

## 8장. 캘러스에서 기관과 배의 형성

Callus는 본래 분화된 조직과 기관의 상처에서 생기는 기관이 형성 되지 않은 조직이다. 이러한 callus를 적당한 조건에서 배양하면 부정기관이 형성(organ formation, organogenesis)되거나 부정배(不定胚embryoid) 즉 배형성(胚形成embryogenesis)이 일어난다. Callus는 protoplast화 시키기가 용이하고 기관으로의 재분화가 쉽기 때문에 매우 유용하다.

### 1절. 캘러스의 유도 및 증식

식물의 조직이 상처를 받게 되면 상처부위가 재생(再生regeneration)되기 위하여 callus가 형성되는데 이와 같이 이미 분화된 절편체로부터 분화되지 않은 세포로 복귀하는 현상을 탈분화(脫分化de-differentiation)라고 한다. 탈분화는 분리된 절편체의 성숙세포가 어린 상태로 되돌아 가는 회춘(回春rejuvenation)이 일어난다. 회춘된 세포는 성숙세포보다 성장과 분열능력이 더 크며 특수환경하에서 기관(organ)이나 배(胚embryo)로 재생할 수 있다.

| Callus Induction Media (MS Media) |         |
|-----------------------------------|---------|
| MS salts                          | 4.3g    |
| Sucrose                           | 30g     |
| MS vitamin                        | 1       |
| Casein hydrolysate                | 1g      |
| 2,4-D                             | 3mg     |
| pH                                | 5.7-5.8 |
| Agar for solid medium             | 8g      |

표 1. callus 유도배지의 조성 예시

절편체가 탈분화된 후에는 세포가 배지에 첨가되어 있는 물질의 영향을 받아 활발히 분열되어 callus를 형성하게 된다. Callus의 형성은 외식편(explant)의 채취부위나 시기, 생리적인 상태에 따라 영향을 받는다. 이러한 영향은 주로 내생생장 촉진물질(內生生長 促進物質)이나 내생생장 억제물질(內生生長 抑進物質)의 함량이 식물조직의 부위 또는 계절적으로 차이가 있기 때문에 나타나는 현상이다.

절편체로부터 callus를 형성시키기 위해서는 성장조절제 뿐만 아니라 배지의 성분, 광, 온도, 식물체의 인자형에 따라 차이가 있으나 일반적으로 성장조절제의 영향이 callus의 유도에 가장 큰 영향을 미친다. 성장조절제의 요구도는 3가지형으로 구분된다. ① Auxin 하나만 필요한 경우 (주로 단자엽 식물), ② cytokinin 하나만 요구하는 경우 ③ auxin과 cytokinin 두 가지를 요구하는 경우가 있다. 배지의 성분으로는 MS배지의 무기성분 또는 MS배지의 변형배지를 이용하고 탄소원으로는 설탕 또는 포도당(2~4%)을 이용한다. 광은 식물의 중

류에 따라 광선을 요구하거나 암흑이 필요한 경우가 있다. 온도는 일반적으로 22~28℃이나 비교적 고온일 때가 callus형성이 잘 된다.

Callus의 증식은 계대배양을 하여 증식시킨다. 계대배양의 배지는 callus를 유도하였을 때 배지와 유사하다. 계대배양은 고체배지 또는 액체배지에 배양을 한다.

Callus를 장기간 계대배양을 계속하면 분화력(分化力)이 상실된다. 이는 전형성능(全形成能 totipotency)을 지니고 있는 세포가 그 기능을 발휘하지 않기 때문이다. 이러한 기능에는 배지조성이나 배양환경 등 여러 요인이 관여되어 있지만 주된 원인은 유전정보나 유전적 정보를 상실함으로써 초래된다.

또한 callus 배양에는 습관성(habituatio)이 작용한다. 즉 callus 계대배양을 반복하면 auxin과 cytokinin의 요구성을 잃고 성장조절체에 독립영양성이 되는 현상을 말한다.

## 2절. 캘러스로부터 기관의 재생

Callus로부터 부정기관과 체세포 배(somatic embryo)를 유기시킬 수 있다. 여기서는 부정기관의 재생에 대해서 설명하기로 하고 체세포배는 다음의 항목에서 설명할 것이다.

Callus 조직의 재생능력은 이미 앞에서 언급된 것처럼 callus의 계대배양이 계속되면 재생능력이 감소하거나 완전히 소실될 수 있다. 재생능력을 향상시키기 위해서는 여러 요인들이 관계하나 일반적으로 조절제가 주요한 역할을 한다. Callus 조직에서 auxin농도가 cytokinin농도보다 높으면 부정근이 형성될 확률이 높고, 이와 반대로 cytokinin의 농도가 auxin의 농도보다 높으면 부정아가 형성될 확률이 높다. 물론 callus 조직에서 부정아의 유도는 이처럼 간단하지는 않다. 어떤 경우에는 배지의 염(salt)농도가 높을 때, ammonium 농도가 높거나 낮을 때 부정아 형성이 잘 되는 경우도 있다. 반대로 과량의 auxin이 첨가될 경우 잎이 뒤틀리거나, 종양을 형성시키게 되므로 적정량을 사용해야한다.

어쨌든 callus 배양을 통하여 번식을 시키고자 할 때는 다음의 요건을 만족시키는 것이 좋다.-배양 절편체에서 callus 형성이 용이하고 형성된 callus를 배양하기 쉬운 것-장기간 계대배양을 한 후에도 식물체로의 재생능력이 높을 것-유전적으로 안정할 것-체세포 유래의 배발생이 가능할 것.

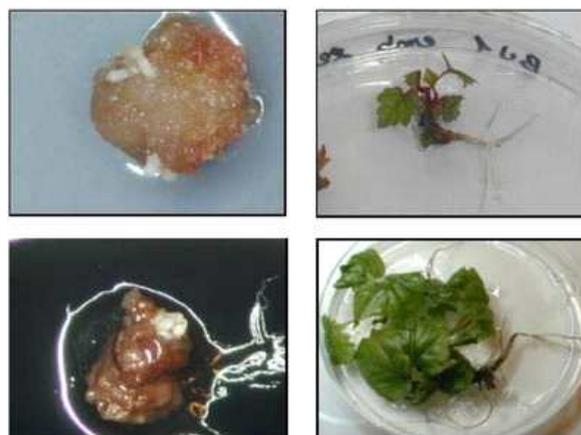


그림 1. Embryo형성을 통한 plant regeneration 위: 화분을 통해 만든 Embryogenic callus를 통한 식물체 형성, 아래: 성장점을 통해 유도한 embryogenic callus를 통한 식물체 형성

### 3절. 체세포 배 형성(Somatic embryogenesis)

배(胚, Embryo)는 난세포와 정세포의 수정에 의해서 이루어지는 접합자 배형성이다. 그러나 체세포배는 체세포나 조직으로부터 배가 재생하는 것을 말한다. 이러한 체세포 배를 배 유사구조, 부정배(adventitious embryo), 영양배, 부정배(embryoid), 무성배(無性胚, asexual embryo)라는 용어로 불린다. 이렇게 만든 체세포 배배양의 경우 유전자가 transformation된 식물체를 빠르게 얻기에 굉장히 유용하다.



그림 2. 체세포배 형성과정

배발생 세포의 특성: 크기가 작고 조밀한 세포질, 비대한 인(nucleolus)을 가진 핵(nucleus) 작은 액포 및 다량의 전분립, RNA합성과 신진대사 활동 활발

체세포배의 일반적 유도조건

체세포 배의 유도에는 고농도의 auxin, 특히 2,4-D가 요구되며 Giberelline과 ethylene은 일반적으로 배형성을 억제한다. ABA는 배의 정상적 성숙을 촉진하며 유식물체에서 유기된 callus에서의 배발생빈도가 높다. 무기물의 경우 질소(N)은 ammonium ion형태로 적은양을 공급하며 칼륨(K)는 질소가 제한되었을 때 촉진되며 칼슘(Ca)농도가높을경우 배발생이 억제된다. 빛과 고온이 또한 일반적으로 배형성을 촉진한다.

#### <직접형성되는 방식>

- callus 시기를 거치지 않고 절편조직의 일부에서 단일세포나 일단의 세포로부터 무성배 (asexual embryo)가 형성되는 것. ex)감귤류(citrus)의 중심조직

#### <간접적인 배형성 방식>

- 절편체에서 callus를 형성시키고 여기서 전배(proembryo)를 발생시킴
- 전배는 높은 농도의 옥신에서 잘 발생한다. ex)0.45~4.52 $\mu$ M 2,4-D

- 성장조절제가 없는 배지에 callus를 옮겨서 초기의 proembryo에서 쌍극성 (bipolar) 배가 나오도록 유도.

-체세포 배의 유도-

<일반적인 조건>

- 배의 유도에는 고농도의 auxin 특히 2,4-D가 요구된다.
- gibberellins 과 ethylene은 일반적으로 배형성 억제
- ABA는 배의 정상적인 성숙을 조장하고 이상배 발생이나 배들 사이의 불균형 발육을 억제해서 마치 수정란에서 생긴 배와 같이 정상이면서도 균일한 배의 집단을 만든다.
- 유식물체에서 유기된 callus에서의 배 발생 빈도가 높다

<무기물의 영향>

- N → ammonium ion형태로 적은 양 공급
- K → 질소가 제한되었을 때 촉진
- Ca → 농도가 높으면 배 발생 억제
- 염농도 → 높으면 배 발생 촉진

<유기물의 영향>

- 야자유- 배양초기에 배 발생에 효과적
- 환경 - 광: 일반적으로 촉진
- 온도: 고온이 일반적으로 촉진