

더덕의 체세포배발생에서 전형증분화와 자엽수의 관계

최필선^{1*}, 소웅영⁴, 조덕이², 유장렬³

¹남부대학교 생약자원학과, ²우석대학교 생물학과, ³한국생명공학연구원, ⁴대전보건대학

Relationship of Cotyledon Number with Procambium Differentiation in Somatic Embryogenesis of *Codonopsis lanceolata* L.

Pil Son Choi^{1*}, Woong Young Soh⁴, Duck Yee Cho², Jang Ryol Liu³

¹Department of Medicinal Plant Resources, Nambu University, Kwangju 506-824, Korea

²Department of Biology, Woosuck University, Jeonju 565-701, Korea

³Plant Cell Biotechnology Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Taejeon 305-606, Korea

⁴Daejeon Health College, Taejeon 300-711, Korea

ABSTRACT Embryogenic callus was obtained from cotyledonary explants of *Codonopsis lanceolata* on Murashige & Skoog's medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D. Suspension cultures of the embryogenic calli were grown on a shaker at 100 strokes/min, and then the calli were subcultured for 2 weeks in 2,4-D-free medium to produce somatic embryo. In somatic embryos at the globular stage, cotyledon initials began to differentiate themselves in the near distal end of the procambial strand. Dicotyledons, tricotyledon, tetracotyledon and fused cotyledon were differentiated from the distal ends of two, three, four and circular procambial strands, respectively. Nearly circular procambial strand in lower hypocotyls were independently differentiated into two, three, four procambial tissues at cotyledonary node and cotyledons to form somatic embryos with dicotyledon, tricotyledon, tetracotyledon. If the distal subepidermal cells of globular embryo exclusively became cotyledon initials, the torpedo or cotyledonary embryo was characterized by somatic embryos with fused cotyledon.

Key words: Dicotyledon, fused cotyledon, Ontogeny, somatic embryo, tetracotyledon, tricotyledon

서 론

식물조직배양계에서 발생하는 많은 체세포배는 구조와 기능면에서 종자속의 접합자배와 동일한 것으로 인정되어 왔으나 최근 기능상으로는 물론 구조적으로 변이가 있음이 밝혀졌다 (Ammirato 1987; Lee and Soh 1993a). 체세포배의 구조적변이는 자엽구조 및 수적변이가 대부분이며 그 원인은 배지에 첨가되는 탄수화물의 종류와 농도 (Kageyama et al. 1990; Soh et al. 2001), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (Choi et al. 1994), abscisic acid (Lee

and Soh 1993a), cytokinins (Lee and Soh 1993b), auxin (Liu et al. 1993) 등으로 알려져 있다. 특히 체세포배의 자엽변이는 식물체 전환율을 감소시키는 주요 원인이 되기 때문에 (Soh et al. 2001) 체세포배 배양을 통한 식물체 대량증식이나 형질전환체생산을 위해서는 체세포배의 초기 발생학적연구를 통해서 식물체전환 과정을 정확히 이해해야 할 것이다.

체세포배 발생과정에서 자엽의 기원은 하표피층의 자엽시원세포에서 비롯되어 (Bhojwani and Arumugam 1993) 구형배의 선단부에서 원형의 분열조직대를 이루고, 이로부터 1개, 2개, 3개 및 합생자엽 원기를 이루어 체세포 배로 성숙된다는 이론 (Ammirato 1987)과 전형성증의 분지가 상배측에서부터 시작된 후 자엽절에서 분지되어 각

*Corresponding author Tel 82-62-970-0161 Fax 82-62-970-0165
E-mail: cps6546@nambu.ac.kr

자엽으로 이어진다는 연구결과가 있다 (Lee 1993). 그러나 이러한 자엽초기발생에 대한 이론에서는 뚜렷한 발생학적 실험적 증거를 제시하지 않았기 때문에 식물조직배양 또는 세포배양 환경에서 발생하는 자엽의 수적변이, 즉 다자엽을 갖는 체세포에서 자엽의 초기발생은 구형배에서 심장형기로 전이될 때 자엽이 될 초기분열조직을 추적해야 할 것이며 (Nomura and Komamine 1985), 필수적으로 외형태학적 미세구조와 조직학적 관찰이 필요하다.

본 연구에서는 더덕 기내배양에 의해 발생하는 체세포배로부터 자엽의 기원을 추적하기 위하여 구형기로부터 2개, 3개, 4개 및 합생자엽을 갖는 체세포배의 자엽 초기 발생과정을 조직학적으로 관찰하여 자엽발생이 전형성층대의 분화과정과 밀접한 관계가 있음을 확인 하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

체세포배 유도

더덕 (*Codonopsis lanceolata* (S. et Z.) Trautv) 종자를 70% 알코올에 1분, 1% sodium hypochlorite 용액에 15분간 침적하여 표면살균후 멸균수로 3-5회 수세하였다. MS 기본배지 (Murashige and Skoog 1962)에 치상하여 4주후 얻은 유식물체의 자엽을 2 x 3 mm의 크기의 절편을 만들어 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS배지에 치상하여 배발생 캘러스를 얻었다. 액체배양은 agar를 첨가하지 않은 상기의 고체배지에 10% coconut water를 첨가시켜 만든배지에 배발생캘러스 약 1 g을 넣고 1분당 100번씩 회전하는 진탕배양기에서 배양하였다. 2주간격으로 계대배양을 하여 새롭게 형성된 배발생캘러스 세포군을 호르몬이 첨가되지 않은 배지에 옮겨 약 2주간 배양하여 체세포배를 얻었으며 이러한 체세포의 발생단계를 해부현미경하에서 선별한 후 자엽초기 발생에 대한 외부 형태 및 조직관찰을 위한 재료로 이용하였다.

외부형태 관찰

체세포배 발생과정의 자엽 형성시기에 있는 배의 미세구조를 주사 전자 현미경으로 관찰하기 위하여 초기 심장형기의 정상 체세포배와 비정상 자엽을 갖는 체세포배를 각각 취하여 2.5% glutaraldehyde 용액에 4℃하에서 4시간 고정 후 알코올 시리즈로 탈수 하였다. Critical point dryer로 2시간 이상 건조시켜 양면 테이프를 이용하여 Stab위에 재료를 고정시키고 부착된 시료에 silver pest를 바르고 이온증착기로 100 Å 정도 두께의 금 피박을 하여 주사 전자 현미경으로 관찰 하였다.

조직학적 관찰

체세포배 발생과정에서 자엽의 발생을 조직학적으로 관찰하기 위하여 구형기에서 초기 심장형기에 이르는 체세포배중 2개, 3개, 4개 및 합생자엽을 갖는 체세포배를 선별하였다. FAA에 24시간 이상 고정 시킨후 부탄올 시리즈로 탈수하여 파라플라스트에 포매 하였다. 회전식 마이크로톰으로 10 µm 두께의 절편을 만들어 헤마톡실린으로 염색한 후 광학 현미경하에서 각 절편을 연속관찰 하였다.

결과 및 고찰

배양 2주후부터 자엽절편의 상처부위로부터 캘러스가 유도되기 시작하였으며, 배양 4주째에는 노란색의 배발생캘러스가 얻어졌다. 배발생 캘러스를 액체배지에 옮겨 2주간격으로 6주동안 배양한 후 많은 배발생캘러스 세포괴를 증식하였다. 배발생캘러스를 MS기본 액체배지에 옮겨 2주동안 배양 하면서 구형기부터 초기 심장형기에 이르는 체세포배를 대량으로 얻었다. 해부현미경하에서 150 ~ 200 µm 크기의 초기 심장형기 체세포배를 선별하여 주사전자현미경으로 자엽 초기 발생과정을 관찰 한 결과 구형기 체세포배의 표면은 규칙적인 세포배열을 하고 있었으며, 전체적인 외부형태는 거의 구형에 가까웠다. 자엽발생은 구형기 체세포배의 배병반대쪽의 변화에 의하여 이루어졌으며, 2개 자엽은 구형기의 배병 반대쪽 선단부가 2 부분으로, 3개 자엽은 3부분으로, 4개의 자엽은 “+”자 형으로 나누어져 4부분으로 그리고 합생자엽은 중앙부위가 합입 되면서 원형을 이룬 가장자리가 동시에 신장 되면서 2개, 3개, 4개 및 합생자엽을 갖는 체세포배로 발달하였다 (Figure 1). 이와 같이 2개, 3개, 4개 및 합생자엽을 갖는 체세포배는 구형기에서 초기 심장형기로 발생할 때 구형기의 배병 반대쪽 선단부

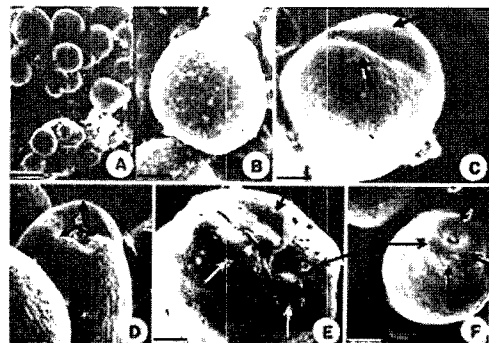


Figure 1. Developmental patterns of the cotyledons of somatic embryos at globular stage in *Codonopsis lanceolata*. A,B: Globular somatic embryos, C: Somatic embryo elongated two parts (arrows, bar = 50 µm), D: Somatic embryo elongated three parts (arrows, bar = 80 µm), E: Somatic embryo elongated four parts (arrows, bar = 70 µm), F: Somatic embryo elongated circular ring (arrows, bar = 80 µm).

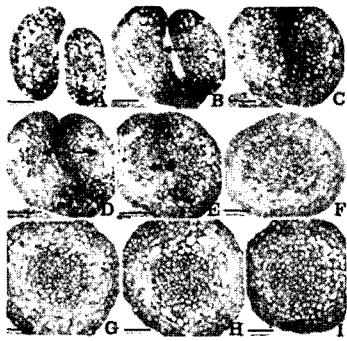


Figure 2. Transverse sections of early heart-shaped embryo with two cotyledons in cell cultures of *Codonopsis lanceolata* were made from radicle to cotyledons. Procambial tissues (G, H, I) in the radicle and lower hypocotyls are transformed into two procambial tissues (arrow, E, H), which are run into two cotyledons at cotyledonary node (C, D) and cotyledons (A, B). All bars = 70 μ m.

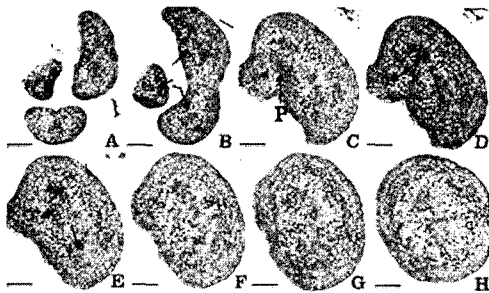


Figure 3. Transverse sections of somatic embryo with three cotyledons in cell cultures of *Codonopsis lanceolata*. Nearly circular procambial tissues (G, H) in lower hypocotyls were transformed into three procambial tissues (arrows, C, D, E, F), which were run into three cotyledons at cotyledonary node and cotyledons (A, B). P, plumule, All bars = 75 μ m.

에서 독립적으로 발생된 자엽모양의 원기가 점차 돌출되어 형성되는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 배 발생과정에서 구형배의 배병 반대쪽 표피 아래층에 있는 자엽 시원세포의 세포분열에 의해 자엽이 형성된다는 기재 결과와 일치되었다 (Bhojwani and Arumugam 1993). 반면 구형기 체세포배의 선단부에서 먼저 환상의 분열 조직대가 형성된 후, 2개의 자엽원기가 형성되면 2개의 자엽을 갖는 체세포배가, 3개의 자엽 원기가 형성되면 3개의 자엽을 갖는 체세포배가 그리고 분열조직대가 원통형으로 동시에 분열이 일어나면 합생자엽을 갖는 체세포배가 형성된다는 가설 (Ammirato 1987)과는 다른 견해를 보였다.

2개, 3개, 4개 및 합생자엽을 갖는 체세포배를 취하여 조직학적 관찰을 수행한 결과 2개의 자엽을 갖는 체세포배의 경우 각 자엽 상단부는 분열능이 왕성한 세포로 구성되어 있었으며, 자엽조직의 중앙부위에 작은세포로 배열된 전형성층대가 뚜렷이 관찰되었다 (Figure 2A, B). 자엽에서 자엽절 그리고 상배측 부위로 이동할수록 2개의 전형성층대

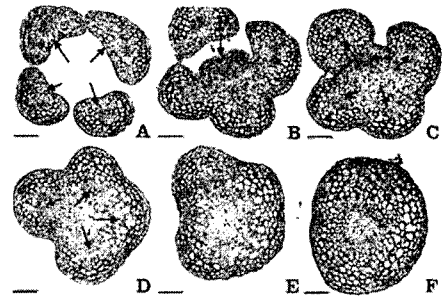


Figure 4. Transverse sections of somatic embryo with four cotyledons in cell cultures of *Codonopsis lanceolata*. Nearly circular procambial tissues (F) in lower hypocotyls were transformed into four procambial tissues (arrows, D, E), which were run into four cotyledons at cotyledonary node and cotyledons (A, B, C). P, plumule, All bars = 75 μ m.

는 점차적으로 가까워져 연결되었다 (Figure 2C, D, E). 배측에서는 전형성층대가 서로 합쳐져서 원통형을 형성하였고, 뿌리 발생부위까지 이어져 있었다 (Figure 2F, G, H, I). 이와 같이 뿌리와 배측기부에서는 전형성층대가 원통형으로, 상배측에서 자엽절까지는 2부분으로 분리되기 시작하여 자엽으로 연결되어 있었다. 3개의 자엽을 갖는 체세포배의 경우에도 자엽 상단부에는 분열능이 높은 세포로 구성되어 있었고, 이러한 자엽과 자엽절 조직 중앙에 독립적인 3개의 전형성층조직이 관찰되었다 (Figure 3A, B, C). 자엽절에서 배측부위로 이동하면서 3개의 전형성층 조직은 서로 융합되면서 원통형을 이루어 뿌리발생부위까지 이어졌다 (Figure 3D, E, F, G, H). 이와 같이 3개의 자엽을 갖는 체세포배의 경우에도 자엽과 자엽절부위에서부터 독립적인 3개의 전형성층조직으로 존재하다가 배측 기부와 뿌리로 이동되면서 원통형 또는 원주형으로 전형성층조직이 융합되는 것으로 관찰하였다. 4개의 자엽을 갖는 체세포배에서도 2개와 3개의 자엽을 갖는 체세포배와 마찬가지로 자엽과 자엽절 부위에서는 4개의 전형성층조직이 독립적으로 관찰되었으며, 배측과 뿌리부위에서는 원통형을 이루는 것으로 관찰되었다 (Figure 4). 합생자엽을 갖는 체세포배의 경우에는 뿌리발생부위부터 자엽에 이르기까지 원통형 또는 원주형의 전형성층 조직을 이루어 합생자엽을 형성하는 것으로 관찰되었다 (Figure 5). 체세포배에서 비정상적인 자엽발생은 배지에 첨가되는 식물호르몬과 탄소원의 농도에 의하여 발생되며 (Soh et al. 2001; Choi et al. 1994; Lee and Soh 1993a, b; Kageyama et al. 1990), 특히 구형기의 체세포배에서 옥신의 극성이동이 억제될 경우 비정상자엽을 갖는 배가 발생될 수 있고 (Liu et al. 1993; Scarpella et al. 2003), 이 현상은 심장형기 체세포배에서 전형성층조직의 분화패턴과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다 (Raghavan 2004). 본 연구에서도 체세포배의 자엽발생은 자엽절에서 전형성층조직의 분화형태와 밀접한 관계가 있었으며, 특히 하배측에서 원통형의 전형성층대가 자엽절 부위로 이동될수록 독립적으로 분화되어 자엽을 형성하고 있음을 알 수 있

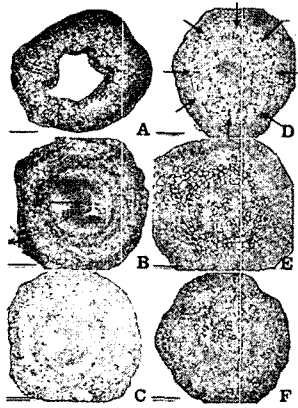


Figure 5. Transverse sections of somatic embryo with fused cotyledons in cell cultures of *Codonopsis lanceolata*. Circular procambial tissues (E, F) in lower hypocotyls were run into the cotyledon (A, B) through cotyledonary node (C, D) at which the plumule (P) appear (arrows, all bars = 75 μ m).

었다. 이러한 결과는 땅두릅의 체세포배발생에서도 전형성층의 분지가 상배측에서부터 시작하여 자엽절에서 분지되고, 나아가 자엽으로 각각 이어진다는 연구 결과 (Lee 1993)와 일치된다. 따라서 더덕 체세포배의 발생과정에서 자엽 초기발생은 구형배의 선단부에 존재하는 환상의 분열조직대로부터 1개, 2개, 3개 및 합생자엽 원기가 형성되어 각각의 체세포배로 발달하는 것이 아니라 (Ammirato 1987) 구형기 체세포배의 선단부로부터 직접 독립적인 자엽원기가 형성되어 심장형기로 분화되며, 이는 자엽절에서 분화되는 전형성층 조직의 분화와 상관관계가 있는 것으로 사료된다.

적 요

더덕 자엽절편을 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS기본배지에 배양하여 배발생캘러스를 얻었고, 호르몬이 첨가되지 않은 MS액체배지에서 구형기의 체세포배를 얻었다. 구형기에서 초기 심장형기로 발달할 때 자엽의 시원세포는 전형성층조직으로부터 분화되기 시작 하였으며, 하배측에서 관찰되는 원통형 전형성층대는 2개의 자엽을 형성할 경우 2개의 전형성층대가, 3개의 자엽은 3개의 전형성층대가, 4개의 자엽은 4개의 전형성층대가 각각 독립적으로 분화되어 자엽절과 자엽부위까지 연결되어 있었다. 만약 구형기 체세포배에서 자엽시원세포가 원통형으로 분화될 경우 합생자엽을 갖는 체세포배가 형성되었다.

사 사

본 연구는 바이오그린21사업단 (Biogreen21)과 작물유전체사업단 (Crop Functional Genomics)의 지원하에 수행되었다.

인용문헌

- Ammirato PV (1987) Organizational events during somatic embryogenesis. In: Green CE (ed), Plant Tissue and Cell Culture, Alan R Liss, New York, pp 57-81
- Bhojwani SS, Arumugam N (1993) In vitro propagation and conservation of some endangered medical species of India. In: Soh WY, Liu JR, Komamine A (eds), Advances in Developmental Biology and Biotechnology of Higher Plants, Kor Soc Plant Tiss Cult, Swon, pp 110-127
- Choi PS, Soh WY, Cho DY, Liu JR (1994) Somatic embryogenesis on cultures of Korean soybean (*Glycine max* L.) cultivars and effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Kor J Plant Tiss Cult 21: 7-13
- Kageyama K, Komatsuda T, Nakajima K (1990) Effects of sucrose concentration on morphology of somatic embryos from immature soybean cotyledons. Plant Tiss Cult Lett 7: 108-110
- Lee KS (1993) Structural diversity of cotyledons of somatic embryos from cultured cells in *Aralia cordata* Thumb. PhD thesis, Chonbuk Nat Univ, Jeonju
- Lee KS, Soh WY (1993a) Somatic embryogenesis and structural aberrancy of embryos in tissue cultures of *Aralia cordata* Thumb. Kor J Plant Tiss Cult 20: 77-84
- Lee KS, Soh WY (1993b) Effects of cytokinins on the number of cotyledons of somatic embryos from cultured cells of *Aralia cordata* Thumb. Kor J Plant Tiss Cult 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 bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15 : 473-497
- Nomura K, Komamine A (1985) Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. Plant Physiol 79: 988-991
- Raghavan V (2004) Role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of *Arabidopsis*: cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D. Amer J Bot 91: 1743-1756
- Scarpella E, Rueb S, Meijer AH (2003) The RADICLELESS1 gene is required for vascular pattern formation in rice. Dev 130: 645-658
- Soh WY, Choi PS, Cho DY, Liu JR (2001) Plant regeneration from somatic embryos with anomalous cotyledons formed in cell cultures of *Codonopsis lanceolata*. Phytomorphology Golden Jubilee Issue 327-336

(접수일자 2005년 5월 12일, 수리일자 2005년 6월 3일)