대두 체세포배에서 전형성충 분화와 경단분열조직의 발달

최필선 · 권석윤

Procambium differentiation and shoot apical meristem development in somatic embryos of soybean (*Glycine max* L.)

Pil Son Choi · Suk Yoon Kwon

Received: 13 March 2013 / Accepted: 13 March 2013
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Immature embryos of *Glycine max* L. was cultured on Murashige and Skoog's (MS) medium supplemented with 1 mg/L 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D). After 6 to 8 weeks of culture, immature embryos produced somatic embryos. Of somatic embryos, two cotyledonary embryo (14%), one cotyledonary embryo (37%), fused cotyledonary embryo (43%), and stunted globular embryos (6%) were observed. The procambial strand of cotyledons originated from circular procambial tissues of lower hypocotyl. The circular procambial tissues were independently divided into one or two procambial strand at the edge of cotyledonary-node, and then connected to each cotyledon to form somatic embryos with one or two cotyledons. When cotyledon was a fused type, the circular procambial strand in lower hypocotyl was continuously connected to the cotyledon. Also, somatic embryos with two cotyledons developed a functional shoot apex with the tunica-carpus structure. In contrast, somatic embryos with one or fused cotyledon formed an abnormal shoot apex without the tunica-carpus structure or with non-dome shape in the inter-cotyledonary area. These results indicated that the variation of cotyledon in somatic embryos is closely related to procambial differentiation and shoot apical meristem development.

Keywords Apical meristem, fused cotyledon, one cotyledon, somatic embryo, soybean, two cotyledon

서론

식물조직배양으로부터 발생하는 체세포배는 구조와 기능면에서 접합자배와 유사한 것으로 알려져 있으나 실제로는 많은 차이가 있다(Ammirato 1987). 일부 연구에서 체세포배의 자엽 수와 구조에 대한 차이를 보고 한바 있으며(Choi et al. 2005; Lee and Soh 1993), 그 원인은 여러 가지 요인, 즉 탄수화물의 종류와 농도(Soh et al. 2001), 호르몬 중에서 2,4-D(Choi et al. 1994), ABA와 BAP(Lee and Soh 1993), auxin(Liu et al. 1993) 등이 중요하게 작용하는 것으로 보고되어 있다. 또한 기내에서 발생한 비정상 형태의 체세포배는 낮은 식물체 재생율(Gray and Mortensen 1987; Soh et al. 2001)을 보이기 때문에 체세포배를 이용한 식물체 대량생산이나 유전자 도입을 통한 형질전환을 연구를 수행하기 위해서는 체세포배의 발생학적 이해가 선행 되어야 할 것이다.

체세포배 자엽 형성은 구형배의 선단부에 있는 하표피시원세포에서 분화 된다는 이론적 배경(Ammirato 1987)과 체세포배의 상배축 또는 하배축으로부터 전형성 조직이 분화된 후 자엽 절과 자엽으로 분화된다는 연구보고가 있다(Lee 1993; Choi et al. 2005). 한편, 기내 배양환경에서 형성된 비정상 자엽을 갖는 체세포배는 유경조직의 발달에 영향을 주어(Choi et al. 2005) 식물체로의 전환을 지연 또는 억제시켜 발아율을 감소시키거나(Soh et al. 2001), 반대로 높이기도 하는 상반된 견해가 있다(Lee 1993). 이와 같이 체세포배의 자엽형성은 전형성충 조직의 분화와 유경조직의 발달과 밀접한 관계가 있는 것으로 추정

P. S. Choi (✉)
남부대학교 한방제약개발학과 약용식물형질전환연구소
(Medicinal Plant Transformation Center, Department of Oriental
Pharmaceutical Development, Nambu University, Kwangju
506-824, Korea)
e-mail: cps6546@nambu.ac.kr

S. Y. Kwon
한국생명공학연구원 그린바이오연구센터
(Green Bio Research Center, Korea Research Institute of
Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806, Korea)

되고, 이는 식물체로의 전환율에도 영향을 미치기 때문에 체세포배의 초기 자엽 형성과정에서 전형성층 조직의 분화와 유경 조직의 형성과정을 이해하는 것이 매우 중요하다 할 수 있다.

본 연구는 대두 기내배양과정에서 발생하는 정상 및 비정상 체세포배에 대한 자엽 형성 초기과정에서 전형성층 조직의 분화와 유경 조직의 발달의 조직학적 관찰을 수행한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

체세포배 유도

대두(*Glycine max* L., 울산)종자를 수돗물에 8시간 침적한 후 물기가 있는 거즈에 처리하여 25°C 암소에서 발아시켰다. 2-3mm 정도의 유근이 자랐을 때 버미쿨라이트를 담은 화분에 각각 파종하여 8-9주 동안 온실에서 생육 재배하여 성숙한 식물체를 얻었다. 개화 후 15-20일째 미숙배의 크기가 2-4 mm 정도 되었을 때 꼬투리를 취하여 70% 알코올에 1분, 1% sodium hypochlorite 용액에 15분간 침적하여 표면 살균 후 멸균수로 3-5회 수세하였고, 클린벤치에서 미숙배를 분리하여 배양재료로 이용하였다. 배지는 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS배지(Murashige and Skoog 1962)를 사용하였으며, 페트리디쉬당 9개의 미숙배를 치상하였다. 배양 6주 후 절편으로부터 형성된 체세포배 형태를 해부 현미경 하에서 관찰 하였으며, 특히 자엽의 수와 모양에 따라 분류하여 기록하였다.

조직학적 관찰

대두 체세포배에서 자엽의 발생과 전형성층 조직의 분화, 유경 조직의 발달을 조직학적으로 관찰하기 위하여 기내 배양과정에서 얻은 2개 자엽을 갖는 정상 체세포배와 1개 그리고 합생 자엽을 갖는 비정상 체세포배를 해부 현미경하에서 조심스럽게 선별하였다. FAA에 24시간 이상 고정 시킨 후 부탄올 시리즈로 탈수하여 파라플라스트에 포매 하였다. 회전식 마이크로톰으로 10 μ m 두께의 절편을 만들어 헤마톡실린으로 염색한 후 광학 현미경하에서 각 절편을 연속관찰 하였다.

결과 및 고찰

배양 1주째부터 미숙배의 유근부위는 주로 갈변 현상을 보인 반면 자엽 부위는 대부분 팽창되거나 부풀기 시작하였다. 팽창된 미숙배 자엽 부위는 캘러스 형성 없이 직

Fig. 1 The frequency (%) of somatic embryos with two cotyledons, one cotyledon, fused cotyledon and stunted globular embryos formed from the culture of immature embryo on the MS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D for 6-8 weeks

접 돌기모양의 구형기 체세포배를 형성하였고, 점차 자엽기의 체세포배로 발생되었다. 배양 6-8주째에 미숙배로부터 형성된 체세포배를 해부현미경하에서 관찰한 결과, 2개의 자엽을 갖는 정상 체세포배는 전체 체세포배중에서 약 14%로 매우 낮은 빈도로 나타났다. 반면 생장이 지연되거나 멈춘 구형기의 체세포배는 약 6%, 1개의 자엽을 갖는 체세포배는 37% 그리고 자엽이 융합된 합생 자엽을 갖는 체세포배는 약 43%로 가장 높았고, 대부분 형태적으로 비정상인 것으로 나타났다. 이와 같이 대두 체세포배중에는 정상형태 보다는 주로 비정상 형태의 체세포배가 발생되고 있음을 알 수 있었고, 그 중 합생 자엽 또는 1개의 자엽을 갖는 비정상적인 형태의 체세포배가 대부분임을 알 수 있었다(Fig. 1). 일부 연구에서 대두의 잎과 줄기 배양을 통해 체세포배를 얻은 바 있으나 대부분 연구에서는 2,4-D를 첨가한 배지에 미숙배를 배양하였을 때 어려움 없이 체세포배를 얻을 수 있음을 보고한 바 있다(Buchheim et al. 1989; Finer and Nagasawa 1988; Choi et al. 1994). 또한 2,4-D농도가 0.1 - 0.4 mg/L 범위 일때는 정상형태의 체세포배가 그리고 0.5 - 4 mg/L에서는 1개 또는 합생 자엽을 갖는 비정상 체세포배가 높게 형성된다는 결과(Choi et al. 1994)와 마찬가지로 본 연구에서도 1개 그리고 합생 자엽을 체세포배 빈도가 높게 나타남을 확인할 수 있었다. 이와 같이 대두 체세포배 발생을 위한 배양재료로 미숙배가 그리고 2,4-D 농도가 비정상 형태의 체세포배 발생에 중요한 요인이 될 수 있음을 알 수 있었다.

2개, 1개, 합생 자엽을 갖는 정상 및 비정상 체세포배를 선별하여 횡단면을 조직학적으로 관찰 한 결과, 2개의 자엽을 갖는 체세포배의 경우 전형성층 조직은 하배측에서 원형모양을 이루고 있었고(Fig. 2C-D), 이러한 원형의 전형성층조직은 상배측과 자엽 절 부위로 갈수록 2개의 독립된 전형성층조직으로 나뉘어져(Fig. 2B), 각 자엽 조직

Fig. 2 Transverse sections of early heart-shaped embryo with two cotyledons in tissue cultures of *Glycine max* L. were made from radicle to cotyledons. Procambial tissues in the radical (E), lower (D) and upper hypocotyls (C) are transformed into two procambial tissues (arrow, B), which are run into two cotyledons (A). All bars = 70 μ m

Fig. 3 Transverse sections of somatic embryo with one cotyledon in tissue cultures of *Glycine max* L. Nearly circular procambial tissues (F, G) in lower hypocotyls were transformed into one procambial tissues (arrows, C-E), which were run into one cotyledons at cotyledonary node (B) and cotyledons (A). All bars = 75 μ m

으로 분화되는 것으로 관찰되었다(Fig. 2A). 반면 1개의 자엽을 갖는 비정상 체세포배의 경우 하배측에서는 정상 체세포배와 동일하게 원형의 전형성층 조직이 형성되었지만(Fig. 3E-G) 상배측과 자엽 절 부위에서는 1개의 뚜렷한 전형성층 조직으로 분화된 후(Fig. 3C, D) 자엽 부위까지 연결되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 3A, B). 또한 합생 자엽을 갖는 체세포배의 경우에는 하배측에서 형성된 원형의 전형성층 조직이 상배측, 자엽 절, 자엽 부위까지 원통형으로 이어지고 있는 것으로 관찰되었다(Fig. 4). 이와 같이 2개의 자엽을 갖는 정상 체세포배와 동일하게 1개 또는 합생 자엽을 갖는 비정상 체세포배에서도 하배측 부위에서는 동일하게 원형의 전형성층 조직이 분화되어

Fig. 4 Transverse sections of somatic embryo with fused cotyledons in tissue cultures of *Glycine max* L. Circular procambial tissues (D-F) in lower hypocotyls were run into the cotyledon (A) through cotyledonary node (B,C). All bars = 75 μ m

있었으나 상배측 → 자엽 절 → 자엽으로 갈수록 자엽의 수와 형태에 따라 다른 형태의 분화양상을 보여주고 있었다. 배지에 첨가되는 식물호르몬과 탄소원은 비정상 체세포배발생의 원인이 되며(Kageyama et al. 1990), 이는 구형기의 체세포배에서 내재 오옥신의 극성 이동이 억제됨으로서(Liu et al. 1993) 나타나는 현상으로 심장형기 체세포배의 전형성층조직의 분화와 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다(Raghavan, 2004; Choi et al. 2005). 본 연구에서도 체세포배의 자엽 발달은 하배측에서 형성된 원통형의 전형성층대가 극성방향(자엽과 유근)으로 분화되고 있음을 보여주고 있고, 이는 체세포배의 자엽 형성과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다.

정상과 비정상 체세포배를 종단면으로 절단하여 유경조직을 관찰한 결과 2개의 자엽을 갖는 체세포배의 유경조직은 세포질이 충만해 있는 작은 세포들로 구성되어 있고, tunica-corpora층을 이루고 있는 전형적인 dome모양이었다(Fig. 5A1, A2). 그러나 1개의 자엽을 갖는 비정상 체세포배에서는 2자엽 체세포배와 다르게 몇 개의 세포들로 구성된 빈약한 구조를 형성하고 있었으며, dome모양의 구조는 아니었다(Fig. 5B1, B2). 특히 합생 자엽을 갖는 체세포배의 경우는 거의 유경조직을 확인 할 수 없었다(Fig. 5C1, C2).

체세포배의 자엽 수와 형태적 변이는 식물체로의 재생을 감소시킬 수 있고(Buchheim et al. 1989), 그 원인은 비정상적인 유경조직의 형성 때문이라고 주장한바 있다(Dos Santos et al. 1983; Gray and Mortensen 1987). 본 연구에서도 자엽 수와 형태적 변이를 보인 1개 및 합생 자엽의 유경조직은 2개의 자엽을 갖는 체세포배에 비하여 매우 빈약하게 형성되었거나 거의 흔적만 관찰되어 자엽의 변이가 유경조직의 형성과 밀접한 관계가 있음을 보여주었다. 따라서 대두 체세포배에서 초기 심장형기 체

Fig. 5 Longitudinal sections of somatic embryos with structurally abnormal cotyledons formed from the tissue cultures of *Glycine max* L. A1, A2: Normal plumule with tunica-carpus layer of two cotyledonary embryo (arrow, bar = 90 μ m); B1, B2: One cotyledonary embryo with poorly developed plumule, C1, C2: Fused cotyledonary embryo with aborted plumule

세포배 형성과정에서 전형성층 조직이 하배측에서 발달되어 양극성 방향, 즉 자엽과 유근 방향으로 분화되고, 자엽의 수와 형태에 영향을 미칠 뿐 아니라 유경 조직의 발달에도 중요하게 관련되어 있음을 추정할 수 있었다.

적 요

대두 미숙배 배양으로부터 체세포배를 얻기 위해 1 mg/L 2,4-D를 첨가한 MS배지에서 6-8주 동안 배양한 결과 2개의 자엽을 갖는 정상체세포배가 14%, 1개의 자엽을 갖는 비정상 체세포배가 37%, 합생자엽을 갖는 비정상 체세포배가 43% 그리고 생장이 멈춘 구형기 체세포배가 6%로 얻어졌다. 체세포배의 전형성층은 하배측에서 원형모양으로 분화되어 자엽 절로 이어진 후 1개의 자엽은 1개 전형성층이, 2개의 자엽은 2개의 전형성층이 각 자엽으로 발달하였고, 합생 자엽의 경우 하배측에서 형성된 원형의 전형성층이 자엽까지 연결되어 있었다. 한편 2개의 자엽을 갖는 체세포배의 경우는 tunica-carpus층을 이룬 전형적인 유경조직을 이루고 있었으나 1개 또는 합생 자엽을 갖는 체세포배는 tunica-carpus층이 없고, dome모양이 없는 흔적만 남은 유경조직을 이루고 있었다. 이러한 결과는 체세포배에서 전형성층의 분화는 자엽의 형성과 유경조직의 발달에 밀접한 관계가 있음을 시사한다.

사 사

본 연구는 차세대 바이오그린21사업(PJ008103)의 지원 하에 수행 되었다.

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
- Buchheim JA, Colburn SM, Ranch JP (1989) Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. Plant Physiol 89:768-775
- 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
- Dos Santos AVP, Cutter EG, Davey MR (1983) Origin and development of somatic embryos in *Medicago sativa* L. (Alfalfa). Protoplasma 117:107-115
- Gray DJ, Mortensen JA (1987) Initiation and maintenance of long term somatic embryogenesis from anther and ovaries of *Vitis longii* "Microsperma". Plant Cell Tiss Org Cult 9:73-80
- 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 (1993) Somatic embryogenesis and structural aberrancy of embryos in tissue cultures of *Aralia cordata* Thumb. Kor J Plant Tiss Cult 20:77-84
- 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
- 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
- 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