

작약의 화분배양에 의한 캘러스 및 배발생

김영숙* · 이병기
전북대학교 원예학과

Callus Induction and Embryogenesis Through Pollen Culture in *Paeonia albiflora* PALL.

Young Sook KIM* and Byung Ki LEE

Department of Horticulture, Chonbuk National University, Chonju 560-756. *Corresponding author.

In order to induce haploid plant through pollen culture, pollens of *Paeonia albiflora* were cultured on MS liquid medium. The development of microspore through pollen culture was examined. The effect of low temperature (5°C, 10 days) pretreatment on callus induction and embryogenesis in pollen culture was not evident. Calli derived from pollen gave rise to globular embryos when transferred onto solid medium containing 0.5 mg/L 2,4-D. The effect of low temperature pretreatment and medium combination to pollen viability was unrecognized. Pollen viability was reduced as the culture proceeded.

Key words: microspore, pollen viability

반수체 식물을 유기하는데 있어서 기내에서는 일반적으로 약을 배양하는 방법이 보편화되어 있으나 화분배양을 하면 약벽조직으로부터의 기관분화를 배제하고 반수체 식물의 발생과정이 단세포인 소포자로부터 관찰할 수 있으며 약배양에서 우려되는 약벽조직이나 퇴화약으로부터 나오는 분화억제물질을 제거할 수 있다는 등의 장점이 있다. 이러한 장점이 있음에도 불구하고 화분배양을 통한 반수체 식물을 유기하는 것은 용이한 일이나 반수체 식물이 획득한 것도 일부식물에 국한 되어있고 약배양보다 그 효율이 저조한 것으로 나타나 있다.

피지식물에서 Kameya와 Hinata(1970)가 *Brassica oleracea* 와 *B. oleracea* × *B. alboglabra*의 성숙화분을 배양하여 세포 덩어리(cell cluster)를 얻었다는 최초의 보고에 이어서 화분 배양을 위한 여러 가지 방법이 연구되어왔다. 최근에는 flow cytometry의 이용으로 소포자를 선별하여 소포자의 배발생을 높이거나(Pechan et al., 1989) 약을 전배양하여 소포자로부터 배의 생산이나 식물재생이 이뤄지고 있다(Pescitelli et al., 1989). 또한 유채(Chuong and Beversdorf, 1985)에서는 32°C로 3일 배양 후 25°C에서 배양하는 변온처리에 의해서 높은 빈도의 배발생 및 정상적인 배의 유도에 대하여 보고

한 바 있다. 본 연구는 작약의 약배양에 의한 반수체 식물의 획득에 이어서 화분배양에 의한 반수체 식물을 유기시킬 목적으로 실행했던 바 그 결과를 보고하고자 한다

재료 및 방법

공시재료

재료는 전북대학교 원예학과 화훼실습포장에서 재배하고 있는 작약(*Paeonia albiflora* PALL.)을 사용하였다.

배양약의 구분

배양에 적합한 약의 발육정도를 선정하기 위하여 화뢰를 크기별로 분류하여 약을 적출한 후 2% propiono carmine으로 염색하여 화분의 발육정도를 조사하였으며 공시약은 후기 1핵기에서 초기 2핵기에 해당되는 약을 사용하였다.

화뢰의 저온전처리

화뢰의 저온전처리는 화경 5-10 cm를 붙여 물이담긴 비이커에 꽂고 건조방지를 위해 parafilm으로 봉한 후 aluminium foil로 포장하여 5°C로 조절된 냉장고에 10일간 처리하였다.

화분의 적출 및 치상

화뢰를 70% alcohol에 수초간 침지 후 7% calcium hypochlorite 수용액에 10분간 침지하고 멸균수로 4-5회 수세한 후 약을 적출하여 비이커에 넣고 주사봉으로 가볍게 문지르고 배양액을 채운다음 40 µm mesh로 여과하였다. 여과한 액을 100 g로 3분간씩 3회 원심분리하여 상등액을 버리고 세정된 화분을 분리시켰다. 분리된 화분에 배지를 첨가시켜 피펫으로 뽑아 haemocytometer로 소포자밀도를 계산하여 직경이 5.5 cm크기의 petridish에 2.5 mL의 배양액을 채운 다음 처리 당 8-10개씩 치상하였다.

배지조성

배지는 MS(Murashige and Skoog, 1962)의 기본배지에 NAA, BA 및 TDZ을 Table 2와 같이 조성하였으며 30 g/L의 sucrose를 첨가하여 pH를 5.8로 조정한 후 121°C의 고압증기멸균기에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

배양 및 관찰

배양조건은 25 ± 2°C가 유지되는 진탕배양기에서 60 rpm으로 암배양하였고 배양중 소포자의 변화는 propiono carmine으로 염색하여 관찰하였으며 배지 및 저온처리에 따른 배양기간중의 생존율의 변화는 Evans' blue염색액을 떨어뜨려 조사하였다.

결과 및 고찰

배양중 소포자의 변화

1핵기에서 초기 2핵기의 화분을 치상하여 배양중 화분의 변화를 관찰했던 바 배양된 소포자는 크기가 크고 세포질이 풍부한 정상화분과 세포질이 없거나 덜 차있고 크기가 비교적 작은 이상화분으로 혼재되어 있었다. 배양 1주일경 이들 중 일부가 반응을 보여 화분이 팽대해지면서 첫번째 세포분열을 한 2세포성 화분이 관찰되었는데(Figure 3A) 이것은 핵분열에 이어서 세포질분열이 이루어진 상태이며 배양기간이 경과됨에 따라 소포자는 비교적 완만한 반응을 보였다 (Table 1).

2세포성의 화분은 하나의 핵만이 다시 분열하여 3핵성화

분이 된 후에 세포질분열로 인한 3세포성의 화분과(Figure 3B), 2개의 핵이 공동분열한 후 세포질이 분열하여 4세포성이 된 소포자도 관찰되었다(Figure 3C). 그러나 핵분열 후 세포질분열이 뒤따르지 못해서 3핵 및 4핵의 유리핵으로된 소포자도 있었으며 여러차례의 핵분열에 의해 다핵의 화분이 형성되기도 하여(Figure 3D) 배양 90일경에는 500립의 화분당 온도처리를 하지않은 무처리와 5°C로 10일간 저온처리한 구에서 각각 4개와 9개의 다핵화분이 관찰되었는데 이러한 다핵체로된 화분이 나중에 세포질분열이 일어나 다세포체가 되어 화분벽을 뚫고나와 구형의 원배(Figure 3E) 및 캘러스 (Figure 3H)가 된 것으로 사료되었으며 구형의 원배는 심장형 및 어뢰형으로 발달되었다(Figure 3I, J).

또한, 소포자가 커짐에 따라 액포가 생기면서 세포질은 말단방향에 농후하게 편재되어있고 말단세포의 핵분열에 의해 기부는 배병모양을 갖추게 된것도 생겨났다(Figure 3F, G). 이는 피자식물의 수정난에서 첫번째 분열에 의해 생긴 두 세포가 기능상 차이가 생겨 이중 한 세포는 계속분열하여 배로 발달되고 다른 한세포는 분열하거나 혹은 분열하지 않은 채 배병으로 발달된다(Kim, 1992)는 경우와 흡사했다.

한편, 화분의 첫번째 핵분열로 영양핵과 생식핵이 생긴 후 생식핵의 2차분열에 의해 정상적인 응성배우체가 되고 이 응성배우체가 이동되어 화분관이 신장된 모습도 일부 관찰되었는데 이것은 치상한 소포자가 후기 2핵기의 화분이 포함되어 자연상태에서처럼 영양핵은 소멸되어가고 생

Table 1. Effect of low temperature pretreatment on the number of embryogenic pollen grains through pollen cultures of *Paeonia albiflora*.

Treatment	Days of culture	Type of pollen grains ^{a,b}								
		N	2N	3N	PN	2C	MC	DE	GP	PT
Control	30	1102 (22.0)	3148 (63.0)	56 (1.1)	1.1 (0.2)	20 (0.4)	1.9 (0.4)	60.1 (12.0)	26 (0.5)	1.7 (0.3)
	60	94.1 (18.8)	317.8 (63.6)	87.6 (15)	43.8 (0.8)	4.5 (0.9)	5.1 (1.0)	58.9 (11.8)	5.2 (1.04)	3.0 (0.6)
	90	91.2 (18.2)	305.4 (61.1)	88 (1.8)	4.1 (0.8)	3.8 (0.8)	4.9 (1.0)	69.1 (13.8)	8.9 (1.8)	3.8 (0.8)
5°C 10 days	30	96.8 (19.5)	326.4 (65.3)	7.1 (1.4)	1.2 (0.2)	3.1 (0.6)	1.2 (0.2)	59.0 (11.8)	3.8 (0.8)	1.4 (0.3)
	60	84.7 (16.9)	316.5 (63.3)	10.1 (2.0)	4.2 (0.8)	5.8 (1.2)	4.3 (0.9)	66.7 (13.4)	5.7 (1.1)	2.0 (0.4)
	90	71.8 (14.5)	312.7 (62.5)	11.6 (2.3)	8.9 (1.8)	7.1 (1.4)	5.8 (1.2)	68.9 (13.8)	11.1 (2.2)	2.1 (0.4)

^aN: one nucleus, 2N: two nuclei, 3N: three nuclei, PN: poly nuclei, 2C: 2 celled pollen, MC: multicelled pollen, DE: degenerated pollen, GP: giant pollen, PT: pollen with a germinating tube.

^bFive hundred grains per petridish were scored and number in paranthesis indicates percentage to the number of investigated pollens.

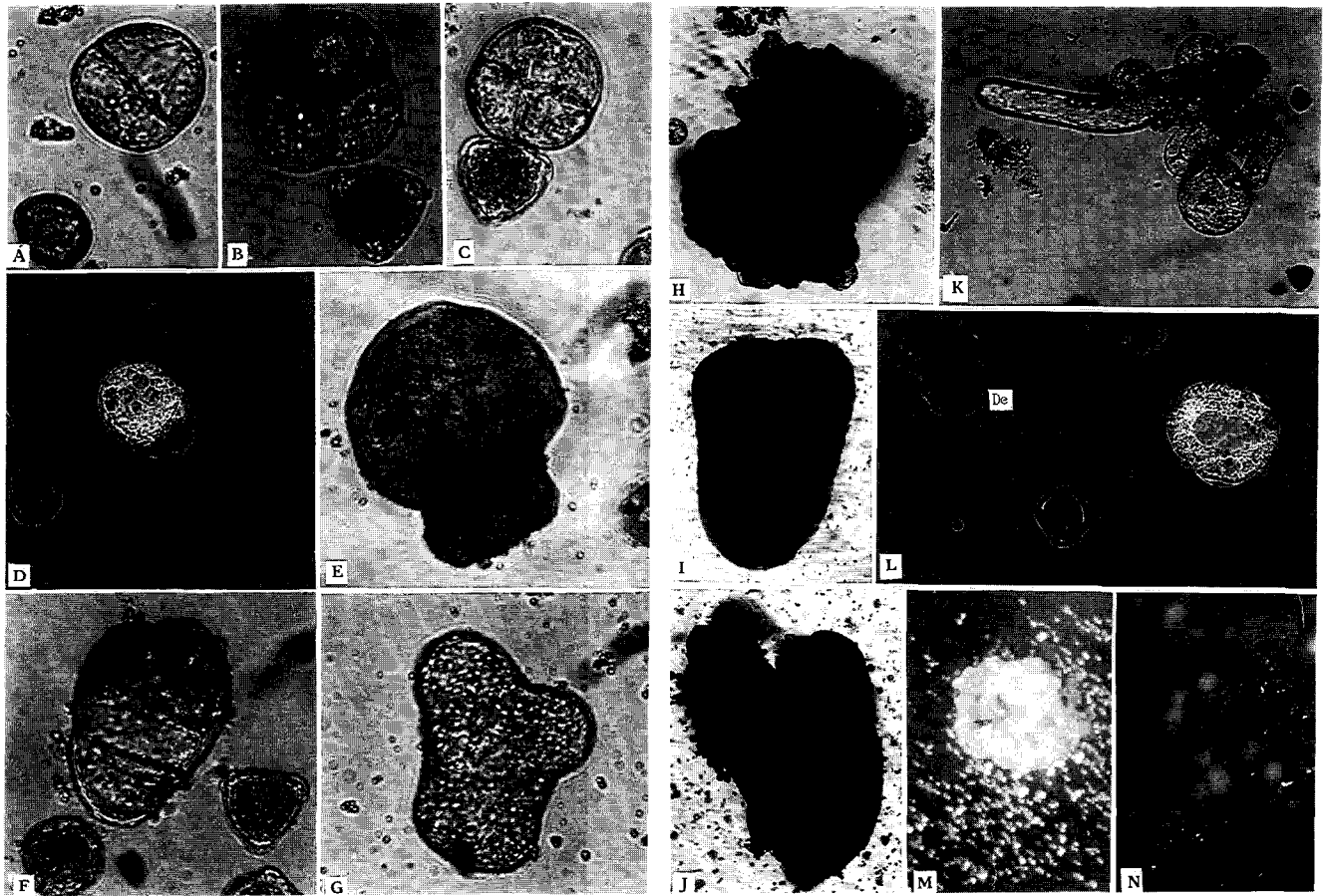


Figure 3. Development of microspore through pollen culture in *Paeonia albiflora*
 A: Two-celled pollen grain showing first cell division after 7 days in culture, B: Three-celled pollen grain, C: Four-celled pollen grain, D: Multinucleate pollen grain, E: Pollen embryo showing globular shape after 100 days in culture, F,G: Pollen embryo with structure like suspensor, H: Callus induced after 90 days in culture, I: Embryo showing heart shape after 120 days in culture, J: Embryo showing torpedo shape after 120 days in culture, K: Embryogenic cell of round shape and non-embryogenic cell of elongated shape, L: Surviving pollen showing nuclear division (arrow) and dead pollen (De), M: Callus growing on solid medium in subculture, N: Embryo (E) formed on solid medium in subculture.

식핵의 분열에 의해서 응성배우체로의 역할을 하기위해 화분관이 신장된 것으로 사료된다.

배양 60일경 세포집괴(cell aggregate)의 모습도 다수 보였는데 비배발생캘러스(Non-embryogenic callus: NEC)의 특징을 나타내는 막대모양의 세포와 배발생 캘러스(Embryogenic callus: EC)의 특징을 보이는 구형의 세포들이 aggregate된 모습도 관찰되었다(Figure 3K). 이러한 캘러스는 황 등(1992)이 벼의 배배양에 의해 유기된 캘러스에서 EC와 NEC를 분리하여 형태 및 생화학적인 특성을 조사한 결과와 비슷한 모양이었다.

캘러스 및 배발생

MS기본배지에 식물 성장조절제를 첨가하지 않은 배지와 NAA, BA 및 TDZ를 상호조합한 배지에 온도처리를 하지

Table 2. Effects of growth regulators and low temperature pretreatment on the formation of callus and embryo through pollen cultures of *paeonia albiflora* after 120 days in culture.^{a, b, c}

Medium No.	Growth regulators(mg/L)			No. of petridish inoculated	Control 5°C /10 days			
	NAA	BA	TDZ		C ^b	E	C	E
A	-	-	-	8	-	0	+	1
B	0.2	0.5	-	10	+	1	+	2
C	0.2	-	0.002	9	++	0	++	1

^a -: no response, +: slight, ++: moderate.

^b C: induced callus, E: No. of produced embryo.

^c Four × 10⁴/ml grains per petridish were cultured.

않은 화분과 5°C에서 10일간 저온처리한 화분을 치상하여 배양 100일 후에 캘러스 유기 및 배발생을 조사한 결과

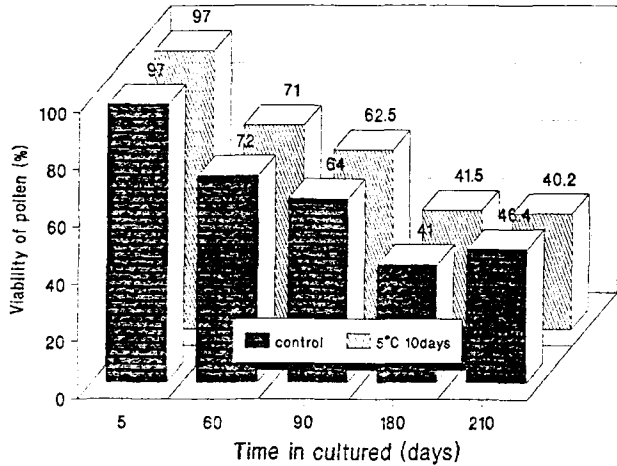


Figure 1. Viability of pollen to temperature pretreatment in pollen Cultures of *Paeonia albiflora*

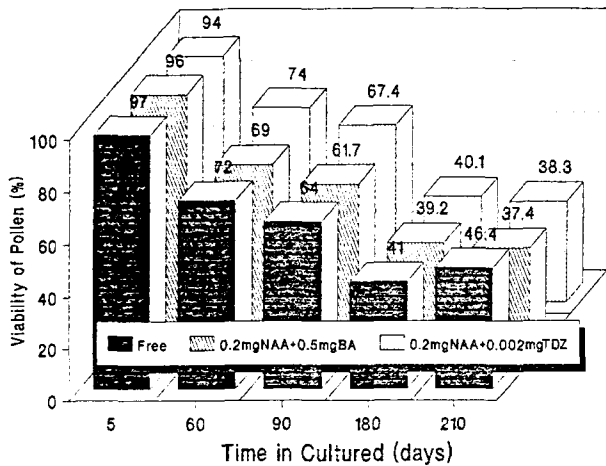


Figure 2. Viability of pollen to medium combination in pollen Cultures of *Paeonia albiflora*

는 Table 2와 같다.

NAA와 TDZ를 첨가한 배지에서는 온도처리를 하지않은 구와 5°C로 10일간 저온처리한 구 공히 캘러스의 발생빈도가 양호했는데 본인 등이 실험한 작약의 약배양(Lee et al., 1992)에서 처럼 화분배양에서도 NAA에 TDZ를 조합했을 때 캘러스분화가 비교적 양호하였다. 또한 세 종류의 배지에서 모두 온도처리를 하지않은 구 보다는 5°C로 10일간 저온처리 했을 때 캘러스유기 및 배발생이 더 되어서 약배양의 저온처리 효과와 마찬가지로 화분배양에서도 저온 처리의 효과가 약간은 인정되었으며 유기된 캘러스를 MS기본배지에 2,4-D 0.5 mg/L를 첨가한 고체배지에 이식한 결과 일부는 더 이상 캘러스가 성장하지않고 갈변되었으나 일부는 비교적 완만한 성장을 보이는 노랑색의 캘러스와 (Figure 3M) 구형의 배(Figure 3N)도 관찰되어졌다.

화분배양에 미치는 요인은 대체로 약배양에서와 비슷한

것으로 알려져 있으며 화분배양의 효율을 높이기위한 방법의 일환으로 약의 전배양 및 온도처리를 한 보고가 많다.

전배양을 한 예로, Wei(1982)는 밀의 약을 4-8일간 액체배지에 배양한 shed pollen이 캘러스를 형성하였으며 화분배양이 약배양보다 6배나 많은 캘러스를 형성했다고 하였다.

Pescitelli 등(1990)은 옥수수의 소포자 배양에서 배양 후 처음 4일동안 15°C로 온도를 감소시키는것은 소포자활력을 개선시키고 ELS(embryo-like structure)도 2배 정도 증가시킨다고 하여 저온처리가 효과가 있음을 보고하였고 양배추(Sato 등, 1989)의 소포자배양 시 변온처리가 캘러스 및 배의 유기에 효과가 있다고 하였다. 또한 방 등(1991)은 저온 성장상에서 녹체 저온 춘화처리한 유체의 소포자배양에서 유기된 배상체에 4°C로 10일간 저온처리했을 때 식물체 분화율이 가장 효과적이라고 하여 저온처리 효과를 인정하였다.

본 실험에서 작약의 화분배양을 한 경우 캘러스유기 및 배발생에 저온처리의 효과가 약간은 있었으나 약배양의 효과에는 미치지 못하여 유기된 캘러스 및 배에서의 기관재분화가 이루어지지 못하였는데 Wei(1982)가 화분배양에 의해 생긴 캘러스는 약배양에 의해 생긴 캘러스보다 재분화율이 낮다고 한 보고에서와 같이 재분화가 어려운점으로 볼때 화분배양에 관한 배양조건 등의 제요인에대하여 구명이 필요하다고 생각되었다.

배양기간에 따른 화분의 생존력 변화

배지 및 저온 전처리에 따른 배양기간 동안의 화분의 생존력이 배발생적인 화분의 발달에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Evans' blue 염색액을 떨어뜨려 화분의 생존력을 조사한 결과 살아 있는 화분은 핵분열이 진행되고 크기가 커진 모양으로 염색이 되지않는 반면 죽은 화분은 크기가 변하지않은 채 길게 염색이 되었다(Figure 3K).

식물생장조절제를 첨가하지 않은 배지에 온도처리를 하지않은 약과 5°C로 10일간 저온처리한 약에서 화분을 적출하여 치상한 결과(Figure 1) 온도처리에 따른 큰 차이는 나타나지 않았지만 저온처리구에서 생존율이 약간 상회하며 캘러스발생율도 더 나은 것으로 보아서 생존하고 있는 화분수가 많을수록 캘러스의 발생빈도가 많을것으로 추측되었다.

한편, 식물생장조절제를 첨가하지않은 배지와 NAA, BA 및 TDZ를 상호조합한 배지에 온도처리를 하지않은 약에서 화분을 적출, 치상하여 살아있는 화분수를 조사한 결과(Figure 2) 배지간에 생존력의 큰 차이는 없었다. 배양 60일째는 69-74%의 생존력을 보였으며 배양 90일 까지도 살아있는 화분의 수는 60일째와 비교해서 큰 감소는 보이지 않았다. 그러나 180일째는 생존력이 현저하게 저하되기 시작하여 배양 210일경에는 37.4-46.4%로 절반이상의 화분이 죽

어가고 있었는데 배양 120일 이후에는 캘러스 및 배발생이 관찰 되지않았던 점으로 미루어 배양 120일을 전후해서 배지상태를 다르게 해서 화분의 생존력 감소를 줄이는 것이 캘러스 및 배발생에 양호한 효과를 가져올 것으로 사료된다.

적 요

작약의 화분배양에 의한 반수체 식물을 유기시킬 목적으로 화분배양을 실시하여 배양중 소포자의 변화를 관찰하고 캘러스 및 배발생에 미치는 저온전처리(5°C/10 days)의 효과와 배양화분의 생존율을 조사하였다. 작약의 화분배양 시 캘러스 및 배발생에는 저온전처리의 효과가 다소 인정되었으나 약배양의 효과에는 미치지 못하였다. 유기된 캘러스를 2,4-D 0.5 mg/L를 첨가한 고체배지에 이식했을 때 구형배가 형성되었다. 화분의 생존율에는 저온전처리 및 배지조성간의 영향이 미치지 않았으며 배양기간이 지남에 따라 화분의 생존율도 저하되었다.

인 용 문 헌

- Bang JK, Lee JI, Laima SK (1991) Embryogenesis and plant regeneration in rapeseed microspore culture. Korean J Breed 23: 257-262
- Chuang PV, Beversdorf WD (1985) High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *B. carinata* Braun. Plant Science 39: 219-226
- Hwang SJ, Min YJ, Ha GS, Han TJ, Kim JC, Ahn BJ, Hwang B (1992) Biochemical characteristics of embryogenic and nonembryogenic cells in rice (*Oryza sativa* L.). Korean J Plant Tissue culture 19: 197-203
- Kameya T, Hinata K (1970) Induction of haploid plant from pollen grains of Brassica. Jpn J Breed 20: 82-87
- Kim, M. Z (1992) Development of microspores during anther culture of *Brassica napus* L. Korean J Plant Tissue Culture 19: 295-303
- Lee BK, Ko JA, Kim YS (1992) Studies on the thidiazuron treatment of anther culture *Paeoni albiflora*. J Kor Soc Hort Sci 33: 384-395
- Pechan PM, Keller WA, Mandy F, Bergeron M (1988) Selection of *Brassica napus* L. embryogenic microspores by flow sorting. Plant Cell Report 7: 396-398
- Pescitelli SM, Johnson CD, Petolino JF (1990) Isolated microspore culture of maize: Effects of isolation technique, reduced temperature, and sucrose level. Plant Cell Report 8: 628-631
- Pescitelli SM, Mitchell JC, Jones AM, Pareddy DR, Potoline JF (1989) High frequency and regeneration from isolated microspore of maize. Plant Cell Report 7: 673-676
- Sato T, Nishio T, Hirai M (1989) Plant regeneration from isolated microspore culture of Chinese cabbage (*Brassica Campestris* spp. Pekinensis). Plant Cell Report 8: 486-488
- Wei ZM (1982) Pollen callus culture in *Triticum aestivum*. Theor Appl Genet 63: 71-73

(1994년 12월 15일 접수)