식물조직배양학회지 제28권 제5호
Korean J. Plant Tissue Culture
Vol. 28, No. 5, 263~271(2001)

고추의 약배양 시 온도 전처리에 따른 소포자의 세포학적 변화 분석

김문자* · 장인창
목원대학교 자연과학대학 생명과학부

Cytological Analysis of Microspores during Temperature Pretreatment in Anther Culture of *Capcicum annuum* L.

KIM, Moon Za · JANG, In Chang
Department of Life Sciences, College of Natural Sciences, Mokwon University, Daejon, 302-729, Korea

ABSTRACT Inoculated anthers of *Capsicum annuum* L. were subjected to 4 and 32℃ pretreatment and their influence on the microspore viability, early cytological changes and the induction frequency of microspore embryo was investigated. Viability of freshly isolated microspores was between 62 and 64%. During temperature pretreatment, microspore viability showed a rapid decrease and this tendency enhanced with the 32℃ pretreatment. Irrespective of temperature pretreatment, microspore viability declined to nearly zero after nine days. Before temperature pretreatment, most of the microspores in anthers were at late uninucleate stage. Several types of multinuclear microspores appeared from the 2 day after culture onwards, together with many degenerated and non-induced microspores. The 32℃ pretreatment gave higher proportions of embryogenic microspore than other treatment. However, the temperature pretreatment had no clear effect on the frequencies of symmetrical binucleate microspore. The multinucleate grains might originate either by symmetrical or asymmetrical division. After 2 days of pretreatment at 25 and 32℃, degenerated microspore increased above 50%. In contrast, during 4℃ treatment, nucleus of most microspores remained intact for 14 days. The 32℃ prereatment produced more embryos than 4℃ treatment. The most effective period of 32℃ pretreatment was 4 days. In contrast, effective period of 4℃ pretreatment was 2 days and longer time had deleterious effect on induction of microspore embryo.

Key words : Microspore embryo, microspore viability, pretreatment

서 론

약 배양에 의해 소포자 배를 보다 용이하게 획득할 수 있으려면 소포자가 정상적인 배우체로 발달하는 대신 조포체로 발달하는 데 적합한 조건을 만들어 주어야만 하는데 이와 같은 소포자 발달의 방향 전환에는 모식물의 유전자형이나 생육조건, 배양 약의 발달 시기, 배지의 조성이나 배양 환경 등 여러 가지 요인들이 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 그러나 소포자의 발달 경로를 바꾸는 데에는 꽃봉오리나 약에 여러가지 stress를 가했을 때 더욱 효과적인 것으로 알려져 있다. 치상 전이나 배양 초기에 mannitol로 water stress를 준다거나, ABA와 같은 생장호르몬을 처리한다거나, 또는 sucrose가 첨가되지 않은 배지에 치상하여 starvation 시킨 후 배양하는 등 여러가지 물리·화학적 처리를 하는데 이 중 가장 널리 시행되고 있으며 또 효과적인 것이 온도 처리이다.

약 배양에서 저온처리는 적정 처리 온도나 기간은 상이하더라도 많은 식물에서 효과적인 것으로 알려져 있으며 (Marsolais et al. 1984; Regner 1996) 배추속 식물에서 치상 후의 고온처리가 더 효과적인 것으로 알려지면서 (Keller and Armstrong 1977; 1979) 약 배양에서 치상 전후의 저온 및 고온처리는 거의 필수적인 전처리 과정으로 알려져 있다. 소포

*Corresponding author. Tel 042-829-7581 Fax 042-829-7580
E-mail kim70@mokwon.ac.kr

자 배 발생에 고온과 저온 전처리 중 어느 것이 더 효과적인가는 식물에 따라 달라 감자 (Tiainen 1992)에서는 저온처리가, 담배 (Touraev et al. 1996)와 무 (Takahata et al. 1996)에서는 고온처리가 효과적이다. 또 많은 식물에서 저온처리가 효과적이라는 사실이 인정되고 있지만 식물에 따라서는 저온처리에 의해 오히려 배양 효율이 낮아지기도 한다 (Li et al. 1988; Marsolais et al. 1984). 약 배양에 대한 저온처리 효과는 처리 후의 배양온도와도 밀접한 관계가 있어 밀에서는 28℃에서 배양할 때는 캘러스의 발생이 높지만 30℃에서 배양할 때는 오히려 감소한다 (McGregor and McHughen 1990). 고추의 약 배양 시에도 저온처리가 많이 실시되어 왔으나 Dumas 등(1981)이 고온처리에 의해 배양 효율이 높아졌음을 보고한 이래 저온뿐만 아니라 고온 처리도 널리 실시되고 있으나 저온과 고온처리 중 어느 것이 더 효율적인가를 비교하고 효율적인 처리 온도와 기간을 밝힌 연구는 많지 않다 (Kim 1999).

Brussels sprouts의 약 배양 초기 때 배양효율이 낮은 품종은 높은 품종에 비해 ethylene 생성이 높았는데 고온처리 시에는 ethylene 생성이 감소되고 배 발생이 증가되었다고 함으로써 고온처리에 의해 배 발생이 증가하게 되는 원인의 하나가 ethylene 생성의 억제 때문인 것으로 알려졌다 (Biddington and Robinson 1991). 또 저온처리 후에는 소포자 분열 시 미세소관의 분포에 변화가 생겨 불균등 분열 대신에 균등 분열을 하게 되고 이런 소포자들이 배로 발달하게 되는 것으로 알려졌다 (Hause et al. 1993). 최근 broccoli에서는 (Fabijanski et al. 1991) 약을 35℃에서 3일간 처리한 후에 약 배양을 실시한 결과 배양효율이 높았는데 이때 고온처리한 약의 단백질을 분석한 결과 heat shock protein (HSP)이 나타났으며, 옥수수에서도 (Magnard et al. 1996) 소포자 분열기의 소포자만 분리하여 고온처리를 한 후 단백질 pattern을 조사한 결과 역시 heat shock에 대한 반응을 나타내서 정상적인 단백질 합성은 억제되고 HSP들이 나타났다고 하였는데 많은 식물에서 고온처리 효과는 heat shock protein이 관여하기 때문인 것으로 알려져 있다 (Arnison et al. 1990; Fabijanski et al. 1991; Hause et al. 1993).

여러 가지 induction treatment에 의해 어떻게 소포자의 발달방향이 바뀌게 되는가를 밝힐 수 있으려면 세포학적 내지는 분자수준에서의 변화들을 분명하게 밝힐 수 있어야 하는데 아직까지는 이와 같은 연구들이 많지 않다. 가장 큰 원인은 소수의 식물을 제외한 대부분의 식물에서 소포자 배의 발생비율이 높지 못하므로 배 발생적인 소포자들만을 발달단계별로 분리 수집하는 것이 어렵기 때문이다. 또 다른 원인은 소포자 벽이 매우 두꺼워서 일반 염색법으로는 세포학적 변화를 명확하게 관찰하기 어렵기 때문인데 최근 철 처리를 겸한 DAPI 염색방법이 개발되어 비교적 용이하게 세포학적 변화를 추적할 수 있게 되었다 (Kim and Jang 1999). 본 연구에서는 고추의 약 배양 시 소포자 배 발생 비율을 높이는 동시에 배 발생 기구를 밝히기 위한 기초자료들을 얻기 위해 고온 및 저온 전처리 중 소포자의 활력, 초기분열 및 소포자 배 발생을 조사하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험의 재료로는 농협중앙회로부터 분양 받은 고추 (*Capsicum annuum* L.)의 밀양재래 품종을 사용하였는데 이 품종은 약 배양에 대한 반응이 비교적 높은 것으로 알려져 있다. 모식물은 직경 20 cm 화분에 파종한 후 본엽이 2~3매 출현했을 때 생육정도가 비슷한 유묘들만을 선별하여 직경 23 cm 화분에 이식하여 개화시켰다. 생장조절기 내의 광 조건은 16시간이었고 온도는 명 상태에서는 25~27℃이고 암 상태에서는 23~25℃이었다. 식물생장을 위해 관수는 매 2~3일마다, 시비는 1주일 간격으로 실시하였다. 약의 색깔이 자주색을 띄기 시작한 것에서부터 3/4 정도가 자주색으로 된 것들의 꽃봉오리를 채취하여 2%의 sodium hypochlorite 용액에 10분간 멸균시킨 다음 살균수로 3회 수세하여 배양에 사용하였다.

약 배양 및 온도 전처리

배지는 MS배지에 sucrose 3%와 2,4-D와 kinetin을 각각 0.1 mg/L를 첨가하였으며 0.1 N NaOH로 pH가 5.8이 되게 조절하여 121℃에서 15분간 고압멸균하였다. 5 ml의 고체배지가 들어있는 시험관에 2개의 꽃봉오리로부터 10개의 약을 취하여 치상하였다. 치상한 약은 25~28℃의 항온기에서 배양 후 4주까지는 암상태에서 4주 이후부터는 명상태에서 배양하였다. 약 배양 효율을 조사하기 위하여 배양 후 4주부터 8주까지 매 1주일마다 해부현미경 하에서 배가 발생한 약의 수와 각 약에서 발생한 배의 수를 조사하였다.

온도 전처리는 약을 치상한 후 2~14일간 실시하였으며 처리가 끝난 것은 26~27℃의 항온기에서 배양하였다. 저온처리는 4~6℃의 냉장고에서 실시하였고 고온처리는 32~33℃의 항온기에서 실시하였다.

소포자 활력 및 세포학적 변화

소포자의 활력은 fluorescein diacetate (FDA)를 사용하여 조사하였다 (Heslop-Harrison et al. 1984). FDA 2 mg을 1 mL의 acetone에 녹여 stock solution을 만들어 보관한 후 필요에 따라 stock solution 2 μL를 1 mL의 증류수에 희석하여 사용하였다. FDA의 희석용액은 매번 사용 직전에 새로 만들었으며 수 시간 이내에 사용하였다. 소포자를 FDA 희석용액

에 현탁시킨 후 10분 후부터 20분 사이에 B (main wave length : 480 nm) 또는 IB filter를 사용하여 형광현미경 하에서 관찰하였으며 진한 녹색의 형광을 나타내는 것만을 활력 있는 소포자로 계산하였다. 소포자의 세포학적 변화는 4′-6-diamidino-2-phenylindol-2HCl (DAPI, Sigma D-8417)로 염색하여 10분 후부터 U filter (main wave length : 365 nm)를 사용하여 관찰하였다 (Kim and Jang 2000). 한 처리 당 5~10개의 약을 조사하였으며 한 개의 약을 slide 상에서 압착하여 소포자를 방출시켜 염색한 후 무작위로 10곳 이상의 장소에서 총 500개의 소포자를 계수한 후 세포학적으로 다른 각각의 소포자들을 백분율로 환산하였다. 매 실험은 3회 이상 반복하였다.

결과 및 고찰

FDA로 염색한 소포자는 진한 녹색의 형광을 나타내는 것과 형광을 나타내지 못하는 것이 쉽게 구별되었다 (Figure 1). 치상 당시 활력 있는 소포자는 62~64%이었으나 동일한 식물체 내에서도 꽃봉오리에 따라, 또 같은 꽃봉오리에서도 약에 따라 심한 차이가 났다. 소포자 활력은 치상 후 급속하게 감소하여 치상 2일이 되면 고온처리에서는 치상 당시에 비해 1/2 이하인 32%로 되었으며 무처리와 저온처리에서도 41%와 58%로 심하게 감소하였다. 치상 기간이 경과하면서 소포자의 활력은 더욱 급속하게 감소하였는데 치상 4일이 되면 모든 처리에서 2일에 비해 1/2 이하로 감소하였고 7일이 되면 감소되는 정도가 더욱 심하게 되어 활력 있는 소포자의 비율은 3~9%에 불과하였다. 또 치상 후 9일이 되면 활력 있는 소포자는 0.2~0.5%로 매우 낮았으며 14일이 되면 온도 전처리에 관계없이 활력 있는 소포자가 거의 없었다 (Table 1). 소포자 활력이 감소되는 정도는 온도 전처리에 따라 달라서 고온처리 시에 가장 빨랐고 그 다음은 무처리와 저온처리 순으로 온도가 높을수록 더 심하게 감소하였다.

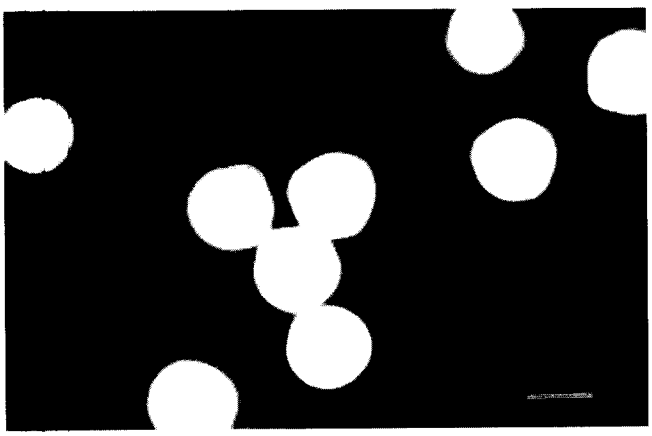

Figure 1. Viable and non-viable microspores isolated from an anther of pepper following FDA staining. Viable microspores show an intense fluorescence. Bar=10 μm.

Kale의 약 배양 시 치상 당시의 소포자 활력은 50% 전후로 매우 낮았는데 그 원인은 모식물이 생육된 tunnel 내의 온도가 매우 높을 뿐만 아니라 온도 변화가 심하기 때문이었다 (Kieffer et al. 1993). 또 해바라기의 소포자 배양 시 소포자 수확 후의 소포자 활력은 모식물의 생육조건에 따라 차이가 나서 온실에서 생육된 경우는 포장에서 생육된 경우에 비해 매우 낮았다 (Coumans and Zhong 1995). 이와 같이 소포자 활력은 모식물의 생육조건에 따른 생리적 상태에 따라 크게 달라지게 되는데 본 실험에서 치상 당시 활력 있는 소포자의 비율이 62~64%로 비교적 낮았던 것은 모식물이 생장한 식물생장기 내의 생육조건이 비교적 불리하였기 때문인 것으로 생각된다. 동일한 생장조건에서 생육되었음에도 식물에 따라 또 동일한 식물에서도 꽃봉오리나 약에 따라 소포자 활력이 크게 차이가 났는데 이는 생리적인 차이뿐만 아니라 배양 약의 시기가 다르기 때문인 것으로 추측된다. 일반적으로 고추의 약 배양 적기는 후기 1핵성 소포자기나 초기 2핵성 화분기로 알려져 있으며 꽃봉오리의 크기나 약의 착색 정도로 기준을 세우고 있는데 동일한 꽃봉오리나 착색 정도가 같은 약들에서도 소포자의 발달단계가 다른 경우가 많다. 실제로 kale에서 1핵 소포자기와 2핵 및 3핵 화분기의 약 배양 시 치상 당시 소포자 활력은 화분 발달시기에 따라 크게 차이가 났다 (Kieffer et al. 1993).

유채의 소포자 배양 시 소포자 활력은 치상 당시 65~80%였던 것이 배양 직후부터 급격히 감소하여 배양 후 12시간이 되었을 때 이미 50% 정도로 감소하였고 배양 1일이 되면 30~45%로 되었다 (Smykal and Pechan 2000). 이와 같은 현상은 옥수수 (Gaillard et al. 1991), 밀 (Gustafson et al. 1995), 해바라기 (Coumans and Zhong 1995) 등의 소포자 배양 시에도 비슷하여 배양 1~2 주일이 되면 활력 있는 소포자가 거의 없었다. Kale의 약 배양 시에도 소포자 활력은 배양 중 매우 심하게 감소하여 9일 후가 되면 활력 있는 소포자가

Table 1. Percentage of viable microspores during temperature pretreatment in anther culture of *Capsicum annuum* L.

Pretreatment	Days of treatment					
	0	2	4	7	9	14
Control (25℃)	63± 8[a]	41±11	18±14	5±3	0.3±0.2	0.1±0.1
Heat treatment (32℃)	64±10	32±13	14± 8	3±1	0.2±0.1	0.1±0.1
Cold treatment (4℃)	62±11	58±14	27±11	9±5	0.5±0.3	0.2±0.1

거의 없었다 (Kieffer et al. 1993). 본 실험에서도 소포자의 활력이 배양 중 매우 급속하게 감소하여 2일 후에 이미 치상 당시에 비해 약 1/2이 되었고 배양기간이 경과할수록 더욱 심하게 감소하여 배양 14일이 되면 온도처리에 관계없이 활력 있는 소포자가 거의 없었다. 따라서 소포자 배양이나 약 배양 시 소포자의 활력은 배양 직후부터 급속하게 감소하고 식물에 따라 약간의 차이는 있으나 대부분의 식물에서 2주 후가 되면 활력 있는 소포자가 거의 없게 되는 것으로 보인다.

Gyulai 등 (2000)의 고추 약 배양 결과에서도 소포자 활력은 본 실험의 경우에서처럼 배양 중 점차 감소하여 치상 당시 100%였으나 배양 7일 후에는 72% 정도였고 28일에는 1.6% 정도가 되었다. 그러나 치상 당시와 배양 7일 후의 소포자 활력이 본 실험에서 보다 매우 높았는데 이는 모식물의 생육조건이나 배양조건에 차이가 있었을 뿐만 아니라 소포자 활력 조사 시 FDA가 아닌 1% phenosafranin을 사용했기 때문인 것으로 생각된다. 실제로 알파파의 약 배양 시 성숙화분의 활력을 acetocarmine과 FDA를 사용하여 측정한 결과 acetocarmine을 사용했을 때는 80%이었으나 FDA를 사용했을 때는 60%로 사용한 시약에 따라 크게 차이가 났다 (Tanner et al. 1990). 화분활력을 조사하는 데는 phenosafranin과 acetocarmine을 비롯하여 여러 가지 방법들이 사용되고 있는데 최근 8가지 식물 종을 대상으로 Baker's 방법, X-Gal-test, MTT 그리고 p-Phenylenediamine test의 4가지 방법을 사용하여 화분활력을 조사하였던 바 사용한 방법에 따라 크게 차이가 났다 (Rodriguez-Riano and Dafni 2000). 따라서 화분의 활력을 조사할 때 가장 신뢰성 있는 방법을 사용하여야 하는데 현재 약이나 소포자 배양 시에는 FDA가 가장 널리 사용되고 있다 (Heslop-Harrison et al. 1984).

유채의 소포자 배양 시 배양온도를 달리하여 20, 25, 32, 35℃에서 배양한 경우 소포자 활력은 온도가 높아짐에 따라 심하게 감소하였다. 또 소포자 활력은 배양온도뿐만 아니라 모식물의 생육온도와 배양온도 간의 차이에 따라 달라져서 온도 차이가 없거나 5℃ 미만일 때는 배양 2일 후에도 크게 감소하지 않았으나 온도 차이가 10℃ 이상일 경우에는 심하게 감소하였다 (Smykal and Pechan 2000). Kale의 약 배양 시에도 화분활력은 무처리에 비해 고온처리 시에 더 심하게 감소하였다 (Kieffer et al. 1993). 본 실험에서도 소포자 활력은 저온처리에 비해 고온처리 시에 더욱 심하게 감소하였는데 소포자에 가해지는 stress가 클수록 소포자 활력이 심하게 감소하며 저온처리에 비해 고온처리 시의 stress가 더 큰 것으로 생각된다.

해바라기의 소포자 배양 시 소포자 활력은 사용한 5가지 배지 중 N6 배지에서 높았다. 또 소포자 활력은 sucrose를 첨가한 배지에서보다는 maltose를 첨가한 배지에서 높았고 ethrel을 첨가한 경우 첨가하지 않은 배지에 비해 높았다 (Coumans and Zhong 1995). 보리의 약 배양 시에도 소포자 활력은 당을 첨가하지 않은 배지에 비해 2g/L의 glucose를 첨가하면 심하게 감소하였고 50g/L의 cellobiose, glucose, maltose, sucrose 등의 당을 첨가하면 더욱 심하게 감소하였다 (Kao 1993). 알파파의 약 배양 시 배양 1주 후의 소포자 활력은 배지에 첨가한 삼투압 조절제의 종류에 따라 달랐으며 사용한 9가지 중 sucrose와 glucose를 첨가했을 때 비교적 높았다. 소포자 활력은 식물생장조절제에 의해서도 영향을 받게되는데 cytokinin 첨가 시 첨가하지 않은 배지에 비해 높았으며 사용한 cytokinin의 종류에 따라서도 차이가 나서 2iP, BAP, zeatin, kinetin 중 2ip 첨가 시 높았다 (Tanner et al. 1990). 이와 같이 배양 중 소포자의 활력은 전처리 온도나 배양온도뿐만 아니라 사용한 배지에 따라서도 달라지게 된다. 비록 본 실험에서 배지에 따른 차이를 따로 조사하지는 못했으나 sucrose와 호르몬이 첨가된 약 배양 배지에 약을 치상한 후 온도처리를 하였으므로 sucrose가 첨가되지 않은 단순한 무기물 배지나 mannitol 용액에서 처리했을 때보다 더 심하게 감소하였을 것으로 추측되며 앞으로 배양 중 소포자 활력을 높이기 위해서는 사용할 배지의 조성을 고려하여야 할 것으로 생각된다.

본 실험 결과 소포자 활력은 저온처리에 비해 고온처리 시에 더 급속하게 감소하였으나 약 배양의 반응은 고온처리에서 높았다. Gyulai 등 (2000)이 실시한 고추의 약 배양 결과에서도 35℃에서 8일간 처리 시 소포자 활력은 치상 당시에 비해 심하게 감소하였으나 약 배양 반응은 감소하지 않았다. Kale (Kieffer et al. 1993)의 약 배양 시에나 담배 (Touraev et al. 1996)의 소포자 배양 시에도 고온에서 소포자 활력이 심하게 감소하였으나 배의 발생은 고온에서 높았다. 이와 같이 소포자 활력과 배의 발생과는 비례하지 않았으나 소포자 배는 활력 있는 소포자 중에서 발생하게 되는데 옥수수의 소포자 배양의 경우 활력 있는 소포자 중 20%가 배로 발달하였고 (Gaillard et al. 1991) 보리의 약 배양 시에도 활력 있는 소포자 중 66%가 분열하여 callus로 발달하였다 (Kao 1993). 전처리 온도, 소포자 활력 및 배 발생 간의 관계를 보면 담배의 소포자 배양 시 4, 25, 33, 37℃에서 3일간 전처리 시 4℃와 25℃ 처리에서는 배가 발생하지 않았으나 33℃와 37℃ 처리에서는 배 발생이 높았으며 33℃에 비해 37℃에서 더 높았다. 그러나 6일 처리 시에는 3일 처리에 비해 배 발생이 매우 낮았고 33℃에 비해 37℃에서 더 낮았는데 이는 37℃에서는 33℃에 비해 활력 있는 소포자가 매우 적기 때문이었다 (Touraev et al. 1996). 유채의 경우에도 소포자 활력은 20, 25, 32, 35℃에서 배양 시 온도가 높아짐에 따라 크게 감소하였는데 32℃와 35℃의 차이가 매우 커서 배양 24 시간 후의 소포자 활력이 32℃에서는 35~40%인 것이 35℃ 처리에서는 10~12%로 심하게 감소하였다. 그리고 배의 발생은 처리 온도 중 32℃에서 가장 높았고 35℃에서는 거의 없어 32℃가 생리적 상한 온도인 것으로 나타났다 (Smykal and Pechan 2000). 이상의 결과들에서처럼 전처리의 온도가 높을수록, 즉

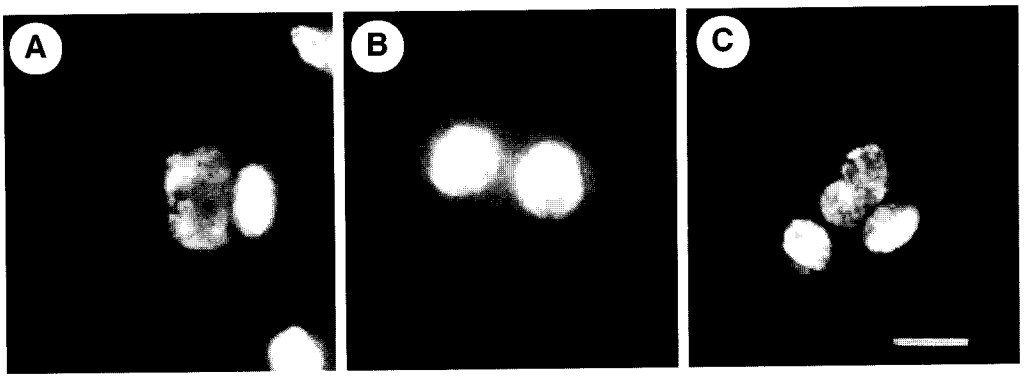

Figure 2. Cytological development of pepper microspores during temperature pretreatment observed with DAPI staining. A: Asymmetrically divided microspore, B: Symmetrically divided microspore with two equal nuclei, C: Multi-nucleate structure. Bar (20 μm) in C applies to all the figures.

stress가 클수록 소포자의 배 발생능은 높아지지만 활력있는 소포자는 감소하게 된다. 따라서 소포자 배 발생을 높이려면 소포자의 발달 경로를 바꾸는 데 충분한 고온처리에서도 소포자 활력이 높게 유지될 수 있는 생육 조건과 배양 조건을 밝히는 것이 매우 중요한 것으로 생각된다.

치상 당시 약 내 소포자들 중 65~70%는 소포자 분열 직전의 후기 소포자들이거나 분열중인 소포자들이지만 이미 소포자 분열이 끝나 초기 2세포 화분이 된 것들도 20% 이상으로 상당히 많이 있었으며, 액포가 발달되고 DNA가 합성되기 전의 증기 소포자들도 약 8% 이상이 있어 동일 약 내에서도 발달 단계가 다른 소포자들이 혼재하였다 (Table 2).

소포자는 치상 직후부터 변화가 생기기 시작하여 배양 2일 후부터는 균등 분열에 의해 생겨난 동형2핵 소포자, 불균등 분열에 의해 생긴 영양핵과 생식핵 중 영양핵이 분열하여 2개 또는 3개로 된 것 등의 배 발생적인 소포자들이 나타났으며 배양 기간이 경과함에 따라 다양한 유형의 다핵체가 나타나고 배 발생적인 소포자들이 증가하였다 (Figure 2). 배 발생적인 소포자들 중 동형2핵 소포자는 모든 처리에서 2일 후에 나타났으나 영양핵이 2~3개로 된 것이나 다핵체는 고온처리에서 빨리 나타났고 그 다음은 무처리였으며 저온처리 시에

Table 2. Cytological classification of microspores during temperature pretreatment in anther culture of *Capsicum annuum* L.

Pretreatment	Microspore stage (%)									
	days	MU[a]	LU	ASY	SY	2G+1V	G+2V	G+V(≥3)	Multi	Empty
Control (25℃)	0	8.1±2.1[b]	70.1±9.4	21.5±4.1						0.2±0.1
	2	0.9±0.5	17.1±3.1	23.5±6.8	4.3±1.4		0.3±0.1			53.9±3.8
	4	0.9±0.3	6.1±4.1	12.1±5.2	2.2±0.8		0.2±0.1	0.2±0.1		78.2±8.7
	7	0.6±0.2	2.1±1.3	6.3±1.2	1.1±0.7	0.2±0.1	0.5±0.2	0.2±0.2	0.5±0.2	88.5±7.5
	9	0.3±0.1	1.4±0.5	3.2±1.3	1.0±0.4	0.2±0.1	0.6±0.2	0.4±0.2	1.4±0.4	91.5±7.7
	14		1.7±0.7	1.6±1.1	1.8±0.1	0.3±0.2	0.6±0.3	0.3±0.1	1.7±0.7	92.0±9.2
Heat (32℃)	0	8.2±2.1	65.5±8.1	26.0±7.1						0.3±0.1
	2	2.0±0.8	6.5±3.5	26.3±6.4	4.2±3.1		1.6±0.4	0.2±0.1		59.2±3.2
	4	1.4±0.6	3.3±1.2	9.1±3.2	3.1±1.2		1.2±0.6	0.4±0.2	1.2±0.3	80.3±5.7
	7	0.1±0.1	0.8±0.6	3.2±1.2	2.4±0.8		1.3±0.2	0.4±0.2	1.6±0.2	90.2±8.7
	9		0.5±0.3	2.8±1.3	1.7±1.1		0.9±0.2	0.6±0.1	2.3±0.8	91.2±6.5
	14		1.1±0.4	0.6±0.4	2.6±1.2		1.2±0.1	0.5±0.3	1.8±0.7	92.2±4.7
Cold (4℃)	0	8.9±3.4	66.7±9.3	24.2±5.1						0.2±0.1
	2	7.5±4.1	50.9±4.2	37.9±7.4	3.1±0.7					0.6±0.2
	4	7.2±1.8	51.3±2.5	36.5±6.8	3.4±1.4		0.7±0.3			0.9±0.8
	7	7.1±2.3	44.0±1.8	41.7±8.3	2.7±2.4	0.4±0.2	1.1±0.1	0.2±0.1		2.8±1.3
	9	7.3±1.4	42.3±3.1	43.3±7.1	3.3±1.6	0.2±0.1	0.3±0.1	0.4±0.2	0.3±0.2	2.6±1.2
	14	7.0±1.1	42.2±2.8	44.2±6.4	2.6±0.8	0.3±0.1	0.5±0.2	0.3±0.3	0.2±0.1	2.7±1.2

[a]MU=mid-uninucleate vacuolate microspore; LU=late-uninucleate & mitotic microspore; ASY (SY)=asymmetric (symmetric) microspore; G+2V=1 generative type nucleus+2 vegetative type nucleus; 2G+1V=2 generative type nucleus+1 vegetative type nucleus; G+V (3≥)=1 generative type nucleus+multi vegetative type nucleus; Multi=multi-nucleated microspore; D=degenerating or empty microspore.
[b]Mean±standard error (SE).

제일 늦게 나타났다. 배 발생적인 소포자들의 발생 정도도 고온처리 시에 가장 높았고 그 다음은 무처리와 저온 처리 순이었다. 동형2핵 소포자들이 출현하는 정도는 고온처리 시에 다소 높았으나 처리 간에 큰 차이가 없었었다 (Table 2).

약을 치상한 후 2일이 되면 배 발생적인 소포자들뿐만 아니라 핵이 소실된 무핵 소포자들도 나타나는데 그 정도는 온도처리에 따라 크게 차이가 났다. 고온처리와 무처리에서는 그 정도가 매우 심해서 치상 당시에는 무핵 소포자가 0.2~0.3%로 매우 적었으나 치상 후 2일이 되면 무처리에서는 53.9%가 되었고 고온처리에서는 더 심해서 59.2%가 되었다. 무핵 소포자의 출현은 치상 기간이 경과함에 따라 점차적으로 많아져서 고온처리 시 치상 7일이 되면 90% 이상이 되었다. 그러나 고온이나 무처리에서와는 달리 저온처리에서는 치상 2일은 물론 14일이 되어도 무핵소포자의 출현이 3% 미만으로 매우 낮았다 (Table 2). 배양 중 나타나는 소포자들 중에는 배 발생적인 소포자나 무핵 소포자만이 아니라 생식세포가 분열하여 2개로 된 소포자들도 나타났는데 이러한 유형의 소포자는 치상 후 7일이 되었을 때 무처리와 저온처리에서만 나타났으며 고온처리에서는 나타나지 않았다 (Table 2).

치상 당시 약 내 소포자들은 대부분이 후기 소포자들이지만 2세포 화분이나 중기 소포자들도 있어 동일 약 내에서도 발달단계가 다른 소포자들이 혼재하였다. 이와 같이 동일한 꽃봉오리나 약 내에서도 발달단계가 다른 소포자들이 혼재하는 것은 정도의 차이가 있을 뿐 감자 (Rihova and Tupy 1999)와 유채 (Fan et al. 1988) 같은 식물을 비롯하여 대부분의 식물에서 유사한 것으로 보인다. 따라서 약 배양 시 약 내 주된 시기의 소포자뿐만 아니라 혼재한 소수의 소포자들도 반응을 나타낼 수 있을 것으로 생각되는데 간혹 성숙화분기의 약에서도 배양에 반응을 나타내는 것은 이러한 이유 때문인 것으로 추측된다.

유채(Fan et al. 1988; Zaki and Dickinson 1990; Smykal and Pechan 2000), 아스파라거스 (Peng et al. 1997), 감자 (Rihova and Tupy 1999) 등을 비롯하여 많은 식물에서 배양 중 소포자가 조포체로 발달하는 것은 균등분열 결과 생겨난 동형2핵 소포자로 알려져 있다. 또 동형2핵 소포자의 출현은 아스파라거스 (Peng et al. 1997)의 약 배양 시에는 4℃의 저온처리 시 증가하였고 유채 (Telmer et al. 1995)에서는 고온처리 시에 증가하였다. 그러나 콩 (Kaltchuk-Santos et al. 1997)의 약 배양 시 다핵체는 균등분열뿐만 아니라 불균등분열에 의해서도 생겨났으며 저온처리 시에도 동형2핵 소포자의 출현이 무처리에 비해 크게 증가하지 않았다. 또 유채의 소포자 배양 시 배양온도에 따라 소포자의 발달 방향이 달라지게 되어 32℃의 고온에서는 조포체로 되지만 18℃에서는 배우체로 된다. 이때 고온에서 조포체로 발달하게 되는 경로는 약내 소포자의 발달시기에 따라 달라서 1핵성 소포자기의 것들에서는 소포자핵이 균등분열하여 동형2핵 소포자로 되지만 2세포화분에서는 영양세포에서 균등분열이 일어나 다핵체로 된다 (Custers et al. 1996). 본 실험에서도 동형2핵소포자뿐만 아니라 영양핵과 생식핵으로 된 이형2핵 소포자들 중 영양핵이 분열하여 다핵체로된 것들이 생겨났으며 소포자 배의 발생은 고온처리 시 높았으나 동형2핵 소포자의 출현은 온도처리 간에 큰 차이가 없었다. 따라서 소포자 배의 기원이 식물에 따라 절대적인 것이라기보다는 고온처리와 같은 induction treatment 시 소포자의 발달시기에 따라 달라지는 것으로 생각된다.

아스파라거스의 약 배양 시 저온처리 기간이 길어짐에 따라 무핵소포자가 증가하여 14일 후에는 40% 정도가 되었다 (Peng et al. 1997). 또 콩의 약 배양 시 무핵소포자의 출현은 온도처리뿐 아니라 품종에 따라서도 달라지는데 RS7 품종의 경우 무처리에서는 거의 없었으나 4℃ 처리에서 높았으며 IAS5 품종에서는 무처리와 저온처리 간에 차이가 없이 배양기간이 경과함에 따라 증가하였다 (Kaltchuk-Santos et al. 1997). 본 실험에서도 배양 기간이 경과하면서 무핵 소포자가 증가하였는데 그 정도는 온도처리에 따라 크게 차이가 나서 고온과 무처리에서는 치상 2일 후부터 높게 나타났으나 저온처리에서는 매우 낮았다. 대부분의 식물에서 배양 기간이 경과함에 따라 무핵 소포자가 증가하게 되고 그 정도는 식물에 따라 또 같은 식물이라도 품종에 따라 달라지며 동일한 식물에서도 온도처리에 따라 달라지게 될 것으로 생각되지만 온도처리나 배양조건 등에 따른 변화를 명확하게 밝힌 연구가 많지 않다. 본 실험에서 소포자 배 발생이 높은 고온처리 시에 무핵 소포자의 출현이 높았는데 앞으로 소포자 배 발생 비율을 높일 수 있으려면 고온처리 시에 무핵 소포자의 발생을 최소화할 수 있는 조건들을 밝히는 것이 시급한 것으로 생각된다.

유채의 소포자 배양 시 온도를 달리하여 18, 25, 32℃에서 배양했을 때 배양 24시간이 되면 32℃에서는 소포자핵이나 2세포화분의 영양세포에서 균등분열이 일어나지만 18℃에서는 이와 같은 분열이 없었다. 배양 48시간이 되면 18℃에서도 극히 적은 소포자에서 균등분열이 일어나지만 계속해서 조포체로 발달하는 것은 매우 드물다. 그러나 25℃와 32℃에서는 균등분열이 일어난 소포자들은 계속 분열해서 배양 1주일이 되면 구형배가 생겨난다 (Custers et al. 1996). 본 실험에서도 저온처리 시 소포자 분열은 고온처리 시에 비해 소수의 소포자에서 늦게 일어났으며 분열이 일어난 소포자들도 계속해서 배로 발달하는 것은 매우 드물었다. 또 치상 후 7일이 되면 저온처리와 무처리에서는 생식세포가 분열하여 2개로 된 소포자들이 나타났으나 고온처리에서는 이러한 유형의 소포자들이 나타나지 않았다. 이와 같은 결과들은 고온처리에서는 소포자의 발달방향이 배양 초기부터 전환되어 조포체로 발달하지만 저온처리와 무처리에서는 대부분의 소포자들이 늦게까지 조포체로 전환되지 못한 상태로 있다가 일부가 배우체로 발달하게 됨으로 생겨난 것으로 보인다.

온도처리에 따른 약 배양 반응을 보면 배가 발생한 약의

Table 3. Effect of temperature pretreatment on the production of embryos in anther culture of *Capsicum annuum* L.

Pretreatment	Treatment days	No of anthers inoculated	% of anthers poducing embryos	No of embryos per 100 anthers
Control (25℃)	0[a]	280	7.9±1.4	15.8±0.8
Heat treatment (32℃)	2	225	11.3±2.9	21.4±3.0
	4	234	18.3±2.4	42.7±1.6
	7	236	12.7±1.4	19.8±1.8
	9	242	10.7±1.3	16.0±2.3
	14	243	8.1±2.3	12.9±2.8
Cold treatment (4℃)	2	230	8.1±1.6	20.7±1.4
	4	235	6.2±2.7	17.7±2.8
	7	243	5.3±1.2	9.3±1.6
	9	245	4.1±1.4	5.8±1.8
	14	220	2.1±1.5	3.1±1.3

[a]Mean±standard error (SE).

비율이나 100개의 약에서 발생한 소포자 배의 수 모두 고온처리에서 높았다. 배가 발생한 약의 비율은 저온 2일 처리 시에는 8.1%로 무처리 시의 7.9%와 거의 비슷하였으나 고온 4일 처리 시에는 18.3%로 약 2배나 높았다. 한편 100개의 약에서 발생한 배의 수도 저온처리 2일에서는 20.7개였으나 고온 4일 처리에서는 42.7개로 약 2배가 되어 약의 반응은 물론 약의 배 생산능도 고온처리에서 높았다 (Table 3). 소포자 배 발생에 가장 효과적인 처리기간은 2, 4, 7, 9, 14일 간 처리 중 저온처리에서는 2일이었고 고온처리에서는 4일이었다. 저온처리 시에는 처리기간이 길어질수록 약 배양 반응이 감소하였다. 고온처리 시에도 약 배양 반응은 처리기간이 길어질수록 4일 처리에 비해 감소하였으나 2일 처리를 비롯한 기타 모든 처리에서도 저온 2일 처리보다는 높았거나 비슷하였다 (Table 3).

고추의 소포자 배 발생에는 저온처리에 비해 고온처리가 효과적인 것으로 나타났는데 온도처리는 약 배양 반응에만 영향을 미치는 것이 아니라 유기된 배의 특성에도 영향을 미쳤다. 즉, 고온처리에서 발생한 배 중에는 비정상적인 배의 발생이 거의 없었으며 대부분이 동일한 배지에서 또는 호르몬을 첨가하지 않은 배지로 옮겼을 때 정상적인 유식물로 생장하였다. 그러나 저온처리 시 발생한 배 중에는 치밀한 조직의 배 발생성 캘러스와 구형배를 구별하기 어려운 경우가 많았으며 이런 배 발생적 캘러스는 대부분 동일한 배지에서 캘러스로 증식하였고 발생한 배도 정상적으로 생장하지 못하고 이상 비대해지거나 캘러스화하는 경우가 많았다. 본 실험의 결과 약 배양 반응은 저온과 고온처리 중 고온처리에서 높았으며 발생한 배도 정상적으로 생육하여 고추의 약 배양에는 저온처리에 비해 고온처리가 효과적인 것으로 나타났는데 이는 기존의 발표결과와 일치한다 (Kim 1999).

귀리의 약 배양 시 32℃에서 5일 처리 시 배 발생이 높았고 4℃에서는 7일 처리 시 약 배양 반응이 다소 높았으나 배가 아닌 callus가 발생하였다 (Kiviharju and Pehu 1998). 또 유채의 소포자 배양 시에도 온도에 따라 배양 중인 소포자의 발달 방향이 완전히 달라져서 18℃에서는 배우체인 화분으로 발달하고 32℃에서는 조포체인 배로 발달하였다 (Custers et al. 1996). 이와 같이 온도 전처리나 배양온도에 따라 소포자의 발달 방향이 달라지게 되며 소포자 배 발생에는 많은 식물에서 고온처리가 효과적인 것으로 알려져 있다. 그러나 본 실험 결과 고온처리 시 약 배양 반응이 높아 소포자 배 발생이 높았지만 소포자 활력이 심하게 감소하고 무핵화분이 증가하였다. 따라서 보다 많은 소포자 배를 용이하게 획득할 수 있으려면 소포자의 발달방향을 바꾸는 데 적합한 고온에서도 소포자활력이 높고 무핵화분이 증가되지 않는 배양조건을 구명하는 것이 시급한 과제로 생각된다.

적 요

고추의 약을 배지에 치상한 후 4℃와 32℃의 온도 전처리가 소포자의 활력, 초기분열 및 소포자 배 발생에 미치는 영향을 조사하였다. 활력 있는 소포자의 비율은 모 식물에서 채취하여 치상할 당시에는 62~64% 정도였으나 치상 후 온도처리 기간 중에는 매우 급속하게 저하되었다. 소포자의 활력은 4℃ 처리에 비해 32℃ 처리 시에 더욱 심하게 감소하였으며 배양 9일이 되면 온도처리와 관계없이 활력 있는 소포자가 거의 없었다. 치상 당시의 소포자는 대부분이 후기 1핵성 소포자기였으며 배양 2일 후부터 핵이 소실된 무핵 소포자들과 함께 다양한 유형의 다핵 소포자들이 나타났다. 배 발생적 소포자의 비율은 고온처리에서 높았으나 균등분열에 의한 동형2핵 소포자의 출현에는 온도처리에 따른 차이가 크지 않았으며 다핵 소포자들은 균등 또는 불균등 분열에 의해 생겨났다. 25℃와 32℃ 처리에서는 배양 2일 후에 이미 퇴화 소포자들이 50% 이상이 되었는데 4℃ 처리에서는 14일 동안 대부분의 소포자들에서 핵이 완전하였다. 소포자 배의 발생은 4℃ 처리에 비해 32℃ 처리에서 높았으며 가장 효과적인 고온처리 기간은 4일이었다. 이에 비해 4℃ 처리에서는 2일 처리가

가장 효과적이었으며 처리기간이 길어질수록 소포자 배의 발생이 감소되었다.

사사 - 실험을 도와준 김진애 양과 홍정표 군에게 감사합니다.

인용문헌

Arnison PG, Donaldson P, Ho LCC, Keller WA (1990) The influence of various physical parameters on anther culture of Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). Plant Cell Tissue Org Cult **20**:147-155

Biddington NL, Robinson HT (1991) Ethylene production during anther culture of brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. gemmigera) and its relationship with factors that affect embryo production. Plant Cell Tissue Org Cult **25**:169-177

Coumans M, Zhong D (1995) Doubled haploid sunflower (*Helianthus annuus*) plant production by androgenesis: fact or artifact? Part 2. *In vitro* isolated microspore culture. Plant Cell Tissue Org Cult **41**:203-209

Custers JBM, Cordewener JHG, Dons HJM, Campagne MML (1996) Regulation of inductive phase of microspore embryogenesis in *Brassica napus*. Acta Hort **407**:209-217

Dumas de Vaulx R, Chambonnet D, Pochard E (1981) In vitro culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) anthers; high rate plant production from different genotypes by+35℃ treatment. Agronomie **1**:859-864

Fabijanski SF, Altosaar I, Arnison G (1991) Heat shock response during anther culture of broccoli (*Brassica oleracea* var *italica*). Plant Cell Tissue Org Cult **26**:203-212

Fan Z, Armstrong C, Keller WA (1988) Development of microspore *in vivo* and *in vitro* in *Brassica napus* L. Protoplasma **147**:191-199

Gaillard A, Vergne P, Beckert M (1991) Optimization of maize microspore isolation and culture conditions for reliable plant regeneration. Plant Cell Rep **10**:55-58

Gustafson VD, Baenziger SP, Wright MS, Stroup WW, Yen Y (1995) Isolated wheat microspore culture. Plant Cell Tissue Org Cult **42**:207-213

Gyulai G, Gemesne A, Sagi Zs, Venczel G, Pinter P, Kristof Z, Torek O, Heszky L, Bottka S, Kiss J, Zatyko L (2000) Doubled haploid development and PCR-analysis of F_1 hybrid derived DH-R2 paprika (*Capsicum annuum* L.) lines. J Plant Physiol **156**:168-174

Hause B, Hause G, Pechan P, VanLammeren AAM (1993) Cytoskeletal changes in induction of embryogenesis in microspore and pollen cultures of *Brassica napus* L. Cell Biol Intl **17**:153-168

Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y, Shivanna KR (1984) The evaluation of pollen quality and of further appraisal of the fluorochromatic (FRC) test procedure. Theor Appl Genet **67**:367-375

Kaltchuk-Santos E, Mariath JE, Mundstock E, Hu C, Bodanese-Zanettini MH (1997) Cytological analysis of early microspore divisions and embryo formation in cultured soybean anthers. Plant Cell Tissue Org Cult **49**:107-115

Kao KN (1993) Viability, cell division and microcallus formation of barley microspores in culture. Plant Cell Rep **12**:366-369

Keller WA, Armstrong KC (1977) Embryogenesis and plant regeneration in *Brassica napus* anther cultures. Can J Bot **55**: 1383-1388

Keller WA, Armstrong KC (1979) Stimulation of embryogenesis and haploid production in *Brassica campestris* anther cultures by elevated temperature treatments. Theor Appl Genet **55**:65-67

Kieffer M, Fuller MP, Chauvin JE, Schlesser A (1993) Anther culture of kale (*Brassica oleracea* L. convar. *acephala* (DC.) *Alef.*). Plant Cell Tissue Org Cult **33**:303-313

Kim MZ (1999) The influence of temperature pretreatment on the production of microspore embryos in anther culture of *Capsicum annuum* L. Kor J Plant Tiss Cult **26**:71-76

Kim MZ, Jang IC (2000) Rapid assesment of microspore development stage in pepper using DAPI and ferric chloride. J Plant Biotechnology **2**:129-134.

Kiviharju E, Pehu E (1998) The effect of cold and heat pretreatments on anther culture response of *Avena sativa* and *A. sterilis*. Plant Cell Tissue Org Cult **54**:97-104

Li H, Qureshi JH, Kartha KK (1988) The influence of different temperature treatments on anther culture response of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) Plant Sci **57**:55-61

Magnard JL, Vergene P, Dumas C (1996) Complexity and genetic variability of heat-shock protein expression in isolated maize microspores. Plant Physiol **111**:1085-1096

Marsolais AA, Seguin-Swartz G, Kasha KJ (1984) The influence of anther cold pretreatments and donor plant genotypes on in vitro androgenesis in wheat. Plant Cell Tissue Org Cult **3**:69-79

McGregor LJ, McHughen A (1990) The influence of various cultural factors on anther culture of four cultivars of spring wheat (*Triticum aestivum* L.). Can J Plant Sci **70**:183-191

Peng M, Ziauddin A, Wolyn DJ (1997) Development of asparagus microspores in vivo and in vitro is influenced by gametogenic stages and cold treatment. In Vitro Cell Dev Biol **33**:263-268

Regner F (1996) Anther and microspore culture in *Capsicum*, In SM Jain, SK Sopory, RE Veilleux, eds, In vitro haploid production in higher plants. **3**:77-89 Kluwer Academic Publisher, Netherlands

Rihova L, Tupy J (1999) Manipulation of division symmetry and developmental fate in cultures of potato microspores. Plant Cell Tissue Org Cult **59**:135-145

Rodriguez-Riano T, Dafni A (2000) A new procedure to asses pollen viability. Sex Plant Reprod **12**:241-244

Smykal P, Pechan PM (2000) Stress, as assessed by the appear-

ance of sHsp transcripts, is required but not sufficient to initiate androgenesis. Physiol Plant **110**:135-143

Tanner GJ, Piccirilli M, Moore AE, Larkin PJ, Arcioni S (1990) Initiation of non-physiological division and manipulation of developmental pathway in cultured microspores of *Medicago* sp. Protoplasma **158**:165-175

Takahata Y, Komatzu H, Kaizuma N (1996) Microspore culture of radish (*Raphanus sativus* L.): influence of genotype and culture conditions on embryogenesis. Plant Cell Rep **16**:163-166

Telmer CA, Newcomb W, Simmonds DH (1995) Cellular changes during heat shock induction and embryo development of cultured microspores of *Brassica napus* cv. Topas. Protoplasma **185**:106-112

Tiainen T (1992) The influence of culture conditions on anther culture response of commercial varieties of *Solanum tuberosum* L. Plant Cell Tissue Org Cult **30**:211-219

Touraev A, Ilham A, Vicente O, Heberle-Bors E (1996) Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco; an optimized system for molecular studies. Pant Cell Rep **15**:561-565

Zaki MAM, Dickinson HG (1990) Structural changes during the first divisions of embryos resulting from anther and microspore culture in *Brassica napus*. Protoplasma **156**:149-162

(접수일자 2001년 8월 15일)