

도라지 (*Platycodon grandiflorum*) 약배양에서 저온처리가 화분 2형현상 및 배형성에 미치는 영향

고정애

전북대학교 원예학과 · 농업과학기술연구소

Effect of Low Temperature Pretreatment on Pollen Dimorphism and Embryo Formation in Anther Culture of *Platycodon grandiflorum*

KO, Jeong Ae

Department of Horticulture, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea
Institute of Agricultural Science & Technology

ABSTRACT In order to investigate the effect of low temperature pretreatment on pollen dimorphism and embryo formation in anther culture of *Platycodon grandiflorum*, the anthers with microspore at the uninucleate stage were cultured on Murashige and Skoog medium supplemented with 0.5 mg/L NAA and 1.0 mg/L BA. The low temperature pretreatment have clear effect on the frequencies of S pollen grains, symmetrical binucleate microspores (B type of S pollen), multinucleate and multicelled pollen grains. Especially, after low temperature pretreatment at 8°C for 5 days increased the frequency of S pollen grain (20.6%) *in vivo*. In addition, the highest frequency of callus induction (54.9%) and embryo formation (9.9%) were obtained from the anther pretreatment at 8°C for 5 days. Three distinct pathways could be recognized in the androgenesis, one involving mainly the vegetative cell, the second starting with the vegetative and the generative cell, respectively, and the third accompanying with two equal vegetative type cells in the pollen grains.

Key words: 8°C pretreatment, multicelled pollen grain, S pollen grain, symmetrical binucleate microspore

서 론

약배양은 반수체 식물을 획득하기 위한 효과적인 방법이나 모식물체의 유전자형 및 생육환경, 배양적기, 배지 및 성장 조절물질의 종류와 농도, 전처리 효과 등 제반요인에 의해 크게 영향을 받는다 (Sunderland and Dunwell 1977). 약배양에 관여하는 화분의 2형현상은 *Tradescantia bracteata*의 성숙화분내에 영양세포와 생식세포로 불균등분열 (A type) 하는 정

상화분과 핵분열에 이상이 생겨 영양 및 생식세포로 구분되지 못하고 균등분열 (B type)하여 마치 두개의 영양세포처럼 보이는 B형화분의 2형현상을 처음으로 발견하였고 (LaCour 1949), Sunderland (1974)는 *Datura innoxia*에서, Ramana (1974)는 *Solanum tuberosum*에서 감수분열 후 세포질의 분배에 이상을 초래하여 정상적인 4분자가 되지 못하고 monad, dyad, triad 등 비정상적인 이상소포자가 형성됨을 관찰하여 비정상적인 것과 정상적인 화분과의 2형현상을 보고한 바 있다. Dale (1975)은 보리의 동일한 약내에서의 정상적으로 발육하는 화분과 나오된 지체화분과의 2형현상을 보고하였다. 그러나 최근에는 화분의 크기 및 acetocarmine, propionocarmine 등과 같은 염색액에 의한 염색정도에 따라

*Corresponding author. Tel 0652-270-2580
E-mail kjam@moak.chonbuk.ac.kr

화분의 2형현상을 구분하고 있는데 정상적인 화분 (N화분)은 크기가 크고 질계 염색되는데 비해 비정상화분은 크기가 작고 세포질량이 적어 담염되는 이상화분 (S 화분)으로 구분 지으며 포괄적으로 정상화분과 대조되는 비정상화분을 이상화분의 범주에 포함시키고 있다 (Harn 1985). 이상화분은 자연 상태에서는 정상적인 배우체로 발달하지 못하기 때문에 쓸모 없는 화분에 불과하지만 배양중에는 오히려 조포체화할 가능성이 있는 배발생적 화분으로서 약배양에 있어서는 대단히 중요하다. 한편 약배양의 효율을 향상시키기 위한 수단으로 배양전 약을 저온에서 처리하는데 이때 저온은 화분내 핵 및 세포질 분열에 이상을 초래하여 비정상적 이상화분이 형성된다. 본 연구에서는 도라지 약배양에 있어서 이상화분 (S 화분)의 발생, 켈러스 및 배형성에 미치는 저온처리 효과와 배양중 소포자의 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

재료는 전북대학교 실험포장에서 재배하고 있는 도라지 (*Platycodon grandiflorum*)의 개화 5~7일 전 화뢰를 채취하여 4, 8°C의 냉장고에서 5일 및 10일간 저온처리한 후 약을 배양하였다. 배지는 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지에 0.5 mg/L NAA 와 1.0 mg/L BA를 혼용처리하고 30 g/L sucrose를 첨가하여 pH 5.8이 되도록 조절하였으며, 0.2% gelrite를 첨가한 후 121°C 고압멸균기에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 약의 치상은 전보 (Lee et al. 1993)와 동일한 방법으로 하였으며 배양 중 소포자의 변화 및 켈러스와 배의 발생 기원을 조사하기 위해 배양 중 약을 수일 간격으로 꺼내 2% propionocarmine으로 염색한 후 squash하여 검경하거나 carnoy액에 고정된 후 상법에 따라 paraffin으로 포매한 다음 8-10 µm의 절편을 만들어 hematoxylin으로 염색, 검경하였다. 배양조건은 형광등을 사용하여 2000 lux 조명

하에 16:8시간의 명암과 25±2°C의 온도가 조절된 배양상에서 배양하였으며 유도된 켈러스 및 배는 30일 간격으로 동일 배지에 계대배양하였다. 한편 소포자유래 식물체의 배수성을 조사하기 위해 근단을 채취한 후 0.1% colchicine 수용액에 4시간 전처리하고 acetic alcohol에 24시간 고정된 후 염산으로 6분간 해리시킨 다음 Feulgen용액에 염색하여 검경하였다.

결과 및 고찰

자연상태 및 저온처리 후 약내 이상화분의 분포

개화 10일 전의 화뢰로부터 개화당일까지 화뢰 및 약의 크기별로 분류하여 약을 꺼내 2% propionocarmine으로 염색하여 자연상태에 존재하는 도라지의 화분 발달상태를 조사하였다. 개화 10일 전의 어린 약에서는 callose wall속에 tetrahedral type의 4분자기 소포자가 분포하고 있었고 개화 8일 전의 약 내에는 4분자기의 callose wall에서 소포자들이 빠져 나온 상태로 그 형태가 원형에 가까웠으며 핵은 한쪽으로 치우쳐 있었다. 개화 5~7일 전 약 내 소포자는 크기가 커졌고 1핵성의 핵은 소포자막 주변에서 핵분열 전기의 상태로 존재하였다 (Figure 1A). 핵분열 결과 중앙에는 핵의 크기가 크고 대체적으로 분산된 모양을 취한 영양핵과 핵의 크기가 작고 농염된 생식핵을 관찰할 수 있었다 (Figure 1B). 개화 1일 전의 약 내에는 소포자핵은 이미 핵분열을 마치고 화분 내 세포질의 합성양이 증가되어 질계 염색된 결과 핵들을 구분할 수 없는 원형 또는 타원형의 성숙화분 (Figure 1C)이 대다수를 차지하였으며 일부에서는 생식세포핵이 핵분열을 마친 상태로 6각형인 모습 (Figure 1D) 등 다양한 형태의 화분이 관찰되었다. 한편 개화당일의 약 내에는 정상화분 (N화분)과 화

Table 1. Effect of low temperature pretreatment on the frequency of S pollen grains in the anther of *Platycodon grandiflorum* in vivo.

Temp.	Days treated	Number of pollen grains				
		Pollen grains examined	Normal pollen grains	S-pollen grains		De
				A type	B type	
Control	0	500	447 (89.4)	37 (7.4)	3 (0.6)	13 (2.6)
4°C	5	500	379 (75.8)	80 (16.0)	15 (3.0)	26 (5.2)
	10	500	388 (77.6)	77 (15.4)	5 (1.0)	30 (6.0)
8°C	5	500	377 (75.4)	83 (16.6)	20 (4.0)	20 (4.0)
	10	500	383 (77.6)	67 (13.4)	8 (1.6)	42 (8.4)

Number of normal, s-pollen grains and de pollen grains were based on the 500 pollen grains per anther. N: Large pollen grains with darkly staining cytoplasm, S: Small pollen grains with weakly staining cytoplasm, De: Degenerating or dead pollen grains, A type : Binucleate microspore with vegetative and generative nucleus by asymmetrical division of microspore; B type : Binucleate microspore with two same size of vegetative type nuclei by symmetrical division of microspore. Parentheses indicate percentage to number of pollen grains examined.

분의 크기가 작고 발육이 지체되어 세포질이 담염된 이상화분 (S화분)이 혼재되어 있어서 화분의 2형현상 (Figure 1E)을 확인하였다. 소포자의 발육시기가 1핵성이 대부분인 화뢰를 화뢰의 크기 및 약의 색깔에 따라 구분하여 4, 8°C의 냉장고에서 5일, 10일간 처리한 다음 정상화분과 이상화분의 핵분열 양상을 조사하였다 (Table 1).

조사방법은 처리약당 500립의 화분 중 정상화분 (N화분), 이상화분 (S화분) 및 화분의 형태가 찌글거리며 화분내 핵 또

는 세포질의 내용물이 결여되어 염색되지 않은 퇴화화분 (De화분)으로 구분하였고 이상화분은 핵분열 양상에 따라 정상적인 생식핵과 영양핵으로 분열한 A형과, 균등분열에 의해 영양핵과 동일한 크기로 분열된 두 핵의 B형의 화분 수를 백분율로 표시하였다. 이상화분의 출현수는 저온처리구가 대조구 (8%)에 비해 약 2배 가량 증가되었고 각 온도의 5일간 처리가 10일간 처리에 비해 다소 증가되었는데 특히 8°C에서 5일간 처리한 약에서는 20.6%가 발생되어 가장 많았다. 또한

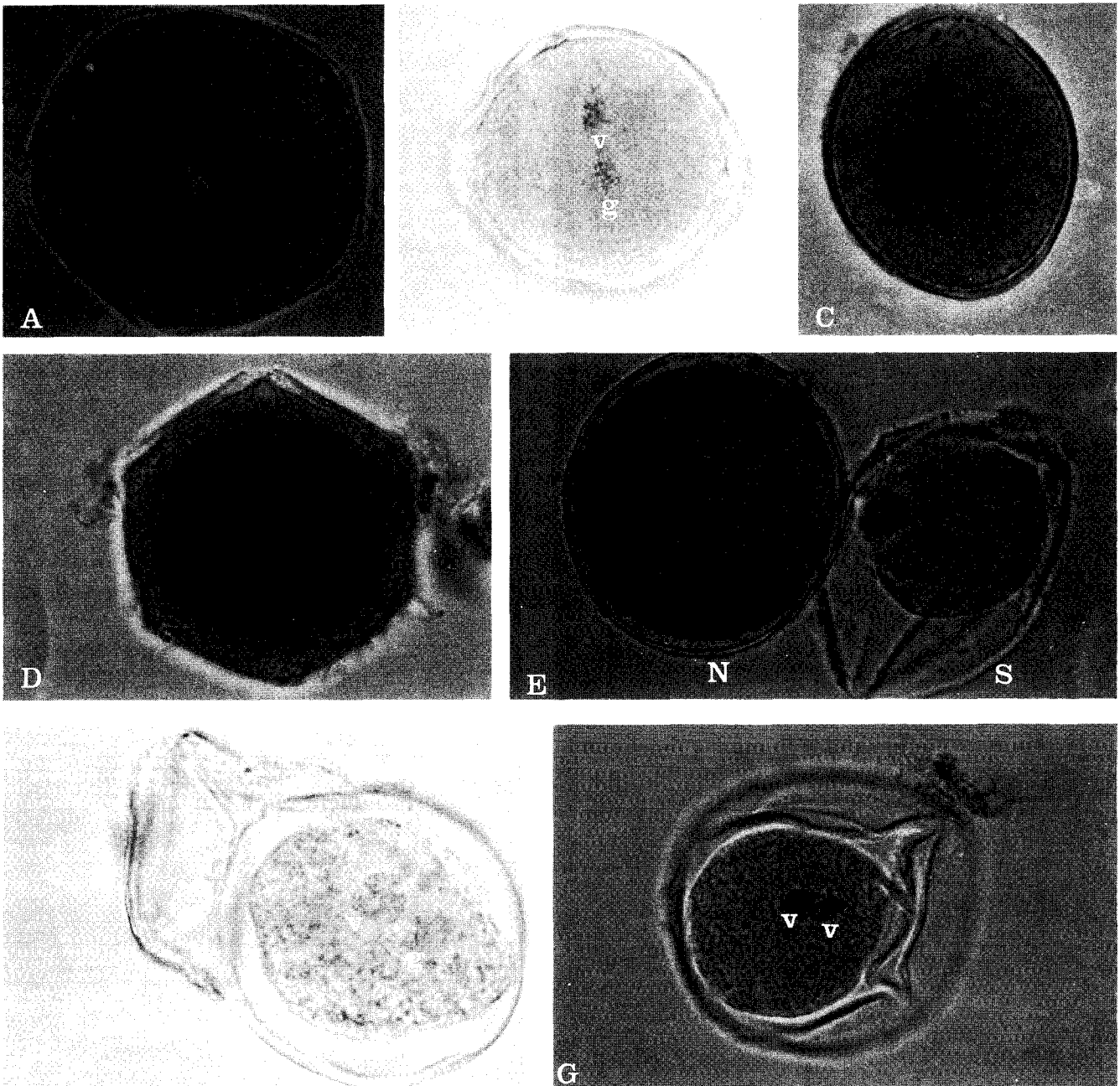


Figure 1. Stages of pollen development in *Platycodon grandiflorum* in vivo. (A): Uninucleate microspore; (B): Binucleate pollen grain with vegetative nucleus (v) and generative nucleus (g); (C-D) Various types of mature pollen grain, rectangular (C); and hexagonal mature pollen grain (D); (E) Pollen dimorphism - a normal (N) and a s pollen grain (S); (F): Binucleate microspore with vegetative (v) and generative (g) nucleus by asymmetrical division of nucleus; (G): Binucleate microspore with two vegetative (v) nuclei by symmetrical division of nucleus after pretreatment at 8°C for 5 days.

대조구에서는 이상화분은 정상화분과 비슷한 크기였으나 화분 내 세포질의 함성량이 적고 액포로 차 있어 담염되었는데 이때 핵은 한쪽에 치우쳐 핵분열 중에 있었으며 그 결과 정상적인 배우체 형성과정에서 나타나는 영양 및 생식핵으로의 불균등분열을 하는 A형 (Figure 1F)이 대부분이었다. 그러나 핵분열 결과 동일한 크기의 영양핵으로 균등분열하는 다수의 B형화분 (Figure 1G)이 정상적인 성숙화분과 혼재되어 있음을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 B형화분은 각 처리온도에서 5일간 처리가 10일간 처리에 비해 약 3배 정도 많았는데 8°C의 5일간 처리에서 4%가 발생되어 본 실험 중 가장 많았다. 퇴화화분은 자연상태보다 저온처리 하였을 때 많이 발생되었고 각 온도의 5일간 처리보다 10일간 처리에서 증가되었는데 이것은 이미 5일간의 처리에서 발생된 이상화분 가운데 일부가 저온기간이 연장되는 동안 그 기능이 상실된 것으로 생각된다.

약배양에 있어서 켈러나 배를 형성하는 화분은 이상화분임이 밝혀진 다음부터 이상화분 수를 증가시키기 위해 여러 가지 방법을 시도하였으나 저온처리 (Sunderland 1978)가 이상화분의 수를 증가시킴으로 배발생이 향상되었다고 하여 지금까지 가장 많이 이용하고 있다. 약배양이 잘 되는 식물인 *Anemone coronaria* (Ko 1986)는 10°C에서 10일간 처리하므로서 자연상태 (0.8%)에 비해 이상화분이 5배 정도 (4.3%) 증가되었고, *Paeonia albiflora* (Lee et al. 1989)도 자연상태 (7%) 보다 1°C에서 10일간 처리하였을 때 40% 가량이 증가하였으며 *Zantedeschia aetiopica* (Ko 1996)의 경우에도 5°C에서 6일간 처리가 소포자의 균등분열을 증가시켜 저온이 이상화분의 출현에 효과적이었다. 본 실험의 도라지 경우에서도 이상화분의 출현 빈도는 8°C에서 5일간 저온처리했을 때 저온처리하지 않은 대조구보다 이상화분이 약 2.6배 정도 증가되어 저온처리 효과가 있었다. 이것은 본 실험재료인 도라지는 자연상태에서도 약배양이 비교적 잘 되는 식물로 약 내 소포자들은 조포체화할 수 있는 잠재력을 지녔을 뿐만 아니라 1핵기의 소포자를 4°C와 8°C에서 5일 및 10일간 처리하므로서 잠재력 있는 소포자들의 핵분열을 자극시켜 균등한 두 핵으로 분열이 가능하였던 것으로 생각된다.

저온처리가 배양중 이상화분 (S화분)의 배발생에 미치는 영향

배양 중 이상화분의 배발생경로는 핵분열상태, 균등분열, 다핵 및 다세포성의 배발생적 화분과 퇴화되는 화분의 수를 백분율로 환산하였다. 대조구의 약 내 소포자는 배양 10일 후부터 핵이 분열하기 시작하여 배양 20일이 경과되었을 때 영양핵과 생식핵으로 구분된 A형화분과 핵의 크기가 같은 두개의 핵으로 균등분열한 B형화분이 관찰되었다. 그러나 저온처리구에서는 각 처리온도별로 10일간 처리가 5일간 처리에 비해 소포자의 첫 핵분열이 비교적 빨리 진행되었다. B형화분의 경우 대조구 (2.9%)에 비해서 저온처리구에서 모두 증가

되었는데 특히 8°C에서 5일간 처리하여 배양 60일이 경과되었을 때 8.6%가 관찰되어 본 실험 중 가장 많았다. 한편 대조구에서는 배양 60일이 경과될 때까지도 42.0%정도가 1핵성 소포자로서 치상당시와 동일하였으나 일부 반응을 보인 소포자와 저온처리한 약 내에서 분열된 핵들은 계속되는 분열에 의해 다핵화, 다세포화 되는 화분들이 관찰되었다. 다핵화 현상은 4°C보다 8°C 처리구에서 많았으며 8°C의 5일간 처리는 10일간 처리에 비해 약 2배 가량 증가하였다. 또한 2세포성 화분은 4°C 처리구에서 8°C 처리에 비해 전반적으로 많았는데 4°C에서 5일간 처리에서는 52.8%로 가장 많았다. 다세포성화분은 대조구와 4°C의 5일간 처리가 비슷하였고 4°C 및 8°C의 10일간 처리는 오히려 대조구보다 적었으나 8°C의 5일간 처리에서는 4.8%가 다세포성화분을 형성하여 가장 많았다. *Sorghum bicolor* (Rose et al. 1986)의 경우 7°C에서 4, 5, 6주간 저온 전처리하였을 경우 화분의 30%가 영양세포에서 핵분열이 유도되었다고 하였는데 본 재료의 경우 각 처리온도의 10일간 처리는 오히려 대조구보다 핵분열이 저조하였다. 한편 소포자로부터 배는 세가지 경로를 통해 형성되는 것이 관찰되었다. 첫째, 불균등 분열의 영양세포에 의한 배형성 과정에서는 배양 20일경 1핵성 소포자가 영양 및 생식핵으로 분열하였고 뒤이어 세포질의 분열로 2개의 화분 내에 생식 및 영양세포를 관찰하였다 (Figure 2A). 그러나 불균등 분열한 영양핵과 생식핵 가운데는 배양 30일까지도 세포질의 분열 없이 핵의 크기만 비대해진 화분도 관찰되었다 (Figure 2B). 이러한 화분은 배양 40일경에는 영양핵에 해당되는 큰 핵의 계속적인 분열 결과 형성된 7~8개의 영양핵을 관찰하였는데 생식핵은 그때까지도 분열하지 않았다 (Figure 2C). 또한 분열된 영양핵들은 세포질 분열이 일어나 다세포성 화분을 형성하였는데 배양 50일경에는 다세포성 화분에서 구형의 원배가 형성되었다 (Figure 2D, 2E). 둘째, 불균등 분열에 의해 형성된 영양 및 생식세포 모두가 각각 다른 배를 형성함이 관찰되었는데 배양 20일경 1핵성 소포자의 분열에 의해 형성된 영양 및 생식핵은 배양 25일경에는 생식핵과 영양핵 모두가 분열하고 있음이 관찰되었고 (Figure 2F), 배양 35일에는 계속적인 분열에 의해 형성된 20여개의 영양핵과 4~5개의 생식핵이 화분 내에서 구분되어 있었다 (Figure 2G). 이와 같은 다핵성 화분은 배양 기일이 경과됨에 따라 다세포성 화분으로서 영양세포 및 생식세포 유래의 원배가 형성되고 있었는데 배양 50일경에는 영양세포유래의 배와 생식세포유래의 배가 각각 형성되어 한 개의 화분내에서 크고 작은 두 개의 배를 관찰하였다 (Figure 2H). 그러나 영양핵과 생식핵이 동시에 분열하였을 경우 일부의 화분 내에서는 배양 30일경 영양세포 및 생식세포는 배와 배병 기원 세포를 형성하고 (Figure 2I) 배양 60일경에는 영양세포는 계속적인 분열로 다핵 및 다세포성 화분이 형성된 후 구형의 배를 형성하였으나, 생식세포에서는 배병을 형성하기도 하였다 (Figure 2J). 셋째, 배양 전 약을 8°C에서 5일간 처리한 후 배양하였던 약 가운

데 균등분열에 의해 형성된 동일한 크기의 두 핵이 배를 형성한 경우를 관찰하였는데 배양 25일까지도 치상 당시와 같이 1핵성의 소포자 (Figure 2K)였으나 배양 30일에는 동일한 크기의 영양핵으로 균등분열하였고 (Figure 2L) 배양 35일에는 두 핵이 모두 분열을 시작하여 배양 40일에는 6~7개의 핵을 형성하고 (Figure 2M-2N) 급속도로 세포질이 합성되어 핵과 세포질이 화분 내에 가득찬 결과 농염되었는데 (Figure 2O), 일부 화분에서는 다세포체가 화분막을 뚫고 나오기도 하였다 (Figure 2P). 배양 50일 다세포체는 구형의 원배

(Figure 2Q, 2R)임이 확인되었다.

소포자유래의 배는 동정생식의 유기 및 배의 형성에 의해서 완성되며 이에 대한 정확한 기작은 아직 불분명하지만 소포자의 생화학적, 생리적 변화에 의한 결과로 설명되고 있다 (Sunderland and Dunwell 1977). 따라서 소포자유래의 배형성 과정은 식물의 종류, 모식물의 유전형, 생육상태와 각종 배양조건에 따라 다양한 경로를 거치는데 본 실험의 도라지의 경우 3가지 경로를 통해 소포자유래의 배가 형성되었다. 즉 *Nicotianan tabacum* (Sunderland and Wicks 1971; Horner

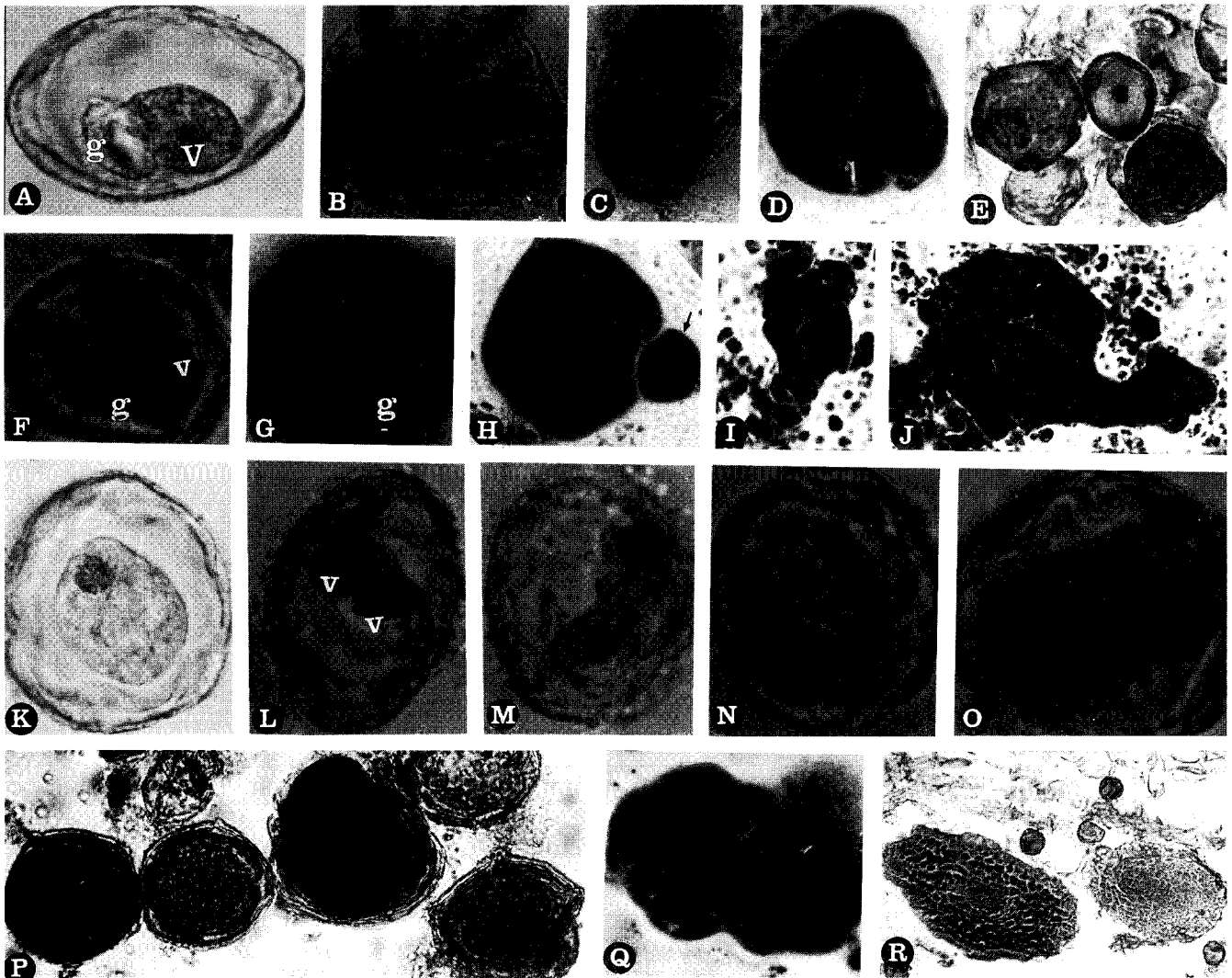


Figure 2. Embryoid development in *Platycodon grandiflorum* via three pathway *in vitro*. (A-E) Embryoid development via division of the vegetative nucleus. (A): Bicellular generative cell (g) and vegetative cell (v) 20 days after culture initiation; (B-C): Binucleate and multinucleate vegetative nucleus component with undivided generative nucleus after 30 to 40 days in culture; (D-E): Multicelled proembryoid originating from the vegetative cell, after 50 days in culture; (F-J): Embryoid development via division of both the vegetative and the generative nucleus; (F-G): Independent contributions from both vegetative and generative cell after 25 to 35 days in culture; (H): Multicelled pollen embryos derived from the vegetative cell and generative cell (arrow), respectively, after 50 days in culture; (I-J): The vegetative cell divided to form a multicellular embryoid and the generative divided to form a multicellular suspensor-like structure after 30 days (I) and 90 days (J) in culture; (K-R): Embryoid development via division of two vegetative nuclei after pretreatment at 8°C for 5 days; (K): Uniuucleate microspore after 25 days in culture; (L-M): Bicellular vegetative-cell component without generative cell after 35 days in culture; (N-O): Multinucleate and multicelled pollen grain with vegetative cells; (P): Multicelled pollen grain protruding from the ruptured exine; (Q-R): Globular embryos after 60 days in culture.

and Street 1978), *Zantedeschia aetiopica* (Ko et al. 1996)와 같이 1핵성 소포자의 첫 분열 후 영양세포가 계속적으로 분열하여 배를 형성하였고 *Hyoscyamus niger* (Raghavan 1978)는 생식세포가 단독으로 분열하여 배를 형성하였으나, 도라지는 영양 및 생식세포 모두가 독립적으로 배를 형성하였는데, 생식세포는 영양세포에 비해 분열 정도가 완만하여 일정기간 내 형성된 배의 크기가 달랐다.

한편 저온자극은 B형화분 수를 증가시켰으며 특히 8°C에서 5일간 처리한 약에서는 *Datura innoxia* (Nitsch and Norreel 1973; Sunderland 1974), *Anemone coronaria* (Ko 1986)에 서와 같이 균등분열한 두 개의 낭세포가 모두 분열하여 배를 형성하였다.

캘러스, 배발생 및 식물체 재생에 미치는 저온처리효과

저온처리 온도와 기간이 캘러스 및 배발생에 미치는 효과를 조사하기 위해 개화 5~7일 전 1핵성 약의 화뢰를 4, 8°C

의 냉장고에서 5일 및 10일간 저온처리한 다음 0.5 mg/L NAA 와 1.0 mg/L BA를 첨가한 MS 기본배지에 120~130일 간 배양하였다 (Table 2).

저온처리하지 않은 대조구의 약은 배양 10일경부터 팽대되기 시작하여 봉합선이 열개되었고 약벽조직과 화사의 절단면 등에서 배양 20일경에는 담황색의 캘러스가 발생되었는데 약강 내의 소포자 유래로 보이는 배발생적 캘러스발생은 배양 30일이 경과된 후에야 관찰할 수 있었다. 배양 기일이 경과됨에 따라 대조구의 약은 점차적으로 담갈색으로 변화되었으나 저온처리구의 약은 배양 30일까지도 치상 당시와 비슷한 유백색을 띠었고 온도와 기간에 따라 차이는 있었지만 초기 캘러스의 발생시기는 대체적으로 대조구에 비해 늦어 배양 35일경부터 반응을 나타내기 시작하여 배양 50일경에는 저온처리구에서도 대조구와 비슷한 양상으로 봉합선을 헤치고 약강 내부로부터 담황색의 캘러스와 회고 단단한 배가 발생되었다. 대조구의 캘러스 및 배발생률은 각각 20.5%와 0.9%로 4°C 의 5, 10일간 처리구보다 캘러스 및 배발생률이 약간 상승하



Figure 3. Embryo germination and development of pollen derived plantlets of *Platycodon grandiflorum*. (A) Emergence of embryos from an anther cultured for 70 days on MS media supplemented with 0.5 mg/L NAA and 1.0 mg/L BA, cell from a root tip of diploid plantlet showing 2n=16 chromosome(B).

Table 2. Effect of low temperature pretreatment on callus induction and embryo formation in anther culture of *Platycodon grandiflorum* after 120-130 days culture.

Temp.	Days treated	No. of anthers cultured	No. of anthers producing callus (%)	No. of anthers producing embryo (%)	No. of anthers producing plantlet (%)
Control	0	112	23 (20.5)	1 (0.9)	14 (12.5)
4°C	5	56	11 (19.6)	0	5 (8.9)
	10	56	10 (17.9)	0	0
8°C	5	71	39 (54.9)	7 (9.9)	11 (15.5)
	10	40	17 (42.5)	0	4 (10.0)

였다. 그러나 8°C 처리구에서는 대조구에 비해 캘러스와 배가 2배 이상 발생되었는데 특히 5일 처리구에서는 54.9%의 캘러스와 15.5%의 배가 발생되어 도라지 약배양에 가장 효과적이었다. 한편 발생된 캘러스 및 배는 분리한 후 동일배지 및 배양조건으로 계대배양하였으며 30일 간격으로 새로운 배지에 옮겨 캘러스 및 배에서 분화된 식물체를 조사하였던 바 배양 90일경에는 단단한 원형의 돌기가 자라 여러 형태의 배가 형성됨을 관찰할 수 있었는데 (Figure 3A) 일부에서는 상편은 녹색을 띤 잎을 형성하였고 하부에서는 가늘고 흰 뿌리가 발생되어 완전한 식물체로 분화되었다. 한편 발생된 뿌리의 근단을 채취하여 염색체를 조사한 결과 2배체 ($2n=2x=16$) 임이 확인되었다 (Figure 3B).

Datura innoxia (Nitsch and Norreel 1973)의 어린 화뢰를 3°C에서 2일간 저온처리한 후 약을 배양한 결과 배발생률이 상승되었다는 보고가 있는 이래 약배양 효율을 높이기 위한 수단으로서 식물체나 화뢰를 저온처리하여 왔는데 아직도 저온처리에 대한 기작은 분명치 않다. 그러나 저온자극에 의한 약배양 효율은 소포자의 핵분열교란으로 인한 비정상화분을 유도하므로 배양도중 조포체화 하도록 유도하든지 (Horner and Mott 1979; Harn 1985), 배양 중 약의 노화억제에 따른 배발생적 화분의 수를 증가시키는 역할을 행하는 (Bajaj 1978) 등 식물마다 각각 다른 생리적인 기작이 관여하고 있다. 도라지 약배양 결과 대조구의 경우 약배양의 반응은 초기 배양 30일 이내에 결정되었으며 60일이 경과되어도 반응을 보이지 않은 약에서는 동일한 배지 및 배양조건을 갖추어 주어도 캘러스나 배는 거의 발생되지 않았다. 그러나 저온처리한 약에서는 초기 반응의 속도가 대조구에 비해 완만함과 동시에 지속적인 반응을 나타내 배양 60일이 경과되었을 때에도 대조구의 30일 배양에서와 같은 반응을 보였다. 따라서 저온처리하는 배양 중 소포자의 핵분열에 이상을 초래하여 배발생적 이상화분의 수를 증가시킬 뿐만 아니라 약벽조직의 노화 등을 방지하여 약 내 소포자의 활력을 높임으로서 소포자의 생존기간을 연장시킴으로 약배양 효율을 향상시키는 효과적인 방법이라고 생각된다.

적 요

도라지 약배양에 있어서 저온처리가 화분 2형현상과 배형성에 미치는 영향을 조사하기 위해 1핵성 소포자의 도라지 약을 0.5 mg/L NAA 와 1.0 mg/L BA가 첨가된 MS배지에 배양하였다. 저온전처리는 이상화분과 균등분열에 의한 B형 화분, 다핵 및 다세포 화분수를 현저하게 증가시켰는데 특히 8°C에서 5일간 저온전처리는 배양 전 이상화분이 20.6%가 증가되었고 배양 중에는 54.9%의 캘러스와 9.9%의 배형성을 나타내 가장 효과적이었다. 배양 중 소포자로부터 배는 첫째, 주로 영양세포가 분열하거나 둘째, 영양세포와 생식세포

가 각각 분열하거나 셋째, 균등분열에 의한 영양핵과 동일한 크기의 두 낭세포 모두가 분열하여 배를 형성하는 3가지 경로가 관찰되었다.

인용문헌

- Bajaj YPS (1977) *In vitro* induction of haploids in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop Improv* 4:54-64
- Dale PJ (1975) Pollen dimorphism and anther culture in barley. *Planta (Berl.)* 124:1-11
- Harn CY (1985) Anther culture and pollen dimorphism. *Kor J Plant Tiss Cult* 12:1-34
- Horner M, Mott RL (1975) The frequency of embryogenic pollen grains is not increased by *in vitro* anther culture in *Nicotiana tabacum* L. *Planta (Berl.)* 147:156-158
- Horner M, Street HE (1978) Pollen dimorphism-origin and significance in pollen plant formation by anther culture. *Ann Bot* 42:763-771
- Ko JA (1986) Studies on the pollen dimorphism and anther culture of *Anemone coronaria*. Ph. D.thesis, Chonbuk National University, Chonju
- Ko JA, Kim YS, Eun JS (1996) Embryogenesis and plant regeneration by the anther culture of *Zantedeschia aethiops* spp. *J Kor Soc Hort Sci* 37:468-474
- La Cour LF (1949) Nuclear differentiation in the pollen grain. *Heredity* 3:319-337
- Lee BK, Ko JA, Kim YS, Eun JS (1993) Embryogenesis and plant regeneration in anther cultures of *Platycodon grandiflorum*. *Kor J Plant Tiss Cult* 20:153-157
- Lee BK, Eun JS, Ko JA, Kang NJ (1989) Effects of pollen dimorphism and plant growth regulators in anther culture of *Paeonia albiflora*. *Kor J Plant Tiss Cult* 16:105-114
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-479
- Nitsch C, B Norreel (1973) Effet d' un choc thermique sur le pouvoir embryogene du pollen de *Datura innoxia* cultive dans l' antherou isole de l' anthere. *C.R. Hebd Senac Acad Sci, Paris* 276:303-306
- Raghavan V (1978) Origin and development of pollen embryoids and pollen calluses in cultured anther segments of *Hyoscyamus niger* (henbane). *Amer J Bot* 65:98-102
- Ramana MS (1974) The origin of unreduced microspores due to aberrant cytokinesis in the meiocytes of potato and its genetic significance. *Euphytica* 23:20-30
- Rose JB, Dunwell JM, Sunderland N (1986) Anther culture of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Plant Cell Tiss Org Cult* 6:23-31
- Sunderland N (1974) Anther culture as a means of haploid induction. In: Kasha KJ, (ed), *Haploids in Higher Plants, Advances and Potential*. Univ of Guelph, pp 91-122

Sunderland N (1978) Strategies in the improvement of yields in anther culture. In: proceeding of symposium on plant tissue culture. Science Press, Peking pp 65-86

Sunderland N, Dunwell JM (1977) Anther and pollen culture. In:

Plant Tissue and Cell Culture. Street HE 2nd eds, Blackwell, Oxford, pp 223-265

Sunderland N, Wick FM (1971) Embryoid formation in pollen grains of *Nicotiana tabacum*. *Exp Bot* **22**:213-226

(접수일자 1999년 2월 3일)