

芍藥(*Paeonia lactiflora* Pall.)의 子葉組織 培養시 식물생장조절제가 體細胞胚發生에 미치는 影響

신중희* · 손재근¹ · 김경민¹ · 김기재 · 김재철
경북농촌진흥원 의성약초시험장, ¹경북대학교 농학과

Effect of Plant Growth Regulators on Somatic Embryogenesis from Cotyledon of Herbaceous Peony (*Paeonia lactiflora* Pall.)

SHIN, Jong Hee* · SOHN, Jae Keun¹ · KIM, Kyung Min¹ · KIM, Ki Jae · KIM, Jae Chul

Euiseong medicinal plant experiment Station, Kyungpook Provincial Rural Development Administration, Kyungpook, 769-800,
Korea; and ¹Department of Agronomy, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea. *Corresponding author.

This experiments were carried out to determine the optimum concentrations of plant growth regulators for the direct embryogenesis from the cotyledon culture of *Paeonia lactiflora* Pall. Zygotic embryos rescued from true seeds were developed abnormally in the medium containing ABA. But somatic embryogenesis from cotyledons of abnormal seedlings was induced more effectively. Also the somatic embryogenesis from cotyledons was promoted in the medium containing ABA. The frequency of embryogenesis was maximum(59.9%) from the cotyledons cultured on MS medium containing 0.5 mg/L ABA on which the frequency of somatic embryos with two cotyledons was 22.6%.

Key words: somatic embryogenesis, plant growth regulator, cotyledon culture, abscisic acid

일반 재배농가에서 芍藥의 번식은 주로 노두를 이용한 영양번식에 의존하고 있는데(Shin et al., 1996), 번식체의 양이 적어 일정수준의 묘를 확보하는데 오랜기간이 소요된다. 종자의 결실 또한 주로 타식에 의해 이루어지므로 실생묘의 경우 유전적으로 균일하지 못하다는 단점이 있다(Chung et al., 1994; Chung et al., 1995). 따라서 교배육종에서 얻어진 우수한 형질의 묘를 일정수준 확보하는데 오랜 기간이 소요된다. 그러므로 가급적 조기에 묘를 얻고, 이와 유전적으로 균일한 묘를 단기간에 확보할 수 있는 방법의 개발이 필요하다. 芍藥 실생묘의 조기확보를 위해서 종자의 배를 기내배양 함으로써 종자가 가지는 휴면을 타파하여 발아기간을 단축하고 발아율을 높였다는 연구 결과가 국내외에서 보고되었다(Meyer, 1976; Shin et al., 1996). 조직배양을 통한 대량증식면에서는 작약 冬芽의 정아 및 액아를 이용하거나 화사조직을 이용하여 GA₃, BAP, zeatin, 2,4-D 등의 식물생장조절제의 첨가로 배양 효율을 높였다는 연구결과가 보고된 바 있다(Hosoki et al., 1989; Chung et al., 1995).

지금까지 여러 영양번식 식물에서 체세포배 발생에 대한 연구가 이루어져 왔으며 (Kim and De Hertogh, 1997; Kim

and Kang, 1992; Termignoni et al., 1996; Zheng et al., 1996). 芍藥의 기내증식면에서 증식의 폭을 높이기 위해 배양 조직에서 캘러스를 유도하고 그 캘러스로부터 다수의 배를 발생시키는 연구들이 수행되어져 왔는데, 캘러스로부터 배 발생률을 높이기 위한 배양배지 조성이나 배양환경에 관한 연구가 보고되었다(Harn, 1987). 한편 배발생의 촉진을 위한 캘러스 형성 조건의 중요성에 관한 연구도 이루어져 왔다(Bhojwani and Bhatnagar, 1974). 芍藥의 경우도 화사조직 배양에서 배발생 가능성이 높은 캘러스 형성을 위한 적합한 배지조성(Chung, 1995)과 芍藥의 체세포조직으로부터 캘러스 단계를 거치지 않고 직접 배를 발생시킨 연구결과가 발표된 바(Shin, 1997) 있지만 자엽조직을 이용한 체세포배 발생에 적합한 식물생장 조절제의 농도 등에 대한 기초 연구는 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 芍藥의 자엽조직으로부터 체세포배 발생율을 향상시키기 위하여 체세포배발생에 유리한 식물생장조절제의 조성을 구명하고, 여러 가지 농도의 식물생장조절제가 첨가된 배지에서 배양된 체세포조직으로부터 배발생 정도와 형태가 접합자 배와 동일한 정상배 발생 빈

도를 조사하였다.

재료 및 방법

본 실험은 경북 농촌진흥원 의성작약시험장 포장에 재배되고 있는芍藥 수집종(*Paeonia lactiflora* Pall.)들의 성숙종자를 이용하였다. 배양재료로 사용할 자엽을 얻기 위하여 종피를 제거한芍藥 종자를 70% 에탄올에 30초, 1% NaOCl에 10분간 흔들어 소독한 후 멸균된 증류수로 3~4회 세척한 종자에서 절취한 배를 식물생장조절제가 첨가되지 않은 MS (Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에 30일간 2000 Lux 밝기의 광조건에서 명배양하여 싹발아를 획득하였다.

자엽배양 배지내의 식물생장조절제의 조성이 자엽으로부터 체세포배 발생에 미치는 영향을 알아보기 위해 종자에서 분리된 배를 식물생장조절제가 첨가되지 않은 MS배지에 30일간 배양하여 얻어진 유묘의 자엽을 0.5~1.0 mg/L BA, 0.1~4.0 mg/L ABA와 0.5 mg/L의 NAA가 첨가된 MS 배지에서 90일간 배양 후 식물생장조절제 처리별 배발생 정도를 조사하였다. 접합자배 배양과 자엽배양의 전과정에 걸친 ABA의 첨가가 자엽으로부터 체세포배 발생에 미치는 영향을 알아보고자 접합자배배양 배지내의 ABA 농도를 0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L로 하고 자엽배양 배지의 ABA 농도는 0~4.0 mg/L로 처리하여 전 실험과 동일한 조건에서 배양하여 체세포배 발생 정도를 조사하였으며, 체세포배 획득에 효과적인 접합자배 배양 배지와 자엽배양 배지의 ABA 농도를 구명하였다. 접합자배로부터 얻어진 자엽을 ABA가 0.5 mg/L 첨가된 MS기본배지에 30일간 배양 후 자엽으로부터 형성된 체세포배의 형태적 특징을 비교하였다.

결과 및 고찰

자엽배양 배지내 식물생장조절제 처리가 자엽으로부터 체세포배 발생에 미치는 영향을 조사한 결과(Table 1), BA와 NAA 단용구에서는 체세포배 발생율이 10% 이하로 매우 낮았으나 ABA 단용 배지에서는 체세포배 발생율이 크게 증가되었는데 특히 0.5 mg/L의 ABA 첨가구에서는 최대 59.9%의 높은 체세포배 발생율을 나타내었다. Ammirato (1989), Kamada와 Harada (1979)는 당근의 세포배양시 체세포배의 발생을 향상시키기 위해 배분화 전반기간 ABA를 처리하는 방법을 사용하였으며, ABA의 처리가 접합자배의 구조와 같은 정상적인 체세포배의 발생에 효과적이었다고 보고한 바 있다.

자엽배양에서와 동일하게 접합자 배배양 배지내 ABA의 첨가가 체세포배 발생의 효율을 높였는데 자엽으로부터 체세포배 발생에 적합한 배배양 배지와 자엽배양배지의 ABA

Table 1. Effects of plant growth regulators on somatic embryogenesis from cotyledons of herbaceous peony.

Plant growth regulators (mg/L)	No. of cotyledons ^a cultured (ea)	Cotyledons developed somatic embryos (%)
Control	184	27.2
NAA 0.5	70	1.4
BA 0.5	90	3.3
1.0	90	5.6
ABA 0.1	30	28.7
0.5	312	59.9
1.0	30	50.0
2.0	30	46.4
4.0	30	33.3

^a: Peony cotyledons were excised from zygotic embryos cultured on MS medium for 30 days. The cotyledons were cultured on MS medium for 90 days.

Table 2. Effects of ABA concentrations on somatic embryogenesis from cotyledons of herbaceous peony.

ABA (mg/L) in		No. of cotyledons ^a cultured (ea)	Percent of cotyledons developed somatic embryos (%)
zygotic embryo culture medium	cotyledon culture medium		
0.0	0.0	184	27.2
	2.0	30	46.7
	4.0	30	33.3
0.5	0.0	40	20.0
	2.0	30	33.3
	4.0	30	36.7
1.0	0.0	50	32.0
	2.0	40	47.5
	4.0	30	26.7
2.0	0.0	41	40.0
	2.0	48	54.2
	4.0	54	40.7

^a: Peony cotyledons were excised from zygotic embryos cultured on MS medium for 30 days. The cotyledons were cultured on MS medium for 90 days.

농도는 Table 2에 나타난 바와 같이 1.0 ~2.0 mg/L의 ABA가 첨가된 MS기본배지에서 배배양하여 얻는 유묘의 자엽을 ABA가 2 mg/L 첨가된 배지에 배양할 경우 배발생율이 47.5% 이상으로 높게 나타났다.

Sohn 등(1995)은 작약 약배양에서 캘러스로부터 형성된 배와 약에서 직접발생한 배와의 형태적 특징을 비교하고 이들 배의 형태별로 유식물 분화양상을 조사하였는데, 자엽이 2개인 배는 대부분 정상적인 식물체로 발육되는 반면에 자엽이 1,3개 및 4개인 비정상적인 배가 정상식물로 발달하

Table 3. Morphological variation of somatic embryos formed from excised cotyledon of herbaceous peony.

No. of cotyledons ² cultured (ea)	cotyledons developed somatic embryos (%)	No. of total embryos (ea)	cotyledonary variation ¹ of somatic embryo				
			one (%)	two (%)	three (%)	globular (%)	bowling-pin and horn shape (%)
312	59.9	909	9.8	22.6	19.3	47.0	1.3

¹: Peony cotyledons were excised from zygotic embryos cultured on MS medium for 30 days. The cotyledons were cultured on MS medium containing 0.5mg/L ABA for 90 days.

²: "globular", "one", "two", "three", "bowling-pin" and "horn shape" indicate cotyledon number and shape of somatic embryos derived from zygotic embryo cotyledon.

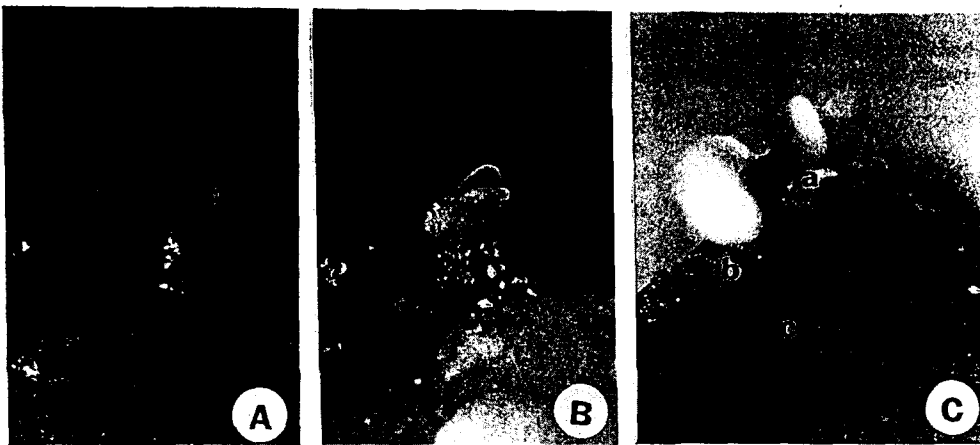


Figure 1. Morphological variation of somatic embryos formed excised cotyledon of peony.

A: one cotyledonary embryos. B: normal embryo with two cotyledons. C: three cotyledonary embryo(a), globular(b) and bowline-pin shape embryo(c).

는 효율은 4~9%에 불과하였고, 특히 볼링핀 또는 나팔모양의 배는 전혀 정상적인 식물체로 발달하지 못하였다고 보고하고 있다. 작약 접합자배의 자엽조직을 ABA를 첨가한 배지에서 90일간 배양할 경우 발생된 체세포배의 형태는 Table 3에서와 같이 미분화된 구형배로부터 자엽이 한 개에서 세 개까지 가진 배와 볼링핀 혹은 나팔모양의 비정상적인 배 등 다양한 모양으로 발달되었는데 (Figure 1), 구형배 다음으로 2개의 자엽을 가진 정상적인 체세포배의 출현빈도가 22.6%, 3개의 자엽을 가진 체세포배가 19.3%로 높게 나타났으며, 그 형태가 볼링핀 또는 나팔모양인 비정상적인 배의 빈도는 1.3%로 낮게 나타났다.

ABA가 첨가된 배지에서 체세포배 발생율이 높았으며, 특히 ABA가 0.5 mg/L 첨가된 배지에서 59.9%의 높은 체세포배 발생율을 나타내었다. ABA가 첨가된 배지에서 접합자배를 배양할 경우 발아가 저해되고 발아한 식물체가 비정상적인 형태로 발달하는 현상이 나타났으나 이들 비정상적인 형태의 자엽으로부터 체세포배 발생이 효과적이었으며, ABA가 0.5 mg/L 첨가된 배지에서 자엽으로부터 발생된 체세포배의 형태는 2개의 자엽을 갖는 정상체세포배가 22.6%, 3개 19.3%, 1개 9.8%로 나타났으며 볼링핀 또는 나팔모양의 비정상적인 배는 1.3%로 낮게 나타났다.

적 요

芍藥의 종자로부터 절취한 배를 기내 발아시켜 획득한 자엽조직으로부터 체세포배발생에 적합한 배지내의 식물생장조절제 조성을 밝히기 위하여 전배양배지와 배유도배지의 식물생장조절제 조성별 체세포배 발생율과 접합자배의 구조와 동일한 정상 체세포배 발생 정도를 조사한 결과를 요약하면 다음과 같다.

자엽으로부터 체세포배발생을 위한 식물생장조절제로

인용문헌

- Amirato PV (1989) Recent progress in somatic embryogenesis Newsletter, International Association for Plant Tissue Culture 57: 2-16
- Bhojwani SS, Bhatnagar SP (1978) Polyembryony. The embryology of Angiosperms, Ed 3, VIKAS PUBLISHING HOUSE PUT LTD, New Delhi, pp 183-196
- Chung JD, Choi BS, Shon JK, Suh BB, Chung MS, Lee IG (1994) Classification and varietal improvement of herbaceous peony (*Paeonia* spp.). Rural Development Administration, Suweon pp 1-212

- Chung JD, Harn JS, Jee SO (1995) In vitro propagation of *Paeonia lactiflora* Pall. through shoot-tip culture of winter buds. Korean J Plant Tissue Culture 22: 101-104
- Chung JD, Harn JS, Sohn JK (1995) Somatic embryogenesis from filament-derived callus of *Paeonia lactiflora* Pall. Korean J Plant Tissue Culture 22: 47-51
- Harn C (1987) Somatic embryogenesis and its use in the plant breeding. The Korean Society of Plant Tissue Culture. Suweon
- Hosoki T, Ando M, Kubara T, Hamada M, Itami M (1989) In vitro propagation of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by a longitudinal shoot-split method. Plant Cell Reports 8: 243-246
- Kamada H, Harada H (1979) Studies on the organogenesis in carrot tissue culture. I Effect of amino acids and inorganic nitrogenous compounds on somatic embryogenesis. Z Pflanzen Physiol 91: 453-463
- Kim KW, De Hertogh AA (1997) Tissue culture of ornamental flowering bulbs (geophytes). Horticultural Reviews Vol 18: 87-169
- Kim KW, Kang MS (1992) Somatic embryogenesis and plant regeneration from gladiolus callus *in vitro*. J Kor Soc Hort Sci 33: 87-94
- Meyer JrMM (1976) Culture of *Paeonia* embryos by *in vitro* technique. Amer Peony Soc 217: 32-35
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised media for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15: 473-497
- Shin JH, Sohn JK, Kim JC, Park SD (1996) Effect of GA₃ on seed germination of peony (*Paeonia lactiflora* Pall.). Korean J Plant Tissue Culture 23: 231-234
- Shin JH, Sohn JK, Kim KM, Park SD, Kim KW (1997) Plant regeneration through somatic embryogenesis from cotyledon of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.). Korean J Plant Tissue Culture 24: 291-294
- Sohn JK, Kwon YS, Kim KM (1995) Effect of embryo morphology on plant development in anther cultures of *Paeonia lactiflora* Pall. Korean J Plant Tissue Culture 22: 165-168
- Termignoni RR, Wang PJ, Hu CY (1996) Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 45: 129-132
- Zheng Q, Dessai AP, Prakash CS (1996) Rapid and repetitive plant regeneration in sweet potato via somatic embryogenesis. Plant Cell Reports 15: 381-385

(1997년 12월 31일 접수)