

芍藥의 花粉小胞子로부터 캘러스와 胚 形成

孫 再 根 · 金 敬 旻 · 權 容 三

慶北大學校 農學科

Callus and Embryo Formation from Microspore Culture of Peony(*Paeonia lactiflora* Pall.)

Jae Keun SOHN · Kyung Min KIM · Yong Sham KWON

Department of Agronomy, Kyungpook National University

Abstracts

Pollen microspores isolated from peony anthers were cultured by agarose embedding method in the MS medium with 2,4-D(1mg/l) or phenylacetic acid(1, 10, 100mg/l), and without plant hormone. It was observed that pollen microspores cultured on hormone-free medium were directly developed into embryos. Callus formation was enhanced from microspores which were cultured on medium supplemented with 1mg/l PAA. Embryos were also formed from the calli transferred into the hormone-free medium.

Keywords : pollen embryogenesis, pollen culture, *Paeonia lactiflora*

서 론

Paeonia 屬 식물은 다른 작물에 비해 器內에 배양된 藥이 매우 느린 반응을 보이기 때문에 藥으로부터 식물체가 유가되는 데는 4-6개월 정도 소요되는 것이 문제점으로 지적된 바 있다(Sunderland, 1983). 근년에 와서 藥의 저온 처리효과(李, 1982), 배지내의 성장조절제 조성(孫 과 金, 1993), 藥培養에서 형성된 胚의 발육(孫 等, 1994)등에 대한 연구가 수행되면서 芍藥의 藥培養 효율은 크게 개선되고 있는 실정이다. 식물의 藥에는 반수성 생식 세포인

花粉小胞子이외에도 약벽조직이나 화사와 같은 체세포 조직도 있기 때문에 藥을 器內에 배양하면 대부분의 경우는 花粉小胞子에서 식물체가 분화되지만 식물의 종류나 배양조건에 따라서는 이들 體細胞로부터도 기관분화가 일어날 수도 있어서 藥을 배양하는 것보다는 약내의 花粉小胞子を 분리 배양하는 것이 보다 확실한 半數體 생산법으로 알려져 있다(鄭 等, 1992). 그러나 최근까지 藥培養에서 반수체를 생산한 作物 種의 數는 크게 증가하고 있지만 花粉小胞子の 분리배양에서 반수체를 생산한 예는 몇몇 작물에 국한되어 있고 그 배양효율

또한 매우 저조한 것으로 알려져 있다. 근년까지 연구되어 온 여러가지 花粉小胞子 분리배양방법 중에서 일정기간 前培養된 藥으로부터 花粉小胞子를 채취하여 배양한 것이 비교적 배양효율이 높은 방법으로 알려지고 있으나, 유채(Lichter, 1982), 담배(Kyo 와 Harada, 1985), 보리(Wei 等, 1986)등의 작물에서는 藥으로부터 직접 花粉을 분리배양하여 반수체를 얻은 예도 있다. 기내배양된 花粉小胞子が 胚나 캘러스로 발달하는 데는 배양초기의 세포분열효율과 분열양상이 가장 중요한 요인으로 지적되고 있고(鄭 等, 1992), 花粉小胞子の 초기분열 양상은 매우 다양한 것으로 보고되어 있다(韓 과 崔, 1976).

따라서 본 연구에서는 芍藥의 花粉小胞子 배양에서 소포자유래의 胚를 획득하기 위하여 성장조절제의 조성이 다른 배지에 花粉小胞子를 직접 분리 배양한 후 花粉小胞子の 초기분열 및 캘러스와 胚로 발달하는 양상을 관찰한 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

본 실험에서는 국내 재배종인 “의성작약”의 花粉小胞子를 배양재료로 사용하였다. 1994년 5월 중순에 포장에서 채취된 화뇌로부터 화분의 발달 단계를 검경한 다음 1핵성 花粉小胞子를 갖는 화뇌의 외관적 특징을 관찰하고 직경이 15-20mm인 화뇌를 화경이 10 cm 정도 부착된 상태로 채취하여 5℃에 10일간 前處理하였다. 花粉小胞子를 藥으로부터 분리하기 전 70% 에탄올로 화뇌의 표면을 소독하고 멸균

수로 2-3회 수세한 다음 꽃잎을 조심스럽게 제거하고 3-4개의 화뇌에서 200-250개의 약을 채취 하였다. 채취된 약을 30g/l의 sucrose가 첨가된 MS배지(Murashige 와 Skoog, 1962) 20ml를 분주한 비이커(100ml)에 넣고 유리막대기(φ2×12cm)로 분쇄하여 stainless steel sieve(38μm)를 이용하여 花粉小胞子를 분리하였다. 분리된 화분 소포자는 sucrose(30g/l)가 첨가된 MS배지(세척용액)를 채운 원심분리 튜브(10ml)에 넣어 1분간(1,000rpm)씩 3-5회 원심분리하여 정제 하였다. 정제된 花粉小胞子를 세척용액으로 5×10⁶개/ml로 밀도를 조절하고 30g/l의 sucrose, 8g/l의 agarose를 첨가한후 성장조절제의 조성이 다른(표 1) MS배지 3ml와 花粉小胞子の 밀도가 조절된 용액 1ml을 섞어 1회용 플라스틱 샐레(φ5cm)에 embedding 하여 26℃의 항온실에서 암배양하였다. 배양 후 花粉小胞子の 수는 혈구계산기(hemocytometer)로 조사하였고, 花粉小胞子の 생존여부는 FDA(fluoresceine diacetate)법으로 조사 하였다. 花粉小胞子の 발달양상은 캘러스나 不定胚가 육안으로 관찰될 때까지 현미경으로 검경하였다.

결과 및 고찰

배지내에 첨가된 성장조절제의 조성에 따른 花粉小胞子の 분열정도, 캘러스 및 胚形成에 미치는 영향을 조사한 바(표 1), 소포자의 분열은 성장조절제가 첨가되지 않은 배지에서 9.6%로 가장 높았고, 100mg/l의 PAA가 첨가된 배지에서 1.6%로 가장 낮았다.

Table 1. Effect of plant regulators on callus and embryo formation from cultures of isolated microspores in *P. lactiflora*

Plant regulators (mg/l)	No. of microspores cultured/ml	Division frequency of microspores (%)	No. of microspores		
			forming callus	forming embryos	
2, 4-D	0	1,217 ± 77	9.6	0	5
	1	892 ± 12	8.3	0	0
PAA	1	912 ± 200	7.7	31	0
	10	917 ± 12	2.0	1	0
	100	825 ± 89	1.6	0	0

약에서 분리배양된 花粉小胞子(그림 1의 A)는 PAA가 첨가된 배지에서는 배양 7일 후에 그림 1의 B와 같이 균등분열을 하는 소포자의 빈도가 높았으며, 이들 세포는 배양 4-5주 후에 다세포체(그림 1의 C)와 작은 캘러스(그림 1의 D)를 형성 하였고, 배양 7주 경에는 캘러스로 발달하는 양상이 육안으로 뚜렷하게 관찰 되었다. 그리고 화분소포자 배양에서 형성된 이들 캘러스를 생장조절제가 첨가되지 않은 배지에 이식하였을때 배양 7주 후에 그림 1의 E와 같은 胚가 형성되었다. 생장조절제가 첨가되지 않은 배지에 배양된 花粉小胞子는 배양 5-7일 후에 그림 1의 F 및 G와 같은 화분소포자의 불균등 분열 양상을 관찰 할 수 있었고, 배양 3주 후에는 이러한 불균등 분열(그림 1의 H)이 진전되어 7주 후에는 직접 胚 발생 과정을 거쳐서 화분소포자 유래의 胚(그림 1의 I)가 형성됨을 알 수 있었다.

식물의 화분소포자 배양에서 기내에 배양된 소포자의 분열양상은 배지의 조성에 따라 다르다고 보고되고 있는데, Ono 와 Harashima (1981)는 작약의 소포자 배양에서 배지내의 생장조절제의 조성에 따라 화분소포자의 분열효율이 달랐으며 2mg/l의 NAA가 첨가된 배지에서 캘러스가 형성되었다고 하였으나 소포자 유래의 배형성은 확인하지 못하였고, 韓과

崔(1976)는 작약의 약배양에서 배양초기의 화분소포자 분열양상을 조사한 바, 2세포성소포자, 다핵성소포자 및 다세포체 등 여러가지 형태가 있었다고 하고 소포자의 분열양상에서도 균등분열과 불균등분열로 구분 되었다고 하였다.

본 연구에서도 화분소포자의 초기 분열효율은 배지내에 첨가된 2,4-D나 PAA의 농도에 따라 뚜렷한 차이를 보였는데 이러한 결과는 소포자의 분열효율 면에서 Ono와 Harashima (1981)의 연구 결과와 유사한 경향이었다. 또한 본 연구에서 화분소포자의 초기 분열양상은 균등분열을 하는 소포자(그림 1의 B)와 불균등분열을 하는 소포자(그림 1의 G)로 구분되었는데 이러한 소포자의 분열양상은 韓 과 崔(1976)의 연구결과와 비슷한 경향이었다. 다만 본 연구에서 불균등분열을 하는 소포자들은 캘러스가 형성되지 않고 직접 胚로 발달하는 양상을 보였는데 이에 대해서는 앞으로 보다 깊이 있는 연구가 수행되어야 할 것으로 본다.

적 요

芍藥의 藥으로부터 분리된 花粉小胞子를 생장조절제가 첨가되지 않은 MS 배지에 배양하

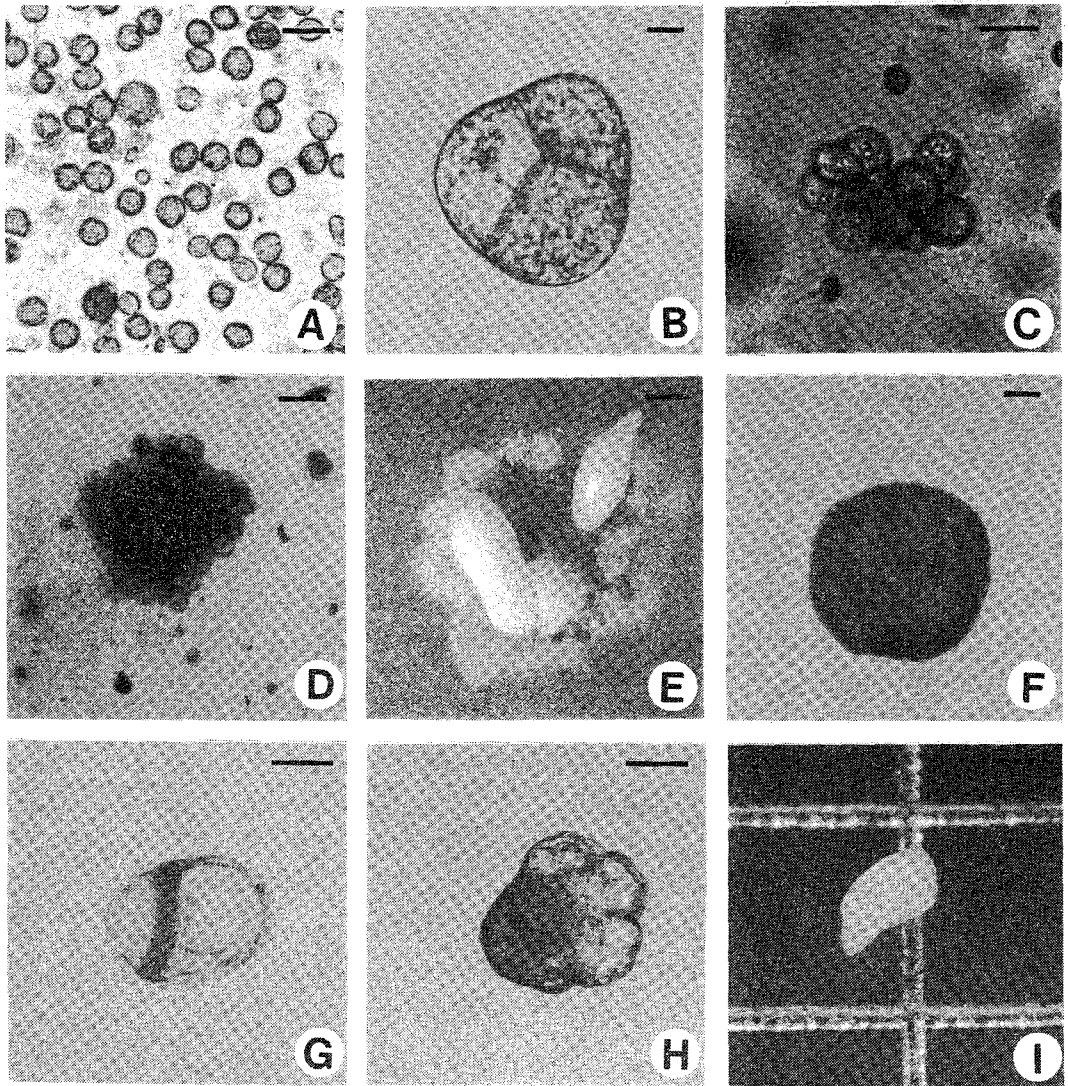


Fig. 1. *In vitro* behavior of isolated microspores of *P. lactiflora* cv. "EuseongJagyag". A: microspores isolated from anthers(Bar=50 μ m), B: equal dividing 3-cell microspores after 7 days of culture (Bar=10 μ m), C: cell colony after 4 weeks(Bar=30 μ m), D: micro callus formation after 5 weeks(Bar=100 μ m), E: embryo from pollen-derived callus(Bar=1mm), F: unequal dividing microspores after 5 days(Bar=10 μ m), G: 2-cell micropores after unequal division(Bar=25 μ m), H: further unequal division of microspores after 3 weeks(Bar=25 μ m), I: direct embryogenesis after 7 weeks(Bar=300 μ m).

였을때 직접 胚발생 과정을 거쳐서 소포자 유래의 胚가 형성되었고, 1mg/l의 PAA가 첨가된 배지에서는 화분소포자 유래의 캘러스가 형성 되었으며 이들 캘러스를 생장조절제를 함유하지 않은 배지에 이식하였을 때 배양 7주 후에 胚가 형성되었다.

인 용 문 헌

1. 鄭根植 等. 1992. 半數體와 植物育種, 螢雪出版社. pp. 35-100.
2. 韓昶烈, 崔光泰. 1976. 栽培芍藥의 藥培養에 관한 研究. 植物組織培養誌 4(1):9-13.
3. Kyo, M. and H. Harada. 1985. Studies on conditions for cell division and embryogenesis in isolated pollen culture of *Nicotiana rustica*. Plant Physiol. 79:90-94.
4. 李萬相. 1982. 花蕾 低溫處理가 芍藥 藥培養에 미치는 影響. 植物組織培養誌 9(1):1-6.
5. Lichter, R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. Z. Pflanzenphysiol. 105:427-434.
6. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, Physiol. Plant. 15:473-497.
7. Ono, K. and S. Harashima. 1981. Induction of haploid callus from isolated microspores of peony *in vitro*. Plant & Cell Physiol. 22(2): 337-341.
8. 孫再根, 金泳煥. 1993. 芍藥(*Paeonia lactiflora* Pall)의 藥培養에서 생장조절제가 캘러스 및 胚形成에 미치는 영향. 植物組織培養誌 20(5):255-259.
9. 孫再根, 金光洙, 金敬旻. 1994. 芍藥(*Paeonia lactiflora* Pall.)花粉에서 由來된 胚의 發達과 分化植物體의 倍數性. 植物組織培養誌 21(4):215-219.
10. Sunderland, N. 1983. The concept of morphogenic competence with reference to anther and pollen culture, In: S. K. Sen and K. L. Giles(eds.), Plant Cell Culture in Crop Improvement, Plenum Press, New York, pp. 125-139.
11. Wei, Z. M., M. Kyo, and H. Harada. 1986. Callus formation and plant regeneration through direct culture of isolated pollen of *Hordeum vulgare* cv. 'Sabarlis'. Theor. Appl. Genet. 72:252-255.