

더덕의 체세포발생과 자엽형태에 미치는 탄수화물과 삼투제의 영향

최필선

Effects of carbohydrates and osmoticum on the somatic embryogenesis and cotyledon morphology of *Codonopsis lanceolata* L.

Pil Son Choi

Received: 14 May 2020 / Revised: 1 June 2020 / Accepted: 1 June 2020
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Embryogenic calli from *Codonopsis lanceolata* L. were cultured in MS liquid media and supplemented with various concentrations of primary carbon sources to study the effects of carbohydrates and osmoticum on somatic embryogenesis and somatic embryo morphology. Sucrose, glucose, and a combination of 3% sucrose and various concentrations of sorbitol or mannitol as osmoticum were used as carbon supplements. The maximum number of somatic embryos per flask was greater in media exclusively supplemented with 3% sucrose (128.29) than exclusively glucose-supplemented media (47.67) and either supplement combination of 3% sucrose and osmoticum (95.67 with mannitol and 114.00 with sorbitol). The number of somatic embryos gradually decreased in media with increasing concentrations of combined osmoticum supplement. Decreases also occurred in the highest concentrations of sucrose- and glucose-supplemented media. The total frequency of somatic embryos with two cotyledons was slightly higher in medium with 3% + mannitol (24.09%) compared with exclusively sucrose (21.52%), glucose (21.22%), or 3% sucrose + sorbitol (22.13%). As concentrations of sucrose and glucose increased, the occurrence of two cotyledons and trumpet cotyledons gradually decreased and the occurrence of polycotyledon and globular stage embryos increased. Furthermore, as concentrations of 3% sucrose and osmoticum increased, the occurrence of trumpet cotyledon and globular

stage embryos increased and the occurrence of polycotyledon gradually decreased. These results demonstrated that the somatic embryogenesis and occurrence of cotyledon morphology were influenced by the concentration of carbohydrates and combinations of 3% sucrose and osmoticum supplements.

Keywords *Codonopsis lanceolata*, carbohydrates, osmoticum, somatic embryos, polycotyledon, trumpet cotyledon

서론

쌍자엽 식물들은 자연상태에서 암술과 수술의 수정과정을 통해 2개의 자엽을 갖는 전형적인 접합자 배를 형성하는 것으로 알려져 왔기 때문에 기내 배양을 통해서 형성된 체세포 배도 오랫동안 외부형태적으로 접합자배와 동일시 여겨 왔지만 실질적인 연구에서는 상당히 다른 것으로 보고되어 왔다(Ammirato 1983; Choi et al. 2011). 특히 자엽 형태가 트럼펫 모양인 비 정상적인 체세포배가 관찰된 후(Stuart et al. 1985; Merkle et al. 1995) Buchheim 등(1989)은 대두에서 체세포배를 자엽 수와 모양에 따라 9종류로 그리고 Isabelle 등(1993)은 포도에서 체세포배를 형태에 따라 8종류로 구분하여 기내배양 동안 다양한 체세포배의 변이가 발생 할 수 있음을 보고하였다. 일반적으로 이러한 다양한 형태의 비정상적인 체세포배들은 정상 체세포배에 비하여 식물체로의 재분화율이 낮기 때문에(Soh et al. 2001) 체세포배를 이용한 식물체 대량증식과 인공종자 개발과 같은 식물체 응용연구를 위해서는 정상 체세포배를 유도하기 위한 최적의 배양 조건 연구가 선행 되어야 한다.

기내배양에서 체세포배의 자엽 분화는 구형기 체세포배

P. S. Choi (✉)
남부대학교 한방제약개발학과
(Department of Oriental Pharmaceutical Development, Nambu University, Gangsangu, Chumdanjoongang-ro 23, 62271, Gwangju, Korea)
e-mail: cps6546@hanmail.net

에서 초기 심장형기로 발달할 때 자엽의 시원세포가 전형성 증세포로부터 분화하기 시작하여 유근부위와 하배축 부위까지 원통형 전형성증대로 분화된 후 2개의 자엽을 형성할 경우 2개의 전형성증대가, 3개의 자엽으로 발달할 경우 3개의 전형성증대가, 4개의 자엽이 발생될 경우 4개의 전형성증대가 자엽절과 자엽부위까지 각각 독립적으로 분화되고, 트럼펫 모양의 자엽이 형성될 경우 자엽부위까지 원통형으로 분화되는 것으로 보고되어(Choi et al. 2005; Choi and Kwon 2013a, b) 체세포배의 자엽 발생은 전형성증세포의 발달과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 배지에 싸이토키닌의 일종인 BAP와 zeatin이 첨가될 경우(Lee and Soh 1993b), 옥신의 일종인 2,4-D가 첨가될 경우 3개 이상의 자엽을 갖는 다자엽 체세포배 발생빈도가 증가되며(Lee and Soh 1993a; Lazzeri et al. 1987), 특히 대두에서 고농도 2,4-D 첨가 배지에서는 생장이 멈춘 구형기의 체세포배 발생빈도가 높은 것으로 알려져 있다(Choi et al. 1994). 또한 배지에 첨가되는 sucrose의 경우 저농도에서는 2개의 자엽을 갖는 체세포배 발생 빈도가 높지만 고농도에서는(6% 이상) 비정상적인 자엽을 갖는 체세포배의 빈도가 증가되는 등(Kageyama et al. 1990; Komatsuda 1992) 체세포배의 형태 발생에 있어 다양한 요인에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있어 이에 대한 체계적 연구의 필요성이 제기되고 있다.

따라서 본 연구에서는 기내 배양에서 필수적으로 첨가되는 탄소원에 대한 체세포배 발생과 체세포배의 자엽형태 발생에 대한 영향을 알아보기 위하여 에너지원으로서 sucrose와 glucose를 그리고 삼투제로서 mannitol과 sorbitol을 농도별로 처리하여 체세포배의 형성수와 자엽 변이에 대한 빈도를 조사 하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

배발생캘러스 유도

더덕(*Codonopsis lanceolata* L.) 종자를 70% 알코올에 1분, 그리고 1% sodium hypochlorite 용액에 15분간 침적하여 표면살균하고 멸균수로 3-5회 수세 하였다. 멸균된 종자로부터 발아를 유도하기 위하여 1 mg/L GA₃가 첨가된 MS기본배지(Murashige and Skoog 1962)에 페트리디쉬당 15~20개씩의 종자를 치상하였다. 배양 4주 후 종자로부터 발아한 유식물체(약 1.0~1.5 cm 크기)의 자엽으로부터 체세포배 발생능 캘러스를 유도하기 위하여 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS배지에 치상하여 캘러스를 얻을 수 있었고, 해부 현미경하에서 순수한 배발생능 캘러스를 선발한 후(Choi et al. 2005; Choi and Kwon 2013) 동일배지에 계대 배양하면서 증식하였다. 모든 배지는 0.8% Agar를 첨가하여 120°C, 1.2기압에서 15분 동안 멸균하기 전 pH 5.8로 조정하였고, 멸균 후 페트리디쉬

에 25 ml씩 분주하여 25°C, 암조건으로 수행 하였다.

배발생캘러스의 동조화배양 및 체세포배 유도

더덕 체세포배발생에 효과적인 것으로 알려진 배양조건, 즉 위에서 사용한 고체배지에 10% coconut water를 추가하여 제한(Min et al. 1992) 액체배지를 이용하여 배발생캘러스의 동조화 배양을 시도하였다. 100 ml 삼각 플라스크에 액체배지 20 ml씩 분주하였고, 여기에 배발생 캘러스 약 1g을 넣고 1분당 100 rpm으로 회전하는 진탕 배양기에서 암조건으로 배양 하였다. 2주 간격으로 계대 배양하면서 액체배양으로부터 새롭게 형성된 배발생캘러스 세포괴를 약 2달 이상 증식하였다. 배발생캘러스로부터 동일한 크기의 세포괴를 얻기 위하여 직경이 250 μm와 500 μm인 메쉬를 이용하여 2중으로 걸러낸 후 체세포배 유도를 위한 세포괴 현탁액을 처리구 당 5 ml씩을 분주하여 사용하였다. 배발생 세포괴로부터 체세포배 형성수와 체세포배의 자엽 형태를 조사하기 위하여 MS기본 액체배지에 탄소원으로서 sucrose와 glucose를 각각 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 6.0 및 9.0%로 단독 첨가하여 조사하였고, 삼투제에 대한 영향을 조사하기 위하여 3% sucrose와 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 6.0 및 9.0%의 sorbitol 또는 mannitol농도를 각각 조합처리 하여 2주 동안 배양 후 조사하였다. 체세포배의 자엽형태는 자엽의 수에 따라 2개, 3개 이상, 트럼펫으로 분류하여 조사하였으며, 배양 2주째까지 자엽이 단계로 발달하지 않고 구형기 상태로 남아 있는 체세포배는 생장이 지연된 구형기 체세포배로 판단하였다. 모든 실험은 3회 반복하였다.

결과 및 고찰

체세포배형성에 미치는 탄소원의 영향

배양 2주 후 자엽절편의 상처부위로부터 캘러스가 형성되기 시작하였으며, 배양 4주째에는 캘러스 표면에 노란색의 단단한 돌기 모양의 캘러스가 새롭게 형성 되었다. 이러한 노란색의 단단한 돌기 모양의 캘러스는 2,4-D가 첨가되지 않은 MS기본배지에서 체세포배를 형성하였기에 체세포배 발생능 캘러스로 선발할 수 있었다. 노란색의 배발생능 캘러스를 해부현미경하에서 선발한 후 동일 고체배지에서 4주 간격으로 계대배양하면서 대량 증식하였다. 10% coconut water가 첨가된 액체배지에서 동조화된 배발생캘러스 세포괴가 증식되었으며, 그러한 배발생캘러스 세포괴는 호르몬이 첨가되지 않은 액체배지에서 배양 1 주째에 체세포배가 형성 되었다(데이터 미제시). 이러한 액체배양시스템을 이용하여 체세포배발생에 대한 탄소원의 영향을 조사한 결과 sucrose의 경우 3% sucrose를 첨가 하였을 때 플라스크당 약 128.29개가 형성되어 가장 많은 체세포배가 형성되었으며,

Table 1 Total number of somatic embryos formed from liquid media supplemented with exclusively carbohydrates and with the combination of osmoticum with 3% sucrose in suspended cell cultures of *Codonopsis lanceolata* L. Each value represents the mean ± standard error of at least three replicates

Percentage (%)	Total number of somatic embryos / flask			
	Sucrose	Glucose	Mannitol + 3% sucrose	Sorbitol + 3% sucrose
0.5	50.00 ± 3.15	-	95.67 ± 3.67	114.00 ± 4.75
1.0	46.86 ± 2.61	-	83.33 ± 4.89	102.67 ± 6.51
2.0	69.86 ± 3.63	8.33 ± 1.33	72.00 ± 3.99	95.33 ± 5.77
3.0	128.29 ± 10.25	43.00 ± 2.51	37.33 ± 2.87	72.33 ± 4.19
6.0	86.14 ± 5.51	47.67 ± 4.89	-	13.33 ± 3.12
9.0	26.14 ± 3.15	35.00 ± 3.12	-	-

0.5%에서는 50개, 1.0%에서는 46.86개, 2.0%에서는 69.86개, 6.0%에서는 86.14개, 9.0%에서는 26.14개가 형성되어 3%농도에서 최대치를 보였고, 이하 또는 높은 농도에서는 점차 감소하는 것으로 나타났다. Glucose의 경우 2.0%에서 8.33개, 3%에서 43개, 6%에서 47.67개 그리고 9%에서 35.0개가 형성되어 6%에서 최대치를 보였다. 반면 0.5%와 1.0%에서는 체세포배가 형성되지 않았다. 3.0% sucrose와 여러 농도의 삼투제를 조합처리 하였을 경우 mannitol의 경우 0.5%에서 95.67개, 1.0%에서 83.33개, 2.0%에서 72개, 3.0%에서 37.33개가 형성되어 농도가 높아질수록 체세포배 형성 수는 점차 감소하는 경향을 보였으며, 6.0%이상의 농도에서는 체세포배는 형성되지 않았다. Sorbitol의 경우 0.5%에서 114개, 1.0%에서 102.67개, 2.0%에서 95.33개, 3.0%에서 72.33개, 6.0%에서 13.33개가 각각 형성되어 sorbitol 농도가 증가할수록 체세포배 형성이 감소하였으며, 9.0%에서는 형성되지 않았다 (Table 1). 이와 같이 더덕에서 체세포배 발생은 단당류인 glucose보다는 sucrose가 효과적인 것으로 나타났으며, sucrose의 경우 3%농도에서 그리고 glucose의 경우 6%에서 가장 효과적인 것으로, 그리고 3% sucrose에 삼투제인 sorbitol과 mannitol이 농도별로 처리 되었을 때 모든 처리구에서 억제 현상을 보였고, 특히 농도가 증가할수록 억제효과가 증가되는 것으로 나타났다.

대두의 체세포배 발생에서 glucose보다는 sucrose가 더 효과적인 것으로 알려져 있고, 특히 3% sucrose와 1.5% glucose에서 체세포배 형성율이 가장 높았고, 그 이상의 농도에서는 오히려 감소하는 것으로 (Lazzeri et al. 1987) 그리고 코코넛의 체세포배발생에서는 4% sucrose를 첨가한 배지에서 가장 효과적인 것으로 알려져 있다(Ashburner et al. 1993). 또한 해바라기의 경우 체세포배 발생은 일반적인 농도로 알려진 3% sucrose보다는 12% sucrose가 가장 효과적인 것으로(Finer 1987) 그리고 옥수수의 경우 다른 탄수화물에 비하여 sorbitol이 가장 효과적인 것으로 알려져 있다(Swedlund and locy 1993). 따라서 기 연구와 본 연구에서 보여 주듯이 체세포배 발생은 식물의 종에 따라 적정하게 요구되는 탄소원과 삼투제의 농도와 종류가 달라질 수 있음을 보여주고 있으며, 특

히 본 연구에서는 3% sucrose와 삼투제를 조합한 처리하였을 때 체세포배 형성이 감소되는 것은 sorbitol과 mannitol의 높은 삼투효과(Brown et al. 1989)에 의해 억제된 것으로 판단된다.

자엽 형태에 미치는 탄소원과 삼투제의 영향

탄소원으로 sucrose 또는 glucose를 그리고 3% sucrose와 sorbitol 또는 mannitol을 각각 조합처리하여 형성된 체세포배의 형태를 분석한 결과 2개의 정상적인 자엽을 갖는 체세포배와 3개 이상의 자엽을 갖는 다자엽 체세포배, 융합된 트럼펫 모양의 자엽을 갖는 체세포배 그리고 구형기에서 생장이 지연되는 체세포배 등 비정상 형태의 자엽을 갖는 체세포배를 관찰할 수 있었고, 각 체세포배의 발생빈도가 다를 수 있었다(Table 2). 탄수화물과 삼투제 종류와 각 처리농도에서 2개의 자엽을 갖는 체세포배 발생빈도(21.22%~24.09%)에 비하여 비정상자엽을 갖는 체세포배(다자엽, 트럼펫, 생장이 지연된 구형기 등)의 빈도(75.91% - 78.79%)가 높은 것으로 나타났다. Sucrose의 경우 2개의 자엽을 갖는 체세포배는 21.52%를 차지하였으며, 나머지 78.49%는 비정상 체세포배로 관찰되었다. 2개의 자엽을 갖는 체세포배는 1.0%에서 35.29%로 가장 높았고, 0.5%에서 32.25%, 2.0%에서 21.77%, 9.0%에서 10.16% 순으로 관찰되어 농도가 증가할수록 발생빈도가 뚜렷하게 감소하였다. 반면 트럼펫 모양의 체세포배는 0.5%에서 45.71%로 가장 높았고, 농도가 증가할수록 발생빈도는 감소하였다. 3개 이상의 자엽을 갖는 다자엽체세포배는 9.0%에서 53.02%로 가장 높았고, sucrose 농도가 감소할수록 발생빈도가 감소되어 트럼펫과 다자엽 체세포배의 발생빈도가 뚜렷하게 반대현상을 보였다. 생장이 지연된 구형기 체세포배는 sucrose농도가 증가할수록 증가하는 현상을 보여 다자엽 체세포배와 유사하였다(Table 2). Glucose의 경우 2개의 자엽을 갖는 체세포배는 21.22%로 그리고 비정상 자엽을 갖는 체세포배 빈도는 78.79%로 관찰되어 sucrose와 같이 비정상 체세포배의 발생빈도가 높게 나타났다. 2개의 자엽을 갖는 체세포배는 3.0%에서 26.28%로

Table 2 Effects of carbohydrates and osmoticum on the cotyledon morphology of somatic embryos formed from suspended cultures of *Codonopsis lanceolata* L. Each value represents the mean \pm standard error of at least three replicates

Percentage	Cotyledon morphology of somatic embryos (%)				
	Two	Trumpet-shaped	Polycotyledon (three or four)	Globular, etc. (growth delayed)	
Sucrose	0.5	32.25 \pm 2.18	45.71 \pm 3.14	16.86 \pm 2.89	5.18 \pm 2.16
	1.0	35.29 \pm 4.66	40.64 \pm 2.96	17.36 \pm 3.91	6.71 \pm 3.10
	2.0	21.77 \pm 3.54	33.18 \pm 5.18	38.07 \pm 5.21	6.98 \pm 2.83
	3.0	16.44 \pm 3.19	34.14 \pm 2.67	40.03 \pm 4.13	9.39 \pm 2.19
	6.0	13.19 \pm 2.73	26.95 \pm 2.18	48.44 \pm 5.19	11.42 \pm 2.90
	9.0	10.16 \pm 3.88	26.71 \pm 3.82	53.02 \pm 3.66	10.11 \pm 1.20
	Treatment average	21.52	34.56	35.63	8.30
Glucose	0.5 - 1.0	-	-	-	-
	2.0	23.22 \pm 2.25	32.44 \pm 2.08	39.06 \pm 3.04	5.28 \pm 0.21
	3.0	26.28 \pm 3.91	21.19 \pm 4.19	44.65 \pm 2.01	7.88 \pm 1.89
	6.0	18.18 \pm 1.19	23.70 \pm 2.66	47.91 \pm 3.02	10.21 \pm 2.19
	9.0	17.18 \pm 0.69	25.24 \pm 2.01	47.48 \pm 3.51	10.10 \pm 1.90
	Total	21.22	25.64	44.78	8.37
Mannitol + 3% sucrose	0.5	25.99 \pm 3.14	23.83 \pm 3.61	46.89 \pm 4.91	3.29 \pm 0.91
	1.0	25.73 \pm 2.02	23.81 \pm 3.01	44.79 \pm 4.37	5.67 \pm 1.54
	2.0	23.45 \pm 4.28	25.54 \pm 2.05	45.72 \pm 6.29	5.29 \pm 1.12
	3.0	21.19 \pm 5.88	37.90 \pm 3.72	33.04 \pm 6.83	7.87 \pm 0.81
	6.0 - 9.0	-	-	-	-
	Treatment average	24.09	27.77	42.61	5.53
Sorbitol + 3% sucrose	0.5	25.09 \pm 4.67	22.87 \pm 7.85	47.61 \pm 5.71	4.43 \pm 1.61
	1.0	23.88 \pm 3.67	25.96 \pm 6.19	44.17 \pm 3.02	5.99 \pm 0.99
	2.0	22.60 \pm 2.78	33.73 \pm 2.99	38.22 \pm 3.17	5.45 \pm 2.81
	3.0	22.88 \pm 3.70	32.87 \pm 5.10	36.06 \pm 5.16	8.19 \pm 1.48
	6.0	16.19 \pm 2.06	37.95 \pm 4.40	35.20 \pm 3.81	10.66 \pm 2.06
	9.0	-	-	-	-
Treatment average	22.13	30.68	40.25	6.94	

가장 높은 발생빈도를 보였으며, 6.0%에서 18.18%, 9.0%에서 17.18%로 점차 감소하였다. 반면 트럼펫을 갖는 비정상 체세포배는 2.0%에서 32.44%로 가장 높았으며, 3.0%에서 21.19%, 6.0%에서 23.70%, 9.0%에서 25.24%로 농도가 증가할수록 약간씩 증가하였다. 3개 이상의 다자엽을 갖는 체세포배는 9.0%에서 47.48%로 가장 높은 발생빈도를 보였으며, 농도가 감소할수록 그 발생빈도도 약간씩 감소하였다. 생장이 지연된 구형기 체세포배의 경우에 농도가 증가할수록 발생빈도도 증가하는 것으로 관찰되어 다자엽 체세포배와 유사한 경향을 보였다(Table 2). 삼투제인 mannitol을 3% sucrose

와 농도별로 조합처리 하였을 때 2개의 자엽을 갖는 체세포배 발생빈도는 24.09%로 sucrose (21.52%)나 glucose (21.22%) 단독 또는 3% sucrose + sorbitol 조합처리(22.13%)보다 2개의 자엽을 갖는 정상 체세포배의 비율이 약간 증가된 것으로 관찰되었고, 나머지 75.91%가 비정상 체세포배로 관찰되었다. 2개의 자엽을 갖는 체세포배는 0.5%에서 25.99%, 1.0%에서 25.73%, 2.0%에서 23.45%, 3.0%에서 21.19%로 관찰되어 농도에 따른 큰 차이는 없었다. 그러나 트럼펫의 체세포배는 3.0%에서 37.90%로 가장 높은 발생빈도를 보였으며, 농도가 낮아질수록 그 발생빈도가 감소하는 경향을 보였고, 반대로

3개 이상을 갖는 다자엽 체세포배의 경우 0.5%에서 46.89%의 발생빈도를 보였고, 농도가 증가할수록 감소되어 sucrose 또는 glucose처리의 증가현상과 반대현상이 뚜렷하였다. 생장이 지연된 구형기 체세포배비율은 농도가 증가할수록 3.29%에서 7.87%로 약간씩 증가하는 경향을 보였다(Table 2). Sorbitol을 3% sucrose와 농도별로 조합처리 하였을 때 2개의 자엽을 갖는 정상 체세포배 비율이 22.13%, 비정상 체세포배는 77.87%로 관찰되었다. 2개의 자엽을 갖는 체세포배는 0.5%농도에서 25.09%로 가장 높았으며, 농도가 증가할수록 그 발생빈도는 감소하였다. 트럼펫의 체세포배는 6.0%에서 37.95%로 가장 높은 발생빈도를 보였고, 농도가 감소할수록 그 발생빈도가 감소하여 mannitol과 유사한 경향을 보였다. 또한 3개 이상의 자엽을 갖는 다자엽 체세포배의 경우 0.5%에서 47.61%로 가장 높은 발생빈도를 보였고, 농도가 증가할수록 감소한 반면, 생장이 지연된 구형기의 체세포배는 처리농도가 증가 할수록 발생빈도도 약간씩 증가하였다 (Table 2).

대두의 체세포배 형태발생에 있어서 sucrose농도가 낮을수록 (0.5~2.0%) 2개의 자엽을 갖는 정상적인 체세포배 발생빈도가 증가하며, 3%보다 높은 고농도에서는 다자엽을 갖는 비정상적인 체세포배의 발생빈도가 증가되는 것으로 알려져 있고(Kageyama et al. 1990; Lazzeri et al. 1988), 고농도의 maltose가 첨가된 배지는 체세포배의 발생빈도를 감소시킬 뿐만 아니라 체세포배의 형태변이의 원인이 될 수 있다는 연구 결과(Strickland et al. 1986) 등과 본 연구 결과는 매우 유사한 경향을 보여 주고 있다. 또한 이러한 현상은 배양과정에서 첨가되는 BAP나 Zeatin과 같은 외래 호르몬이나(Strickland et al. 1986; Lee and Soh 1993b), 체세포배발생에 있어서 가장 효과적인 호르몬으로 알려진 2,4,-D 등(Lazzeri et al. 1987)이 주요 원인이 될 수 있으며, 이는 배양과정에 첨가된 여러 가지 주요 성분(외래 호르몬, 탄소원)이 접합자배의 정상적인 발생과정에서 내재오옥신의 이동 불균형(Liu et al. 1993) 분포를 초래함으로써 트럼펫 모양이나 다자엽 형태의 자엽을 갖는 체세포배 발생을 유도한 것으로 판단된다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 더덕의 체세포배 형성에서는 sucrose가 glucose와 같은 단당류처리나 sucrose와 삼투제의 조합처리 보다는 더 효과적인 것으로 나타났으며, 오히려 고농도의 sucrose나 삼투제 처리는 높은 삼투효과에 의해서 발생빈도를 감소시킨 것으로 나타났다. 체세포배의 형태변이에 있어서 3% sucrose + mannitol 조합처리가 sucrose나 glucose 단독처리 그리고 3% sucrose + sorbitol조합처리보다 2개의 정상 자엽을 갖는 체세포배 발생빈도가 약간 증가하였고, 반대로 비정상 자엽을 갖는 체세포배 발생빈도는 감소하는 것으로 나타났다. 또한 2개의 자엽을 갖는 체세포배 발생빈도는 sucrose의 경우에서 농도가 증가할수록 가장 뚜렷한 감소현상을 보였고, 다른 조건에서는 약간씩 감소하는 경향을 보였다. 트럼펫 체세포배 발생빈도는 sucrose와 glucose의 단독

처리의 경우 농도가 증가할수록 감소하였지만 다자엽과 생장이 멈춘 구형기 체세포배 발생빈도는 증가하였다. 반대로 3% sucrose + mannitol 또는 sorbitol 조합처리의 경우 농도가 증가할수록 트럼펫과 생장이 지연된 구형기 체세포배 발생빈도는 증가하였고, 다자엽 체세포배 발생빈도는 감소하는 것으로 나타나 sucrose 또는 glucose와 다르게 나타났다. 이와 같이 더덕에서 체세포배 형성 수와 자엽 형태 변이는 내재 오옥신 및 싸이토키닌도 중요 하지만 배지에 필수적으로 첨가되는 탄수화물의 농도와 종류도 매우 중요하게 영향을 미치는 것으로 나타났다. 향후 본 연구의 배양조건에서 발생되는 높은 빈도의 다자엽배와 트럼펫 모양의 체세포배를 줄이고, 2개 정상 자엽을 갖는 체세포배의 발생빈도를 증가시킬 수 있는 배양 조건에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

적 요

체세포배 발생과 자엽 형태에 미치는 탄수화물과 삼투제의 영향을 알아보기 위하여 배발생캘러스를 탄소원으로 sucrose와 glucose를 그리고 삼투제로서 mannitol 또는 sorbitol을 3% sucrose와 조합하여 첨가한 MS액체배지에 배양하였다. 플라스크당 체세포배 최대 형성수(128.29)는 glucose단독 또는 삼투제와 3% sucrose를 조합처리한 배지보다 3% sucrose를 첨가한 배지에서 얻을 수 있었고, 그리고 탄수화물과 삼투제의 농도가 증가할수록 체세포배 형성수는 감소하였다. 2개의 자엽을 갖는 전체 체세포배 형성빈도(24.09)는 sucrose 단독(21.52), glucose단독(21.22) 그리고 sorbitol과 3% sucrose의 조합처리보다 mannitol과 3% sucrose조합처리배지에서 약간 높게 나타났다. 특히, sucrose와 glucose농도가 높을수록 2개의 자엽과 트럼펫 모양의 자엽빈도는 점차 감소하였고, 반면 다자엽과 생장이 지연된 구형기 체세포배 빈도는 증가하였다. 한편 삼투제와 3% sucrose의 조합처리 농도가 높을수록 트럼펫 모양과 생장이 지연된 구형기 체세포배 빈도는 뚜렷이 증가하였고, 반면 다자엽 체세포배의 빈도는 점차 감소하였다. 이와 같이 체세포배 발생과 체세포배의 자엽 형태는 탄수화물과 삼투제의 처리농도에 의하여 영향을 받을 수 있음을 보여주었다.

References

- Ammirato PV (1983) Embryogenesis. In: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y (eds.), Handbook of plant cell culture, Vol 1, Macmillan, New York, pp82-123
- Ashburner GR, Thompson WK, Burch JM (1993) Effects of a-naphthalene acetic acid and sucrose levels on the development of cultured embryos of coconut. Plant Cell Tiss Org Cult 35:

- 157-163
- Brown C, Brooks FJ, Pearson D, Mathias RJ (1989) Control of embryogenesis and organogenesis in immature wheat embryo callus using increased medium osmolarity and abscisic acid. *J Plant Physiol* 133:727-733
- Buchheim JA, Colburn SM, Ranch JP (1989) Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. *Plant Physiol* 89:768-775
- Choi JH, Kwon SY, Choi PS (2011) Anomalous somatic embryos formation and plant regeneration from the cultures of immature embryos of *Camellia japonica* L. *J Plant Biotechnol* 38:258-262
- Choi PS, Kwon SY (2013a) Histological characteristics of somatic embryos in melon (*Cucumis melo* L.). *Kor J Plant Res* 26:511-515
- Choi PS, Kwon SY (2013b) Procambium differentiation and shoot apical meristem development in somatic embryos of soybean (*Glycine max* L.). *J Plant Biotechnol* 40:55-58
- Choi PS, Soh WY, Cho DY, Liu JR (1994) Somatic embryogenesis in immature zygotic embryo cultures of Korean soybean (*Glycine max* L.) cultivars and effect of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid somatic embryo morphology. *Korean J Plant Tiss Cult* 21:7-13
- Choi PS, Soh WY, Cho DY, Liu JR (2005) Relationship of cotyledon number with procambium differentiation in somatic embryogenesis of *Codonopsis lanceolata* L. *Kor J Plant Biotechnol* 32:135-138
- Finer JJ (1987) Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.) on a high sucrose-containing medium. *Plant Cell Rep* 6: 372-374
- Isabelle GT, Mauro MC, Sossountzov L, Miginiac E, Deloire A (1993) Arrest of somatic embryo development in grapevine: histological characterization and the effect of ABA, BAP and zeatin in stimulating plantlet development. *Plant Cell Tiss Org Cult* 33: 91-103
- Kageyama C, Komatsuda T, Nadajima K (1990) Effects of sucrose concentration on morphology of somatic embryos from immature soybean cotyledons. *Plant Tiss Cult Lett* 7:108-110
- Komatsuda T (1992) Research on somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean. *Natl Inst Agrobiol Resources (Japan), Ann Rep No.* 7:1-78
- Lazzeri PA, Hildebrand DF, Collin GB (1987) Soybean somatic embryogenesis: effects of nutritional, physical and chemical factors. *Plant Cell Tiss Org Cult* 10:209-220
- Lazzeri PA, Hildebrand DF, Sunega J, William EG, Collin GB (1988) Soybean somatic embryogenesis : interaction between sucrose and auxin. *Plant Cell Rep* 7:517-520
- Lee KS, Soh WY (1993a) Somatic embryogenesis and structural aberrancy of embryos in tissue cultures of *Aralia cordata* Thumb. *Korean 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. *Korean J Plant Tiss Cult* 20:171-176
- Liu CM, Xu ZH, Chua NH (1993) Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *The Plant Cell* 5:621-630
- Merkle SA, Parrott WA, Flinn BS (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. *In: Thorpe TA* (ed.), *In vitro embryogenesis in plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp155-205
- Min SR, Yang SG, Liu JR, Choi PS, Soh W-Y (1992) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration on tissue cultures of *Codonopsis lanceolata*. *Plant Cell Rep* 10:621-623
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Soh WY, Choi PS, Cho DY, Liu JR (2001) Plant regeneration of somatic embryos with anomalous cotyledons formed in cell cultures of *Codonopsis lanceolata*. *Phytomorphology* 51:327-336
- Strickland SG, Mccall CM, Nichol JW, Stuart DA (1986) Enhanced somatic embryogenesis in *Medicago sativa* by addition of maltose and its higher homologs to the culture medium. *In: Somers DA, Gegenbach BG, Biesboer DD, Hackett WP, Green CE* (eds.), *VI Internal Conf Plant Tiss Cult (abstracts)*, Minneapolis, Univ Minnesota. pp188
- Stuart DA, Nelson J, Strickland SG, Nichol JW (1985) Factors affecting developmental process in alfalfa cell cultures. *In: Henke RR* (ed.), *Tissue culture in forestry and agriculture*, Plenum Press, New York, pp59-73
- Swedlund B, Locy RD (1993) Sorbitol as the primary carbon source for the growth of embryogenic callus of maize. *Plant Physiol* 103: 1339-1346