 2 mg/L IAA 단독배지에서는 배양 11일 후 부정근이 발생하였다. 2 mg/L 2,4-D 단독배지에서는 배양 7일 후 캘러스 형성이 왕성하게 나타났으나, 배양 11일 후에도 모용과 부정근은 분화되지 않았다. 2 mg/L picloram 단독배지에서는 배양 5일 후부터 캘러스가 형성되었으며, 배양 10일 후에는 캘러스로부터 모용과 부정근이 발생되어 picloram은 캘러스 형성 및 기관분화에 매우 효과적인 auxin임을 알 수 있었다. Auxin을 첨가하지 않은 kinetin (0.05 mg/L) 단독배지에서는 배양 8일 후부터 캘러스 형성이 매우 미약하게 나타났으며 각 auxin들과 kinetin을 혼합한 배지에서는 대부분 배양 9일 후부터 캘러스가 형성되었으나 2,4-D 배지나 picloram 단독배지에서의 캘러스 형성정도보다는 효과적이지 못하였다. Picloram 단독배지에서 형성된 캘러스 조직을 조직해부학적으로 관찰한 결과, 배양 2일 후 사부 유조직 세포의 세포분열이 일어나기 시작하였으며 배양 4일 후에는 피층 유조직의 세포분열과 이들 분열세포로부터 유래된 meristematic nodules 형성이 관찰되었으며, 배양 7일 후에는 meristematic nodules의 세포분열이 피층과 표피 바깥 부위로 매우 빠르게 확산되어 캘러스를 형성하였다.

인용문헌

Anzidei M, Vivona L, Schiff S, Bernici A (1996) *In vitro* culture of *Foeniculum vulgare* callus characteristics in relation to morphogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 45: 263-268
 Cho DY (1985) Distribution and quantitative determination of IAA by HPLC concerning adventitious root formation in *Azuki* epicotyl cuttings. *Kor J Plant Tiss Cult* 12: 79-87
 Cho DY, Soh WY (1981) Adventitious root formation from the hypocotyl of *Phaseolus vulgaris*. *Kor J Plant Tiss Cult* 8: 23-26
 Collins GB, Vian WE, Phillips GC (1978) Use of 4-amino-3,4,6-trichloropicolinic acid as an auxin source in plant tissue cultures. *Crop Science* 18: 286-288
 Crocorno OJ, Peter JE, Sharp WR (1976) Interactions of phytohormones on the control of growth and root morphogenesis in cultured *Phaseolus vulgaris* leaf explants. *Turrialba* 26: 232-236
 Denchev PD, Conger BV (1995) *In vitro* culture of switchgrass: Influence of 2,4-D and picloram in combination with benzylade-

nine on callus initiation and regeneration. *Plant Cell Tiss Org Cult* 40: 43-48
 Dodds JH, Roberts LW (1995) *Experiments in Plant Tissue Culture* 3rd Ed. pp. 3-91
 Eisenger WR, Morre DJ (1971) Growth regulating property of picloram, 4-amono-3,5,6-trichloropicolinic acid. *Can J Bot* 49: 889-897
 Fumanowa M, Glowniak K, Baranek KS, Zgorka G, Jozefczyk A (1997) Effect of picloram and methyl jasmonate on growth and taxane accumulation in callus culture of *Taxus x media var. Hatfieldii*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 49: 75-79
 Gonzalez A, Casares A. TR, Sanchez, Rodriguez R (1991) Adventitious root induction in *Corylus avellana* L. cotyledon slices. *In Vitro Cell Dev Biol* 27: 125-131
 Haissig BE (1988) Future directions in adventitious rooting research. *In* Davis, T.D., Haissig, B. E., Sankhla, N. eds. *Adventitious root formation in cutting*. *Advances in Plant Sciences Series*, 2. Portland, Oregon: Dioscorides Press; pp. 302-310
 Han TJ, Kim SL, Kim JC, Lim CJ, Jin CD (1999) Organ formation-the formation of adventitious roots, trichomes and calli from leaf segments of *Arabidopsis thaliana* by naphthaleneacetic acid concentrations, and the determination times. *Kor J Plant Tiss Cult* 26: 211-217
 Kang MK, Cho DY, Soh WY (1996) Effect of auxin on adventitious root formation on cotyledon derived microcalli in *Lactuca sativa* L. *Kor J Plant Tiss Cult* 23: 135-139
 Kefford NP, Caso OH (1966) A potent auxin with unique chemical structure - 4-amono-3,5,6-trichloropicolinic acid. *Bot Gaz* 127: 159-163
 Marks MD, Feldmann KA (1989) Trichome development in *Arabidopsis thaliana*. I. T-DNA tagging of the GLABOUS1 Gene. *Plant Cell* 1: 1043-1050
 Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
 Nuti Ronchi V (1981) Histological study of organogenesis in vitro from callus culture of two *Nicotiana* species. *Can J Bot* 59: 1969-1977
 Patton DA, Meinke DW (1998) High-frequency plant regeneration from cultured cotyledons of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 7: 233-237
 Peters JE, Crocorno OJ, Sharp WR (1976) Effects of caffeine and nicotine on the callus growth and root morphogenesis of *Phaseolus vulgaris* tissue cultures. *Turrialba* 86: 337-341
 Shirley BW, Hanley S, Goodman HM (1992) Effect of ionizing radiation on plant genome: Analysis of two *Arabidopsis* transparent testa mutation. *Plant Cell* 4: 333-347