

Prunus mume S. et Z. 外 三種의 藥培養에 關한 研究*¹

金 在 生*²

Studies on the Anther Culture of *Prunus mume* S. et Z. and the Other Three Species*¹

Jai. Saing Kim*²

When haploid plant would be appeared by the anther culture, the large quantity of young plant multiplied maternal inheritance and the same pure line rapidly in the short length of time, which will be effected to cut down much expences, efforts and time for the production of seeds or seedlings.

Therefore, the development of the technique for this would be much profited in the country industry.

In the late of a few years, studies were early attempted in this field, but up this time there were a few success of plants only and none of perennial plant.

In this status of the country condition required earnestly for the development of the green industry, this researcher attempted to culture the anther of late uninucleate microspore or early binucleate microspore of the *Prunus mume* and the other three species, economic trees estimated specially economic, on the place of Modified Murashige and Skoog's medium supliment with Kinetine, 2.4-D, and N.A.A. for inducing haploid plants.

The obtained results were as follows:

1. 2,000 anthers were cultured and there were shown that 2N callus in *Prunus mume* had 82 as 4.1%, 2N callus in *Prunus tomentosa* 15 as 0.8%, 2 N callus in *Prunus salisina* 75 as 4%.
2. N callus had shown 40 as 2% from *Prunus armeniaca* var. *ansu* only, and the other trees showed all 2N callus.
3. Callus had appeared in every tree but 2N callus appeared was all filaments and there showed from only connective tissue N callus appeared was all from anther locule inside.
4. Then *Prunus armeniaca* var. *ansu* only was not callus of somatic anther tissue origin, but as there was callus originated from microspore which was changed in to swollen microspores or polynucleate microspores, it was certain to need haploid plant.

藥培養에 依하여 半數體植物이 誘起되면 母系와 同一한 純系를 가장 單時日에 많은 量의 幼植物體가 急進의으로 増殖되므로 種子나 育苗生産에 對한 時間과 努力 및 經費가 大幅의으로 節減될 수 있게 된다. 따라서 여기에 對한 技術開發의 結果는 産業的으로 보아 그 利得이 至大할 것이다.

最近 3~4年間 여기에 對한 많은 研究가 試圖되었지만 現在까지 成功된 것은 不過 3~4種의 草本植物에 지나지 않으며 木本植物에서 成功된 일은 없다.

*¹ Received for Publication on May. 28, 1976.

*² 慶尙大學 Gyeongsang National University

따라서 筆者는 現下 우리나라 綠色産業發展에 寄與코자 特히 經濟性이 높다고 看做되는 有實樹種인 *Prunus mume*外 3種의 1~2核性 小孢子期의 葯을 材料로 하여 Keinetine, 2,4-D, NAA等을 添加한 Murashige and Skoog의 改良培地에다. 培養하여 보았던바 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 各樹種마다 2,000個씩의 葯을 培養하였는데 *Prunus mume*에서는 2n callus가 82個(全體의 4.1%), *Prunus tomentosa*에서는 15個(全體의 0.8%)의 2n Callus가, *Prunus salicina*에서도 2n Callus가 75個(全體의 4%) 發生하였다.
2. N Callus는 *Prunus armeniaca*에서만 40個(全體의 2%) 發生하였고 그 外의 樹種에서는 모두 2n Callus만 發生하였다.
3. Callus는 各樹種마다 發生되었지만 2n Callus가 發生된 것은 모두 葯絲나 葯隔組織에서 發生되었고 N Callus가 發生된 것은 모두 葯腔內部에서 發生된 것이었다.
4. 따라서 *Prunus armeniaca*만은 體細胞性 葯隔起源의 Callus가 아니고 小孢子가 變化되어 多核小孢子 또는 多細胞等으로 變化된 小孢子由來의 Callus였으므로 半數體가 育成되는 것이 確實하다.

緒 言

植物體의 組織培養에 關한 研究는 Haberandt³⁾가 植物의 組織과 器管을 適當한 培養基에 培養하면 繼續 成長된다고 하는 報告가 있었던 以來 많은 研究陣들에 依하여 Callus가 形成되었다던지 形成된 그 Callus에서 幼植物體가 透導되었다고 하는 報告等이 있다.^{2,3)}

그러나 생긴 Callus의 大部分은 모두가 나 體細胞(2n) 由來의 것이 많았고 小孢子(n) 由來의 것은 거의 얻기가 어렵고 힘들었다.

또한 極히 最近에 와서는 植物體의 組織中 特히 花粉管이나 花粉粒을 特殊培地에 培養하여 半數體植物을 誘起시켰다고 하는 報告等이 있다. 卽 *Ginkgo biloba*에서는 精細胞와 多核性細胞가 出現되어 Callus가 形成되었고³³⁾, *Torreya Nutcifer*에서도 Callus³⁴⁾가, *Taxus brerifolia*에서는 花粉의 異狀分裂이³⁵⁾, *Brassica oleraceae* *Brassica alcohgraba*의 F₁花粉에서는 Callus가 形成되었다고하는 報告³⁷⁾가 있는가 하면 Guha and Maheshwari^{1,2)}는 *Datura innoxia* Mill의 成熟花分期의 葯을 培養하여 半數性의 Embrioid와 半數體를 作出하였으며 中田, 田中³²⁾는 담배의 葯培養에서 또한 新關, 大野^{24,25)}는 벼의 葯培養에서 各各 半數體를 獲得하는데 成功하였고 또한 國內에서는 韓·高·金³⁾ 등이 一年生 草本植物인 *Solanum nigrum*에서 半數體植物을 誘起시키는데 成功한 일이 있다.

이와같이 葯培養에 依하여 半數體植物을 誘起시키기爲한 國內外 學者들의 關心이 至大하여진 것은 半數體植物만 誘起되면 母系와 同一한 純系를 가장 單時日에 많은 量의 幼植物體를 急進的으로 增殖시킬 수 있게 되

므로 種子나 育苗生産에 對한 時間과 努力 및 經費가 大幅的으로 節減된 수 있어서 여기에 關한 技術開發의 結果는 產業的으로 보아 그 利得이 크기 때문이다.

따라서 筆者는 前報^{19,20)}에 이어 現下 우리나라 綠色産業發展의 一環策에 寄與코자 木本植物中 特히 經濟性이 높다고 看做되는 有實樹種을 材料로 葯培養을 繼續實施하여 Callus가 發生되는 模樣, 葯腔內의 小孢子의 變化, 體細胞組織의 變化 等을 調查觀察하였던바 몇 가지의 結果를 얻었기에 여기에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

材料는 有實樹種인 *Prunus mume* Siebold et Zuccarini 外 3種의 葯을 採取하여 使用하였으며 (Table 1), 花蕾는 繁雜을 避하기爲하여 2月下旬頃 小孢子의 核이 1~2核性期에 있는 것을 使用하였고 (Table 1), 採取한 꽃봉오리는 95% alcohol에 2~4秒동안 浸漬하였다가 곧 7%의 Calcium hypochlorite에 約 10~15分間 滅菌한다음 殺菌水에 씻었으며 Dryoben으로 殺菌한 petridish에 殺菌 Knife와 pinset로 葯을 摘出하여 準備된 test tube 內의 Medium內에다 約 20個씩의 葯을 하나씩 公순히 接種하였다.

Medium는 亦是 Modified murashige & Skoog's Medium을 基本培地로 하고 여기에 Keinetine, 2,4-D, NAA, YE 등의 生長促進物質을 適宜 添加한 것을 使用하였으며 (Table 2), 이것을 autoclaving한後 P.H는 Hcl과 NaoH로 모두가 다 6이 되도록 均一하게 調整하였다.

또한 接種한 葯은 25°C의 Black Chamber內에서 培養하였으며 培養途中의 變化過程은 每日같이 觀察하였고 一定한 間隔으로 paraffin method와 microtoming

Table 1. Stage of anthers and the dates they were collected by each materials.

Materials	Date collected	Stage of anther
<i>Prunus mume</i> Sieb. et Zucc.	Feb. 23—March 30	Uninucleate microspore
<i>Prunus tomentosa</i> Thunberg.	Feb. 23—March 30	Tetrad
<i>Prunus armeniaca</i> L. var. <i>ansu</i> Max.	Feb. 23—March 30	Tetrad
<i>Prunus salsina</i> Lindley	Feb. 23—March 30	Uninucleate microspore

Table 2. Modified Murashige & Skoog's medium

Component	mg/1
NH ₄ NO ₃	1,650.00
KNO ₃	1,900.00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370.00
KH ₂ PO ₄	170.00
Na ₂ -EDTA	74.60
FeSO ₄ ·7H ₂ O	56.60
H ₃ BO ₃	6.20
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.30
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10.60
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
Glycine	20.00
Nicotinic acid	5.00
Pyridoxine—HCl	5.00
Thiamino-HCl	201.00
Inositol	30,200.00
Sucrose	20,000.00
Agar	8,000.00

method(Table 3,4)에 의한 方法으로 切片, 標本을 만들어 檢鏡하였다. 또한 培養途中 곰팡이가 생긴것은 除去하여주고 새로운 培地에 移植하여 주었다.

結果 및 考察

培養中の 藥莖 小孢子의 組織의인 變化狀態를 보면 接種培養한 날로부터 4~8日頃이 되면 大部分의 藥은 褐色으로 變化하기 始作하며 35日頃이되면 黑褐色으로 變한다. 그러나 그中の 若干은 長時日이 걸려도 本來의 形態 그대로 藥色이 變하지 않는 것도 있는데 이와같이 變化하는 것이건 變하지 않는 것이건 모두가 다 枯死하지는 않으며 藥莖組織이나 藥絲의 細胞가 肥大하면

서 細胞分裂을 하게 된다. 또한 分裂된 藥은 藥絲가 붙은 部分에서나 藥絲가 붙은 縫合線 即 藥隔에서 Callus가 形成되 기도 하며 肥大된 藥腔內的 Callus도 急激히 增加하게 되는데(Fig. 1), 이때 培養當時의 藥莖組織

Table 3. Process of paraffin method.

Paraffin Method
1. Materials
2. Fixation
3. Water washing
4. 30% alcohol 30 min.
5. 50% alcohol 30 min.
6. 70% alcohol 30 min.
7. 80% alcohol 30 min.
8. 90% alcohol 30 min.
9. 95% alcohol 30 min.
10. 98% alcohol 30 min.
11. al, Xylol I 30 min.
12. al, Xylol II 30 min.
13. Xylol soft paraffin I 2 h.
14. Xylol soft paraffin II 2 h.
15. Hard paraffin I 2 h.
16. Hard paraffin II 2 h.
17. Embedding

은 完全하며 絨絨組織은 거의 消失된다.

그리고 黑褐色으로 變한 藥은 마치 삶아놓은 麥粒의 크기만한 模樣으로 肥大하여 接種當初의 크기에 比하면 約 3~4倍로 커지는데 이와같이 肥大하여지는 現象은 그 肥大部位에서 Callus가 形成되기 때문이라고 생각된다.

그런데 또한 小孢子의 變化狀態를보면처음에는 培養當時의 것보다 肥大한 것 多核으로 된것, (Fig. 3), 多細胞體이지만 花粉膜으로 쌓여 있는 것, 生育이 適當히 進行된것 등이 있다. 또한 藥莖組織도 細胞들이 分裂하면서부터 厚胚模樣을 한 것도 보인다. (Fig. 3).

培養 50日 頃이 되면 藥의 縫合線에서나 또는 藥莖組織에서 淡黃色의 Callus가 急激히 자라나게 되는데

Table 4. Process of Microtoming Method

Microtoming Method
1. Materials
2. Dryoven 37°C 48 h.
3. Xylol I 30 min.
4. Xylol II 20 min.
5. Alcohol I 10 min.
6. Alcohol II 10 min.
7. 95% alcohol 10 min.
8. 90% alcohol 10 min.
9. 80% alcohol 10 min.
10. 10% alcohol 10 min.
11. Washing 30 min.
12. Iron alum riquied 30 min.
13. Washing 10—30 min.
14. Haematoxein 30 min.
15. Washing 10—30 min.
16. Iron alum destaining
17. 70% alcohol 1 min.
18. 80% alcohol 10 min.
19. 90% alcohol 10 min.
20. 95% alcohol 10 min.
21. 100% alcohol I 10 min.
22. 100% alcohol II 10 min.
23. Car-Xylol 20 min.
24. Phenol xylol 20 min.
25. Xylol I 30 min.
26. Xylol II 30 min.
Mouunt

(Fig. 1), 이들의 Callus 들은 *Prunus mume Siebold et Zuccarini*와 *Prunus tomentosa Thunberg*, *Prunus salsina Lindely* 등에서 나온 2배성 Callus가 大部分이었고 小胞子에서 나온 半數性 Callus가 形成되는 것은 *Prunus armeniaca L. var ansu Max.*로서 極히 少量이었다. (Fig. 1). 이와같이 Callus에는 藥小胞子에서 發生된 Callus와 藥壁組織에서 發生된 Callus가 各各 그 起源이 달랐다. (Fig. 1, 4).

即 換言하면 *Prunus armeniaca L. var ansu Max.*에서는 藥을 培養한 約 2個月 前後가 되면 藥의 被層에서 甚한 細胞分裂이 일어나서 分化되어 多細胞花粉이나 多核小胞子 등으로 分裂된다. (Fig. 5). 그리하여 藥腔內에는 Callus化된 組織系가 나타나서 그것이 藥腔을 塞치고 튀어나오게 되는데 (Fig. 6) 이 Callus塊는 體細胞起源의 Callus가 아니고 小胞子由來의 Callus였으므로 半數性 Callus일기 틀림없었다. 왜냐하면 이 Callus의 變化狀態는 마치 *Paonia suffruticosa Andr.*²⁰⁾ *Solanum nigrum L.*²¹⁾에서 나온 Callus가 모두 藥壁組織이 Callus化되고 小胞子가 Callus로 變하여 Callus化된 事實 등과 꼭같은 Callus現象이었기 때문이다.

4種의 有實樹種을 對象으로 Callus形成에 對한 組織的 觀察을 調査하여 본바 Table 5.와 같이 각 樹種마다 2,000個씩의 藥을 培養하였는데 *Prunus mume Siebold et Zuccarini*에서는 2n Callus가 82個 (4.1%), *Prunus tomentosa Thunberg*에서는 2n Callus가 15개 (0.8%), *Prunus armeniaca L. var. ansu Max.*에서는 n Callus가 40개 (2%), *Prunus salsina Lindley*에서는 2n Callus가 75個(4%)가 各各 發生되었는데 이와같이 大部分의 Callus는 2n Callus로서 藥隔 또는 藥內壁柔組織들이 形成한 母體와 同一한 染色體를 가진 體細胞由來의 Callus

Table 5. Induction of callus from n and 2n callus by each species

Species	No. of inoculated anthers	2n callus	%	n callus	%
<i>Prunus mume Siebold et Zuccarini</i>	2,000	82	4.1	—	—
<i>Prunus tomentosa Thunberg.</i>	2,000	15	0.8	—	—
<i>Prunus armeniaca L. var. ansu Max.</i>	2,000	—	—	40	2
<i>Prunus salsina Lindley</i>	2,000	75	4	—	—

였는데 *Prunus armeniaca L. var. ansu Max.* 만큼 비록 적은 數의 n callus이기는 하나 小胞子由來의 Callus가 形成된 것이 分明하다.

따라서 이것이 木本植物에서 誘起되었다는 점에서 今後經濟樹種의 藥培養技術開發에 意義있는 일이 되리라고 生覺한다.

結 論

藥培養에 依하여 半數體植物이 誘起되던 母系와 同一한 純系를 가장 短時日에 많은 量의 幼植物體가 急進的으로 增加되므로 種子나 育苗生産에 對한 時間과 努力 및 經費가 大幅的으로 節減될 수 있게 된다. 따라

서 여기에 對한 技術開發의 結果는 産業的으로 보아 그 利得이 至大할 것이다.

그런데 最近 3~4年間 여기에 對한 많은 研究가 試圖 되었지만 現在까지 成功된 것은 不過 3~4種의 草本植物 에 지나지 않으며 木本植物에서 成功된 일은 거의없다 따라서 筆者는 現下 우리나라 綠色産業 發展에 寄與 코자 特히 經濟性이 높다고看做되는 有實樹種인 *Prunus mume siebda* et Zuccarini外 3種의 1~2核性 小孢子期 의 藥을 材料로하여 Keinetinc, 2,4-D, NAA等을 添加 한 Murashig and Skoogs의 改良培地에다 培養하여 보 았던바 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 各樹種마다 2,000個씩의 藥을培養하였는데 *Prunus mume Siebold* et Zuccarini에서는 2n Callus가 82個(全體 4.1%), *Prunus tomentosa* Thunbergii에서는 15個(全體 의 0.8%)의 2n Callus가, *Prunus Salsina* Lindley에서 도 2n Callus가 75個(全體의 4%)發生하였다.

2. N Callus는 *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Max. 에서만 40個(全體의 2%) 發生하였고 그외의 樹種에서 는 모두 2n Callus만 發生하였다.

3. Callus는 各樹種마다 發生되었지만 2n Callus가 發生된 것은 모두 藥絲나 藥隔組織에서만 發生되었고 N Callus가 發生된 것은 모두 藥腔内部에서 發生된 것이 었다.

4. 따라서 *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Max.만은 體細胞性 藥隔起源의 Callus가 아니고 小孢子가 變化되 이 多核小孢子 또는 多細胞等으로 變化하여서된 小孢子 由來의 Callus였으므로 半數體가 育成되는 것이 確實 하였다.

引 用 文 獻

1. Guha, S. and S.C. Maheshwari, 1964. In vitro production of embryos from anthers of *Datura* 240(57) : 497.
2. — and — 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura* in Vitro. Nature 212 (5057) : 97-98.
3. Haberlandt, G., 1902. Kultur versuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber. Akad. Wiss. wien. Kl. 111 : 69-92.
4. 韓昶烈, 權臣漢, 任建燦, 金光植 1968. 당근의 組織培養에 關한 研究, 韓國 園藝 學會誌, 第三卷 ; 24-32.
5. 韓昶烈, 1969. 藥培養에 關한 研究, 韓國作物學會誌 7 : 161~165.
6. —, 高英瑞·鄭德教·金秉煥, 1969. 菜蔬의 藥培養에 關한研究. (1) 오이의 2倍性 粘性性 Callus 韓國園藝學會誌 6 : 25-27.
7. —, 1969. 벼의 藥培養에 關한研究. 韓國育種學會誌 1 : 1-12.
8. —, 高英瑞·金文子, 1970. *Nicotiana tabacum* 의 藥培養에 關한研究. 韓國作物學會誌 8 : 117-120.
9. —·—. 1970 *Solanum nigrum* L.의 藥培養에 關한 研究 韓國育種學會誌 2 : 29-36.
10. —. 黃貞姬, 1970. 벼의 藥培養에 關한 研究. Haploid callus의 發生 및 分化에 關하여. 護天李容夏教授 記念論文集 71-74.
11. —·—. 1970. 벼의 藥培養에 關한 研究分 2. 分化培地에 移植된 haploid callus의 發生 및 分化. 韓國植物 및 會誌 13(3) : 17-19.
12. Harn C., 1971 Studies on anther culture in *Solanum nigrum* L. SABRAO News letter, 3(1) : 39-42.
13. 韓昶烈·金文子, 1972. *Prunus armeniaca*의 藥培養에 關한 研究. 韓國育種學會誌 4 : 1-5.
14. Kato, H. and M. Takeuchi., 1963. Morphogenesis in Vitro starting from single cells of carrot root. plant and cell physiol. 4 : 243-245.
15. 龜谷壽昭, 1967. 花粉からのカルス形成(務報). 育. 17刷 2 : 107.
16. —, 日向康吉, 1970. *Brassica* 花粉からの半數體 育成 日本植物學會誌 20 : 14-19.
17. Kameya, T. and Hinata, 1970. Induction of haploid plants from pollen grains of *Brassica*. Japan. J. Breeding, 20(2) : 82-87.
18. 片山糺男·根井正利, 1964. 植物の半數性に關する 研究 富崎大學農學部 育種學研究室報告 2 : 1-78.
19. 金在生, 1971. 木本植物의 藥培養에 關한 研究. 韓國林學會誌 13 : 23-39.
20. 金在生, 1974 *Paeonia suffruticosa* Andr.의 藥培養에 關한 研究. 韓國林學會誌 : 23 : 9-16.
21. 村上寬一, 1967. 藥培養で 半數體をつくる農業及 び園藝. 42(6) : 971-972.
22. 中田和房·田中正雄, 1968. 藥の 組織培養による 花粉かちのタバコ幼植物の分化. 日本遺傳學會誌43 (1) : 65-71.
23. —·—. 1968. 花粉の 組織培養によるタバコ 半數體の育成. 農業及園藝 43 : 685-686.
24. Nizeki, H. and K.Oono, 1968 Induction of haploid rice plant from anther cultur. Proc. 23(7) : 27-28.

25. 新關宏夫・大野清春, 1968. 葯培養によるイネ半数體の育成. 農業技術 23(7) : 27-28.
26. Nishi, T. and S. Mitsuoka, 1969. Occurrence of various ploidy plants from anther and ovary culture of rice plant. Japan. J. Genetics, 44(6) : 341-346.
27. Nitsch, J.P. and C. Nitsh, 1969. Haploid plants from pollen grains. Science, 1963 : 8-87.
28. 西 貞夫・豊田努・大澤勝次, 1970 やく培養の利用に関する研究 日本園藝學會 春季研究發表要旨 166-167.
29. ———, 1970. アブラナ科そ菜のやく培養に関する研究. 日本園藝試験場 研究年報 2-11.
30. ———, 1970. バラ科そ菜のやく培養に関する研究. 日本園藝試験場 研究年報 ; 12-16.
31. Sunderland, N. and F.M.Wick, 1969. Cultivation of haploid plants from tobacco pollen. Nature 224 : 1227-1229.
32. 田中正雄・中田和男, 1969. 葯培養によつて得られたタバコの 種類と半数體の染色体數 増加處理について日本遺傳學會誌 44 : 47-54.
33. Tulecke, W., 1957. The pollen of *Ginkgo biloba* in *vitro* culture and tissue formation. Amer. Jour. Bot. 44 : 602-608.
34. and N Schgal, 1963. Cell proliferation from pollen of *Torreya nucifera*. Contrib. Boyce Thompson Inst. 22 : 153-163.
35. Tulecke, W., 1959. The pollen culture of C.D. La Rue : Atissue from the pllen of *Taxus*. Bull. Torery Bot. Club, 86 : 283-289.

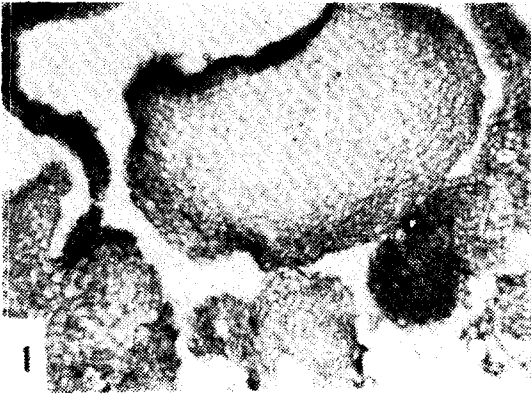


Fig. 1. Callus of *P. mume* Siebold et Zuccarini developing from anther wall.

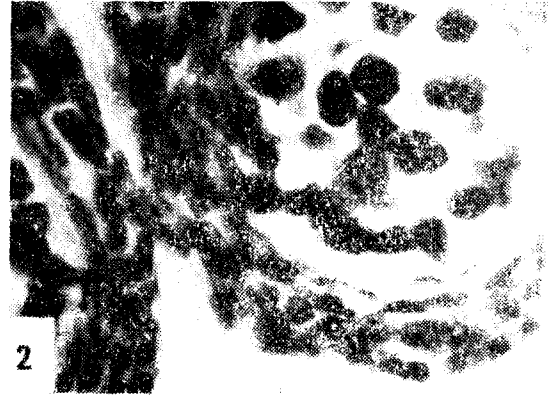


Fig. 2. Cross-section of anther of *P. mume* Siebold et Zuccarini.

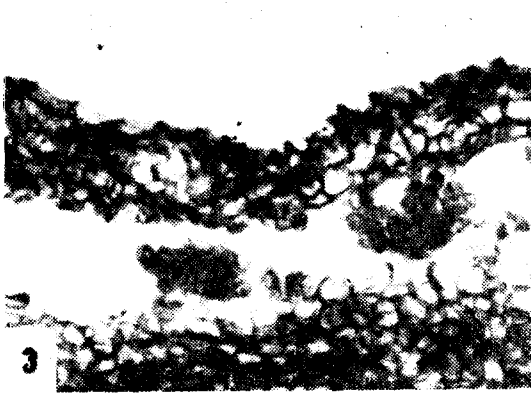


Fig. 3. After 4-8 days from anther culture: *P. mume* Siebold et Zuccarini.

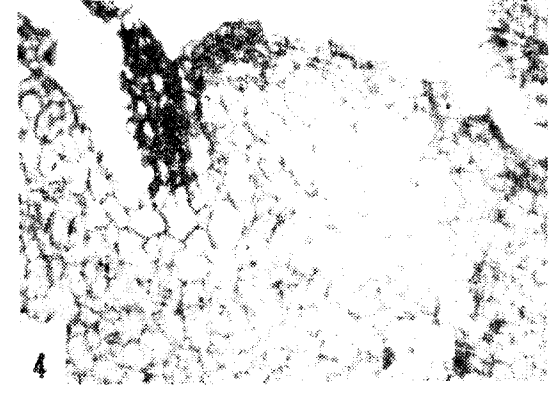


Fig. 4. Tissue and callus mume.



Fig. 5. Microspore change of *P. armeniaca*. Swollen (1, 2)

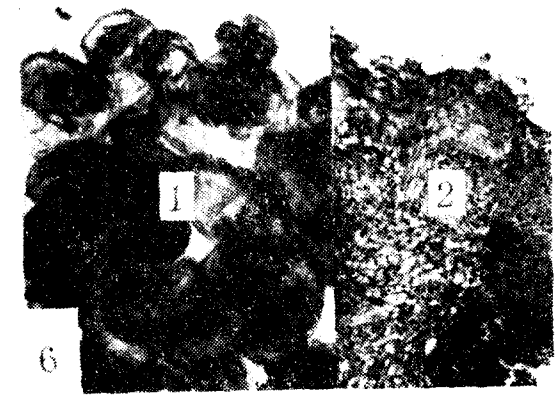


fig. 6. Mass of n Callus (1) and fully developed Callus mass(2)