

## 연초 약배양시 Anther - donor 식물체의 생육조건 및 약의 저온처리가 반수체 출현빈도에 미치는 영향

금 완 수

한국인삼연초연구원 수원시험장

### Influence of Growth Environment of Anther - Donor Plant and Chilling treatments to Flower Bud on Haploid Plantlets Production in Anther culture of *Nicotiana tabacum* L.

W. S. Keum

Suwon Experiment station

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, P.O. Box 59, Suwon, 440 - 600, Korea

**ABSTRACT :** The present experiments were conducted to investigate some of the factors affecting the number of haploids derived from anther culture of *Nicotiana tabacum*.

Anther - donor plants grown under controlled environment room at 30°C yielded more haploid than room at 18, 25 and 26 - 22 - 18°C in anther culture. Donor plants starved of fertilizer yielded more haploids as compared to those of the well fed with fertilizer in anther culture. Pretreatment of exercised flower bud at 5°C was shown to be more effective in anther culture than pretreatment at 7 and 10°C, and the optimum temperature and period of pretreatment were 4 or 6 days at 5°C.

## 서 론

연초의 약배양에 의한 반수체 식물의 유기는 Bourgin과 Nitsch<sup>2)</sup>가 처음으로 성공한 이래 그 후 많은 연구자들에 의하여 반수체 식물의 출현빈도를 높이는 방법이 개발되었다<sup>3, 4, 5, 7, 14, 15, 16)</sup>. 반수체 식물은 동형접합체의 조기육성, 유전분석 및 돌연변이체 선발 등에 널리 이용되고 있으며, 최근에는 각종 병원균이 분비하는 독성물질 및 제초제가 함유된 배지에 약배양으로 병 및 제초제에 저항성인 반수체 식물의 선발 가능성을 제시하고 있다<sup>20)</sup>. 약배양으로 병저항성, 제초제 등 다른 stress에 저항성을 가진 반수체 식물선발의 효율성을

높이기 위해서는 배지에 접종되기전의 약의 상태가 반수체 출현빈도를 높일 수 있는 조건이 되어야 한다.

연초는 타작물에 비하여 반수체 식물의 유기가 매우 쉬운 연초육종에 실용적으로 이용할 수 있는 반수체 식물의 획득이 가능하나 약당 화분의 수에 비해서 아직도 반수체 출현빈도는 낮은 편이다. 연초의 약배양에 의한 반수체 출현빈도는 모식물의 생육환경이 고온이며<sup>8, 11)</sup>, 장일보다는 단일에서 조도는 높을 때<sup>3, 4, 6)</sup> 또 24°C 장일보다는 18°C의 단일조건에<sup>7)</sup> 반수체 식물의 출현빈도가 높다고 하여 연구자간의 상이한 결과를 보고하고 있으며 약을 배양하기전에 꽃봉오리의 전처리 온도와 기

간에 있어서도 연구자들 간에 상이하게 보고하고 있다<sup>12, 14, 15, 17)</sup>. 따라서 본 시험은 모식물의 생육 환경 및 꽃봉우리의 전처리가 반수체 출현빈도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 수행하였던 바 몇가지 얻은 결과를 보고코자 한다.

### 재료 및 방법

공시재료는 연초품종 NC2326을 사용하였고 파종후 50일된 묘를 Pot (φ 17.7×19.7cm)에 이식하여 초장이 60cm 정도 달하였을때 모식물(anther - donor plant)의 환경조건에 따른 반수체 출현빈도를 조사하기 위하여 자연광실(26 - 22 - 18°C, 자연일장), 18°C 인공광실(25Klux, 광18시간), 25°C 인공광실(25Klux, 광 12시간), 30°C 인공광실(25Klux, 광 12시간)에 각각 5주씩 처리하였다. Pot의 배양토는 퇴비, 모래, 황토를 각각 4 : 2 : 2의 비율로 혼합하여 사용하였고 시비량은 Pot당 연초용 복합비료 46g씩 시비하였다. 모식물의 영양상태에 따른 반수체 출현빈도에 관한 시험은 pot이식시 전술한 배양토에 연초용 복합비료 46g 시비한 처리구와 무비구로 나누어 자연광실(26 - 22 - 18°C, 자연일장)에서 양성하였다.

꽃봉오리의 저온처리 온도 및 기간이 반수체 출현빈도에 미치는 영향에 관한 시험은 pot당 연초용 복합비료 46g을 시비하여 자연광실에서 양성한 모식물의 꽃봉오리를 채취하여 5, 7, 10°C에 각각 2~10일간 처리하였다.

약 배양시 꽃봉오리의 소독은 70% ethanol에 30

초간 침적한 후 1% sodium hypochlorite 용액에 5분간 처리한 다음 멸균수로 3회 세척하였다. 약 배양 배지는 Nakamura 등<sup>9)</sup>의 배지를 사용하였고 배양액은 200ml △flask당 40ml씩 분주하여 멸균하였다.

배양실의 조건은 온도 26°C, 2500lux의 16시간 조명하였다. 접종한 약에 대한 유식물 출현을 및 약당 평균 유식물수는 약접종 후 60일째에 조사하였다.

### 결과 및 고찰

모식물을 온도 및 일장을 달리한 조건에서 각각 처리했을 때 약배양에 의한 유식물 출현율은 표1과 같이 30°C 처리구가 76.0%로 가장 높았고 18°C와 25°C 처리구는 각각 71.9 및 71.0%로 차이가 없었으며 26 - 22 - 18°C 처리구가 61.4%로 가장 낮았다.

약당 평균 유식물수에 있어서도 30°C 처리구에서 8.5주로 가장 많았고 25°C 및 18°C 처리구간 각각 7.3 및 6.8주였으며 26 - 22 - 18°C 처리구는 4.7주로 가장 적었다.

모식물을 온도 및 일장이 다른 조건에 각각 처리하였을 때 온도가 높고 일장이 길때 유식물 출현율이 높고 약당 유식물 수가 많았는데 이러한 결과는 Primo - Miller와 Sunderland<sup>11)</sup>, Kasperbauer와 Collins<sup>8)</sup>의 보고와 대개 일치하는 경향이다. 특히 본 시험에서 30°C 인공광실은 다른 처리구에 비하여 유식물 출현율 및 약당 평균유식물 수가 높게 나타나 모식물의 환경조건을 30°C 인

Table 1. Influence of growth environment of anther - donor plant on haploid plantlets production from cultured anthers of flue - cured tobacco variety NC 2326 (*N. tabacum*)

Treatment	No. of anther cultured	% anther with plantlets	Average no. of plantlets per anther
26 - 22 - 18°C	91	61.4 c	4.7 c
18°C	93	71.9 b	6.8 b
25°C	93	71.0 b	7.3 ab
30°C	94	76.0 a	8.5 a

Values within a column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level.

공광실에 처리함으로써 보다 많은 반수체 식물을 생산할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 26-22-18℃ 자연광실 조건은 유식물 출현율이나 약당 평균 유식물수가 모두 타처리에 비하여 낮게 나타났는데 이는 식물의 영양상태가 가장 좋았는데 기인된 것으로 <sup>4)</sup> 고찰된다.

모식물을 이식시 배양토에 Pot당 연초용 복합 비료를 시비한 구와 무비구의 약을 배양한 결과는 표 2와 같다. 시비구에 있어서는 유식물 출현율이 59.2%인데 비하여 무비구에서는 77.3%로 현저히 높게 나타났으며 약당 평균 유식물 수에 있어서도 무비구가 6.8주로 시비구의 5.4주에 비하여 높게

Table 2. Influence of fertilizer application levels of anther-donor plant on haploid on haploid plantlets production from cultured anthers of flue-cured tobacco variety NC 2326 (*N. tabacum*)

Treatment	No. of anther cultured	% anther with plantlets	Average no. of plantlets per anther
Fertilizer	95	59.2 b	5.4 b
Non-fertilizer	98	77.3 a	6.8 a

Values within a column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level.

Table 3. Influence of chilling treatments to flower buds on haploid plantlets production from cultured anthers of flue-cured tobacco variety NC 2326 (*N. tabacum*)

Temperature	Days of chilling	No. of anther cultured	% anther with plantlets	Average no. of plantlets per anther
5 °C	0	143	60.9 c	3.7 c
	2	141	67.8 b	5.6 b
	4	145	74.2 a	7.4 a
	6	143	75.0 a	6.9 a
	8	148	77.0 a	5.0 bc
	10	148	71.5 ab	4.9 bc
7 °C	0	143	60.9 d	3.7 c
	2	143	64.4 cd	4.3 bc
	4	142	67.1 bc	5.1 b
	6	137	73.4 a	5.3 b
	8	146	71.6 ab	6.8 a
	10	147	74.0 a	5.1 b
10 °C	0	143	60.9 c	3.7 c
	2	141	64.0 bc	5.2 a
	4	141	66.0 b	5.8 a
	6	138	68.0 ab	5.8 a
	8	141	72.0 a	5.0 ab
	10	144	72.6 a	4.7 abc

Values within a column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level.

나타났다. 이러한 결과는 Sunderland<sup>14)</sup>가 질소시비구보다 질소결핍구에서 유식물 출현율 및 약당 평균 유식물 수가 높았다고 한 결과와 비슷한 경향이다.

모식물에서 채취한 꽃봉오리를 5°C, 7°C, 10°C에 2~10일간 전처리한 후 그 약을 배양한 결과는 표 3과 같다.

무처리구의 유식물 출현율이 60.9%인데 비하여 저온에 2~10일 전처리한 구는 64.0(10°C, 2일)~77.0%(5°C, 8일)로 모두 높게 나타났다. 약당 유식물 수도 무처리구에서 3.7주인데 비하여, 저온에 2~10일간 전처리한 구는 4.3주(7°C, 2일)~7.4주(5°C, 4일)로 모두 높은 경향이였다. 전처리 온도별로 보면 5°C 처리구에서 유식물 출현율이 71.3%로 가장 높았고 7°C의 70.1%, 10°C의 68.5% 순이나 처리온도 간에 유의차는 인정되지 않았다.

모식물에서 채취한 꽃봉오리를 5°C, 7°C, 10°C의 저온에 2~10일간 처리한 구가 무처리구에 비하여 유식물 출현율과 약당평균 유식물 수가 높게 나타난 것은 많은 연구자<sup>14, 15, 17)</sup>들의 보고와 일치하는 경향이다. 저온처리가 유식물 출현빈도를 높이는 원인에 대해서는 저온이 약의 퇴화 및 노화를 지연시켜 화분의 생존능력을 길게 함으로써 보다 많은 화분이 배를 형성할 수 있는 화분으로 전환된다고 하며<sup>1, 15)</sup> 또 배를 형성하는 S 화분의 수를 높이기 때문이라고 한다<sup>7)</sup>. 처리 온도별 유식물 출현율은 차이가 없었으나 약당 평균 유식물 수는 5°C에서 7°C 및 10°C에 비하여 높았다. 이러한 결과는 Nitsch<sup>10)</sup>의 보고와는 같은 경향이나 Sunderland<sup>14)</sup>, Rashid와 Reinert<sup>12)</sup>가 5°C 보다는 7°C 및 10°C가 적합하다는 보고와 상이하게 나타났다. 또한 처리온도별 기간에 있어서 5°C의 경우에는 4일 및 6일에서, 7°C 및 10°C에서는 6~10일간 처리한 구에서 유식물 출현율이 높고 약당 평균 유식물 수도 많았다. 이러한 결과는 Taguchi와 Mii<sup>16)</sup>가 5°C에서 4일간, Sunderland<sup>14)</sup>가 7°C 12일간, Rashid와 Reinert<sup>12)</sup>가 10°C에서 8~14일간 저온 처리시에 유식물 출현율이 높았다는 보고와 비슷한 경향이다. 따라서 본 시험의 결과로 볼 때 5°C의 4일 및 6일 처리는 다른 처리구에 비하여 유식물 출현율 및 약당 평균 유식물 수가 많아 꽃봉오리의 저온처리 온도 및 기간으로 적합하다고 생각된다.

## 결 론

황색종 연초품종 NC2326의 생육 환경조건 및 꽃봉오리의 저온처리가 약배양시 반수체 출현빈도에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다.

모식물(NC2326)의 생육환경조건에 따른 반수체 출현빈도는 30°C에 재배하였을 때 18°C나 25°C로 처리했을 때보다 높게 나타났으며, 26-22-18°C에서 가장 낮았다. 모식물을 무비구에서 재배할 때는 시비구에 비하여 반수체의 출현빈도가 높았다. 약배양시 반수체의 출현빈도를 높이기 위하여 꽃봉오리를 5°C, 7°C, 10°C에 각각 2~10일간 처리하였던 바 5°C에 4 및 6일간 처리구에서 반수체 출현빈도가 가장 높았다.

## 참 고 문 헌

1. Bajaj, Y.P.S. Indian J. Exp. Biol., 16 : 407~409 (1978)
2. Bourgin, J.P., and J.P. Nitsch Ann. physiol. Veg., 9 : 377~382. (1967)
3. Dunwell, J.M. Environmental and Experimental Botany, 16 : 109~118. (1976)
4. Dunwell, J.M., and E. Perry. John Innes Inse. Rept., No. 64 : 69~70. (1973)
5. Engvild, K.C. Hereditas, 76 : 320~322. (1974)
6. Heberle - Bors, E., and J. Reinert : A reliable and efficient system
7. Horner, M., and R.L. Mott Planta, 147 : 156~158. (1979)
8. Kasperbauer, M. J., and G.B. Collins Crop Sci., 14 : 305~307. (1974)
9. Nakamura, A., T. Yamada, N. Kadotani, R. Itagaki, and M. Oka SABRAO J., 6(2) : 107~131. (1974)
10. Nitsch, C. La culture de pollen isole sur milieu synthetique. C.R. Acad. Sci., Paris, 278 : 1031~1034. (1974)
11. Primo - Miller E. and N. Sunderland John Innes Ann. Rept., No. 66 : 233~235. (1976)
12. Rashid, A., and J. Reinert Protoplasma, 105 : 161~161. (1980)

13. Robert A. Morrison and David A. Evans Bio  
/Technology Vol 6 : 684~690. (1988)
14. Sunderland, N. : Strategies in the improvement  
of yields in anther culture. In : Proceedings  
of symposium on plant tissue culture, peking,  
Peking Science Press, (1978) pp.65~86.
15. Sunderland, N., and M. Roberts Ann. Bot., 2  
2 : 213~226. (1979)
16. Taguchi, T., and M. Mii Japan. J. Breed., 32  
(4) : 303~310. (1982)
17. Tomes, D.T., G.B. Collins Crop Sci., 16 : 837  
~840. (1976)