

고추의 나출 소포자 배양 시 전처리 기간, 2-Hydroxynicotinic Acid 및 약-공동전처리가 소포자배 발생에 미치는 영향

박은준, 김진애, 이종숙, 장인창, 윤미정, 정상호, 김문자*
목원대학교 생명과학과

The Influence of Pretreatment Period, 2-Hydroxynicotinic Acid and Anther Co-pretreatment on Embryo Induction in Isolated Microspore Culture of *Capsicum annuum* L.

Eun-Joon Park, Jin-Ae Kim, Jong-Suk Lee, In-Chang Jang, Michung Yoon, Sang-Ho Chung, Moonza Kim*
Department Life science Mokwon University, Daejeon 305-729, Korea

ABSTRACT Microspores were isolated from pepper (*Capsicum annuum* L.) anthers by using a micro-blender and cultured in modified NLN medium at 25°C. The influence of pretreatment period at 32°C, adding the 2-hydroxynicotinic acid to a pretreatment medium, and co-pretreatment anthers with microscopes on the induction of embryo were examined. Globular and torpedo embryos were observed from 3 weeks after culture. Embryo development was not synchronized within culture. After 4 weeks in culture, in addition to globular and torpedo embryos, cotyledonary embryos were observed. Normal cotyledonary embryos developed into plantlets when transferred to a solid hormone free B5 medium containing 2% sucrose. Embryo yields were significantly higher after 1- and 2-day pretreatment at 32°C. However the development of embryo ceased at the globular or heart stage. In contrast, embryo yields were lower after 3- to 6-day pretreatment at 32°C and embryo developed at the cotyledonary stage. After adding the 2-hydroxynicotinic acid to anther pretreatment solution, embryo yields were slightly increased. However most embryos occurred were at the globular or heart stage. Co-pretreatment of microspores with anthers was deleterious for embryo induction and development. AS far as we know, this is the first report of success in obtaining high frequency of embryogenesis and plantlets formation from isolated microspores of pepper. Although the culture conditions have to be optimized further, this promising microspore culture system can be used for genetic transformation, selection for dominant and recessive traits as well as for the production of homozygous doubled haploid plants.

Key words: Androgenesis, microspore embryogenesis

서 론

소포자 또는 미숙 화분에서 유래된 반수체는 배양 중 자연적으로 배가되기도 하고 콜히친과 같은 antimicrotubular

chemical를 처리하여 당대에 배가 반수체를 만들 수 있으므로 육종에 매우 유용하게 이용될 수 있다. 지금까지 반수체를 생산하는 방법으로 약배양이 널리 이용되어 왔으나 최근에는 적기의 꽃봉오리에서 기계적으로 소포자를 나출시킨 후 배양하여 캘러스나 배를 생산하는 소포자 배양 방법이 발달되었다. 이 방법은 *Brassica* 속 식물을 비롯하여 (Lichter 1982; Chuong and Beversdorf 1985; Baillie et al.

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

1992), 벼 (Raina and Irfan 1998), 밀 (Datta and Wenzel 1987; Hu and Kasha 1997), 보리 (Hoekstra et al. 1992; Cistué et al. 1995), 옥수수 (Pescitelli et al. 1990), 사과 (Höfer 2004) 등 많은 식물에서 성공하게 되어 약 배양을 대신하게 되었다.

약 배양은 약벽 조직의 증식으로 2배체인 체세포 유래의 캘러스가 생겨날 수 있고, 각기 다른 화분 유래의 캘러스가 융합하여 재분화 될 경우 키메라 식물체 (chimeric plant)가 생겨날 수 있으며, 소포자가 약벽에 둘러싸여 있기 때문에 분자수준에서의 배발생과 돌연변이 연구에 불리하다. 이에 비해 소포자 배양은 나출 소포자만을 배양하므로 약벽 조직과 같은 체세포 조직에서 배가 형성될 염려가 없으며, 많은 식물의 경우 소포자가 바로 배로 발달하므로 단기간에 반수체를 획득할 수 있으며, 약배양에 비해 배의 발생 비율이 높다. 더욱이 약배양과 달리 평판 재료가 반수성인 단세포 집단이므로 분자수준에서의 배 발생 연구는 물론, 돌연변이 유기 (Swanson et al. 1989; Castillo et al. 2001)와 형질전환 (Jahne et al. 1994; Stoger et al. 1995)에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

소포자 배양 시 배의 발생은 모식물의 품종이나 생리적 상태, 소포자의 발달 시기, 배지의 조성 및 배양 조건 등에 의해 크게 영향을 받는다. 배양 소포자는 *in vivo*에서 원래 배우체인 화분으로 발달될 것이었는데 배양에 의해 발달 방향을 바꾸어 조포체인 배로 발달하도록 하는 것이다. 따라서 소포자 배양에 성공하여 배를 획득할 수 있으려면 배양 소포자가 배형성 소포자 (embryogenic microspore)로 되어 분열능을 갖게 하는 것이 중요한데 이를 위해서는 적절한 전처리가 필요하다. 전처리 중 가장 널리 이용되고 있는 것이 온도처리이며 이외에 sucrose나 질소의 기아처리, antimicrotubular chemical이나 inducer chemical의 첨가 등이 효과적이며 전처리 시에 사용되는 배지의 조성이나 재료도 배 발생에 크게 영향을 미친다.

소포자 유래의 배나 캘러스 유가에 적합한 전처리 온도와 기간은 식물에 따라 다른데 가지의 경우 25°C, 30°C, 32.5°C, 35°C의 처리 중 다소 높은 온도인 35°C에서 5일 간 처리 시 소포자 유래의 캘러스 발생이 높고 (Miyoshi 1996), 아스파라거스의 경우 4°C의 저온에서 7~9 일 간 꽃봉오리를 전처리 한 후 나출한 소포자에서 캘러스가 발생한다 (Peng and Wolyn 1999). 또 옥수수에서는 15°C에서 4일 간 처리 시 무처리에 비해 embryo-like structure (ELS)의 발생이 2배 이상 높다 (Pescitelli et al. 1990). 그러나 유체를 비롯하여 밀, 보리 등 많은 식물의 경우 소포자배는 30~33°C의 고온에 약이나 소포자를 수일간 처리함으로써 유기된다 (Baillie et al. 1992; Telmer et al. 1993; Touraev et al. 1996).

전처리 시 온도 뿐만 아니라 배지의 조성도 배의 유도에 크게 영향을 미치는데 담배에서는 미성숙 2세포 화분을 0.4

M mannitol 용액만을 사용하여 30°C에서 3일간 전처리한 후 치상배지로 옮기면 배가 유기된다 (Kyo and Harada 1985). 또 sucrose와 glutamine이 첨가되지 않은 배지에서 배양 한 후 이들이 첨가된 배지로 옮기면 조포체로 분열한다 (Kyo and Harada 1986). 담배 뿐만 아니라 보리 (Hoekstra et al. 1992), 밀 (Touraev et al. 1996), 벼 (Raina and Irfan 1998) 등의 식물에서도 평판 전 sucrose가 첨가되지 않은 기아배지에서의 전처리가 배의 유기에 효과적인 것이 알려지면서 배지 조성은 식물에 따라 다소 차이가 있지만 많은 식물의 전처리 시 sucrose가 첨가되지 않은 기아배지가 사용되고 있다.

전처리 배지에 콜히친, trifluralin, ozalin과 같은 antimicrotubular chemical들을 첨가하면 소포자배의 발생에 영향을 미치는데 이중 배의 유기에 가장 효과적인 것이 콜히친이다. Zhao 등 (1996)은 유채 (*Brassica napus*)에서 고온처리 없이 25 µM의 콜히친에서 42 시간 처리한 후 배양하면 치상 소포자 중 15% 이상에서 배가 발생하므로 콜히친 첨가가 고온처리를 대신할 수 있다고 하였다. Antimicrotubular chemical 이외에 여러 가지 화합물이 소포자배 유기에 효과적인 것으로 알려져 있는데 가장 널리 사용되고 있는 것이 2-hydroxynicotinic acid (2-HNA)이다. 밀의 경우 2-HNA가 첨가된 배지에서 전처리 하면 배뿐만 아니라 녹색 식물체도 높은 비율로 발생한다. 또 2-HNA 보다는 그 효과가 다소 떨어지지만 benzotriazole-5-carboxylic acid와 violuric acid monohydrate가 첨가된 배지에서 전처리 하면 소포자의 활력이 높게 유지되고 배의 발생에 효과적이다 (Zheng et al. 2001). Oligosaccharide들도 배의 발생에 영향을 미치는데 *Brassica oleracea*에서는 사용한 8 종류의 oligosaccharide들 중 carrageenan oligomers가 효과적이며 고온처리와 동시에 실시하면 배의 발생이 2배로 증가한다 (Penhuizic et al. 2001). 소포자배의 발생은 전처리 재료에 따라 서로 영향을 받는데 식물에 따라 이삭 (Datta and Wenzel 1987; Liu et al. 2002), 꽃봉오리 (Lichter 1982), 약 (Hu and Kash 1997), 또는 나출 소포자 (Touraev et al. 1996)를 전처리 하는 등 여러 가지 경우가 있다.

현재 소포자 배양이 잘되는 식물들은 유체를 비롯하여 밀, 보리 등 소수의 식물에 국한 되어있다. 고추의 경우 Testillano 등 (1995)과 Regner 등 (1996)에 의해 소포자 배양이 시도되었으나 소수의 다핵 소포자 또는 다세포체만 획득하였을 뿐 아직까지 다수의 배를 획득한 보고는 없다. 최근 Barany (2001) 등은 소포자 배양을 실시하여 소포자 유래의 배와 식물체를 획득하였다고 보고하였으나 소수의 다핵체와 1~2개의 발아된 유식물체를 획득하였을 뿐이다. 본 연구에서는 고추의 소포자 배양 시스템을 확립할 목적으로 나출 소포자를 배양하여 다수의 배와 식물체를 획득하였으며, 32°C의 고온처리 기간, 전처리 시 inducer chemical인 2-HNA의 첨가, 그리고 소포자와 약의 공동전처리가 배의 발생에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

식물 재료

본 실험에서는 고추 (*Capsicum annuum* L.)의 밀양재래 품종을 사용하였다. 전년도에 채종한 종자를 직경 20 cm 화분에 파종하여 본엽이 2~3매 출현했을 때 생육정도가 비슷한 유묘들을 선발하여 직경 25 cm 화분에 이식하였으며 매주 파종하여 연중 재료 채취가 가능하도록 하였다. 유묘 이식 시 흙은 시판되고 있는 원예용 상토 (부농상토)를 사용하였으며 화분 전용 복합비료인 파워스톤 (질소 10%, 인산 5%, 수용성 가리 10%)을 한 화분 당 8 g씩 섞어 준비하였다. 식물은 광주기가 16/8 (명/암)시간이며, 온도가 광상태에서는 24°C, 암상태에서는 20°C인 성장실에서 생육시켰다. 성장실의 광도는 형광등과 메탈램프를 이용하여 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 가 되도록 유지하였고, 상대습도는 60%가 되게 하였다. 식물 성장을 위해 관수는 2~3일마다, 시비는 유묘 이식 2주 후부터 1주일 간격으로 실시하였다. 수세가 약화되는 것을 방지하기 위해 관수 시마다 적기까지 지난 꽃봉오리를 제거하였으며 개화 후 4주 까지만 재료로 사용하였다.

꽃봉오리는 꽃받침과 꽃잎의 길이가 거의 같은 것을 채취하여 2% sodium hypochlorite 용액에 10분간 멸균시킨 다음 멸균수로 3~4회 수세하였다. 채취한 꽃봉오리 내의 약은 1/4~3/4이 보라색으로 착색되어 있는 것으로 배 유기에 적기로 알려진 후기 1핵성 소포자나 초기 2핵성 화분이 내포되어 있었다.

전처리

약전처리 시에는 멸균한 꽃봉오리에서 약을 꺼낸 후 전처리 배지 3 mL이 들어있는 60×15 mm Petri dish에 30개씩 치상하여 파라필름으로 봉하였다. 건조를 막기 위해 멸균수로 적신 filter-paper가 들어있는 140×20 mm Petri dish에 넣어 다시 파라필름으로 봉한 후 32±1°C에서 3일간 처리하였다. 전처리 배지는 보리의 소포자 배양 시 사용되고 있는 것으로 6종의 무기물 용액에 0.37 M mannitol이 첨가된 기아배지를 사용하였다 (Hoekstra et al. 1992). 소포자 전처리 시에는 밀도가 1 mL 당 약 2×10^5 이 되도록 hemocytometer를 사용해 조정된 후 60×15 mm Petri dish에 3 mL씩 분주하여 파라필름으로 밀봉한 후 약전처리 시와 동일한 조건에서 고온처리 하였다.

고온처리 기간이 소포자배 발생에 미치는 영향을 조사하기 위한 실험에서는 32°C에서 1, 2, 3, 4, 5, 6일로 처리기간을 달리하여 약전처리를 한 후 소포자를 나출하여 배양하였다. 고온처리 후 소포자의 활력은 Heslop-Harrison (1992)의 방법에 따라 Fluorescein diacetate (FDA, Sigma) 2 mg

을 1 mL의 acetone에 녹여 stock solution을 만들어 보관한 후 필요에 따라 stock solution 2 μL 를 1 mL의 증류수에 희석하여 사용하였다. 2-Hydroxynicotinic acid (2-HNA, Aldrich)가 소포자배 발생에 미치는 영향을 조사하기 위한 실험에서는 전처리 배지에 2-HNA를 0, 25, 50, 100 mg/L로 농도를 달리하여 첨가한 후 32°C에서 3일간 약전처리를 실시하였다. 소포자 전처리시 약 공동배양이 소포자배 발생에 미치는 영향을 조사하기 위한 실험에서는 밀도가 1 mL당 2×10^5 로 조정된 소포자 현탁액 3 mL이 들어있는 60×15 mm Petri dish에 꽃봉오리로부터 적출한 약을 10개씩 치상하여 32°C에서 3일간 처리를 하였다.

소포자의 나출 및 수확

고온처리가 끝난 약을 micro-blender container (stainless steel waring blender container 20 mL, DAIGGER)에 모은 후 전처리배지 10 mL을 첨가하고 고속 (16,000~18,000 rpm)에서 10초씩 2회 blending하여 소포자를 나출시킨 후 50 mL 튜브에 모았다. 약 내의 남아 있는 소포자를 꺼내기 위해 전처리 배지 10 mL을 첨가하여 고속에서 20초씩 2회 vortexing 하였다. 구멍의 크기가 75 μm 와 38 μm 인 체를 사용하여 크기가 큰 약벽과 같은 체세포 조직 파편들을 제거한 후 소포자 현탁액을 50 mL 튜브에 모아 1,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 하여 소포자 pellet을 모았다. 상등액을 제거한 후 소포자 pellet에 전처리 배지 20 mL을 다시 첨가하여 vortexing한 후 1,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였으며 이와 같은 수세 과정을 2회 실시하였다. 소포자 전처리 시에는 멸균한 꽃봉오리에서 적기의 약을 꺼낸 후 약전처리 시와 동일한 방법으로 소포자를 나출하였다.

소포자 배양

수세가 끝난 소포자는 50 mL 튜브로 옮긴 후 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 전처리 배지를 제거하고 치상 배지를 첨가하여 소포자 밀도가 1 mL 당 1×10^5 이 되도록 조정하였다. 60×15 mm Petri dish에 2.5 mL씩 분주하여 파라필름으로 봉한 후 투명한 플라스틱 용기에 넣어 25°C 암 상태에서 배양하였다. 치상 배지는 10% sucrose가 첨가된 NLN 배지 (Swanson 1990)를 사용하였으며, pH가 5.8~6.0이 되도록 NaOH로 조정된 후 0.45 μm 와 0.22 μm 의 membrane을 사용하여 여과 멸균하였다.

결과조사

실험은 5~7 반복씩 2회 이상 실시하였다. 배양 4주 후 해부 현미경 10배의 배율 하에서 dish 당 발생한 배를 계수하여 평균과 표준오차를 구하였다. 이때 크기가 0.3 mm 이

하의 구형배는 계수하지 않았으며 자엽배는 sucrose 2%와 phytigel 0.25%가 첨가된 B5 (Gamborg et al. 1976) 고체 배지로 옮겨 유식물로 발달시켰다.

결과 및 고찰

소포자배의 발생 및 유식물체의 발달

Micro-blender를 사용하여 약을 blending 하고 다시 vortexing 한 결과 다량의 소포자들이 나출 되었다 (Figure 1A). 나출된 소포자들을 전처리 배지로 수세하여 NLN 배지에 배양하면 배양 3주 후부터 구형배가 발생하기 시작하고, 4주가 되면 자엽배들이 발생하였다. 이때 배의 발달이 비동조적으로 일어나서 배양 4주 시에는 자엽배 뿐만 아니라 구형배, 심장형배 및 어뢰형배들이 혼재하였으며 매우 작은 크기의 구형 배들과 cell colony들도 존재하였다 (Figure 1B). 발생한 배들 중 자엽배들은 호르몬이 첨가되지 않은 B5 고체 배지로 옮겼을 때 약 3주후 정상인 유식물들로 발달하였다 (Figure 1C). 본 실험 결과 다수의 배가 발생하였는데 이는 사용한 기아 전처리 배지와 32°C에서 3일간의 고온처리 및 소포자 배양시 사용한 NLN 배지가 고추의 소포자배 발생에 비교적 적합하였기 때문인 것으로 생각된다.

전처리 기간이 소포자배의 발생에 미치는 영향

32°C의 고온처리시 소포자배의 발생에 최적인 처리기간을 밝히기 위해 1일에서 6일 까지 기간을 달리하여 전처리 한 후 소포자의 활력과 배의 발생을 조사하였다. 활력있는 소포자의 비율은 고온처리 1일 후에는 29.6%이었으며 2일 처리에서는 33%로 1일 처리에 비해 오히려 높았으며 6일 처리 후에도 27.1%로 1일 처리에 비해 다소 낮아지기는 하였으나 큰 차이가 없었다. 이와 같이 고온처리 1일부터 6일 까지의 소포자 활력은 27~33%로 처리기간에 따른 차이가 크지 않았다 (Figure 2). Dish 당 소포자배의 발생은 고온처

리 1일에서는 58개이고 2일 처리 시에는 68개이었으나 3일 이상 처리에서는 20개 이하로 크게 감소하였다. 배의 발달도 처리기간에 따라 크게 차이가 나서 1일 처리 후에는 발생한 배 58개 중 43개가 구형배이었고 심장형이나 어뢰형 배는 15개이었다. 계수하지는 않았으나 매우 적은 크기의 구형배들이 많이 발생하는 경우도 있었으며 어뢰형배도 2일 이상 처리 후에 발생한 것들에 비해 크기가 작았다. 소수의 ELS가 발생하였는데 이들도 크기가 작았다. 고온처리 2일의 경우에는 발생한 배 68개 중 구형배가 26개인데 비해 어뢰형배는 37개이었다. ELS도 1일 처리 시 0.8개인데 비하여 5.8개로 7배나 많이 발생하였고 크기도 큰 것들이었다. 고온 3일 이상 처리에서는 1일이나 2일 처리 시와는 다르게 자엽시기의 배가 발생하였다. ELS도 2일 이하의 처리 시에 비해 많이 발생하였으며 크기도 컸다 (Table 1, Figure 3).

나출 소포자 배양시 배나 캘러스의 유기에 적합한 전처리 온도는 식물에 따라 다른데 가지의 경우 다소 높은 온도인 35°C에서 소포자 유래의 캘러스가 발생하고 (Miyoshi 1996), 아스파라거스의 경우 4°C의 저온에서 꽃봉오리를 전처리 한 후 나출한 소포자에서 캘러스가 발생한다 (Peng and Wolyn 1999). 또 옥수수에서는 15°C에서 전처리 했을 때 무처리에 비해 ELS의 발생이 2배로 높다 (Pescitelli et al. 1990). 그러나 유채를 비롯하여 밀, 보리 등 많은 식물의 경우 소포자배는 30~33°C의 고온처리 시 발생하는 경우가 많다 (Baillie et al. 1992; Telmer et al. 1993; Touraev et al. 1996). 소포자배 발생에 적합한 전처리 온도는 동일한 식물에서도 화분 발달 단계에 따라 달라지는데 *Brassica napus* L.의 경우 소포자 및 초기 2세포 화분에서는 32°C에서 48시간 처리시 조포체로 분열하지만 후기 2세포 화분에서는 조포체로의 분열이 일어나지 않으며 41°C의 고온에서 1~2시간 처리 한 경우에만 영양세포가 분열하여 조포체로 발달한다 (Binarova et al. 1997). 고추의 약배양 시 소포자배는 후기 1핵성 소포자나 초기 2세포의 영양세포에서 유래되며 (Kim et al. 2004), 32°C의 고온전처리가 배 발생에 효과적이다 (Dumas de Vaulx et al. 1981; Kim 1999). 따라서

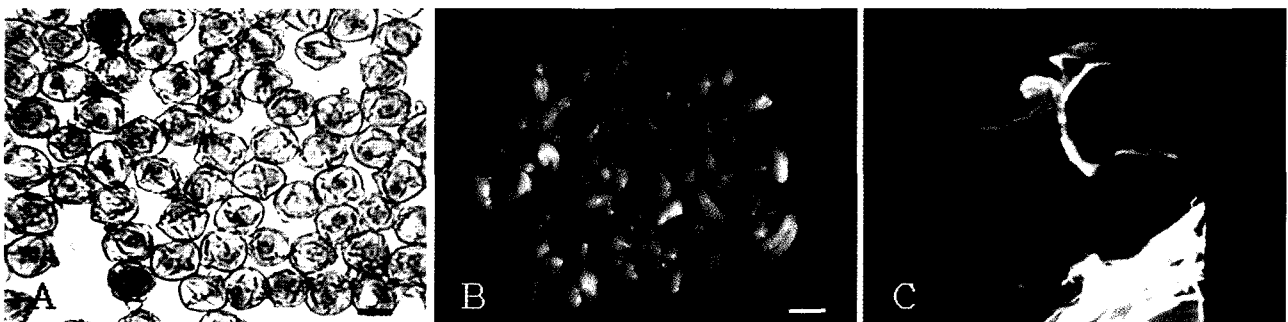


Figure 1. The development of embryos and plantlet regeneration from isolated microspores. (A) Microspores immediately after isolation. (B) Embryos formed after 4 weeks in NLN medium. (C) Germinated embryos (plantlets) at 21 days on regeneration medium. Bar in (A) is 20 μ m and in (B) is 1 mm.

Table 1. Effect of pretreatment period at 32°C on the induction of embryos in isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.)

Days	No. of embryos/plate ^a			No. of ELS ^b /plate	No. of total embryos/plate
	globular	heart or torpedo	cotyledonally		
1	42.9 ± 13.5	14.9 ± 5.5	0	0.8 ± 0.3	57.9 ± 7.9
2	26.0 ± 6.9	36.6 ± 5.7	0	5.8 ± 0.5	68.4 ± 7.4
3	5.3 ± 2.3	3.0 ± 1.2	0.8 ± 0.5	9.7 ± 0.3	18.5 ± 0.3
4	0.8 ± 0.4	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.7	11.8 ± 5.2	15.3 ± 5.6
5	2.3 ± 2.1	1.9 ± 0.4	1.8 ± 0.6	12.8 ± 5.2	18.9 ± 7.2
6	1.3 ± 0.3	1.5 ± 0.3	2.3 ± 0.3	14.5 ± 2.6	19.1 ± 1.6

^aEach number is a mean (n=6) ± standard error

^bELS = Embryo-like structure.

본 소포자 배양에서도 32°C의 고온처리를 실시하였던바 다수의 배가 발생하였다.

소포자배 유기에 적합한 고온처리 기간은 식물에 따라 다른데 유채에서는 32°C에서 1~3일 처리한 경우 배의 발생이 2일 처리 시 가장 높았으며 (Baillie et al. 1992), 밀 (*Triticum aestivum* L.)의 경우 33°C의 고온에서 약이나 소포자를 전처리 하였을 때 다세포체의 발생은 사용한 3 품종 모두 4일 처리에서 높으며 8일 처리에서는 매우 심하게 감소하였다 (Touraev et al. 1996). 본 실험의 경우 배의 발생은 1~2일 처리 시 높았으며 3일 이상 처리에서는 심하게 감소하여 유채와 유사한 결과를 나타내었으나 다세포체 발생이 4일 처리에서 높았던 밀의 경우와는 다르게 나타났는데 이는 배의 유기에 효과적인 전처리 기간이 식물에 따라 다르기 때문인 것으로 생각된다.

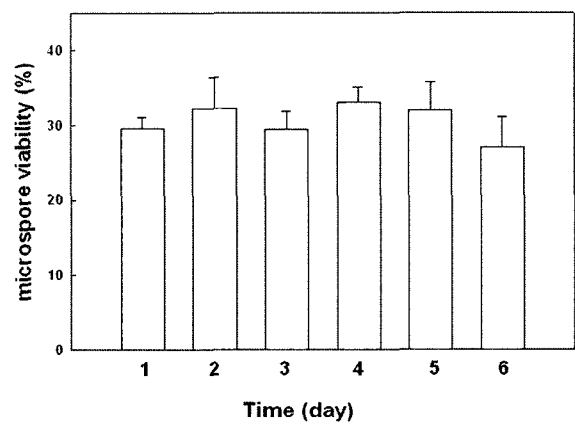


Figure 2. Effect of pretreatment period at 32°C on microspore viability (%±SE). Data are based on observations of 200~300 microspores for each replication and three replications for each treatment.

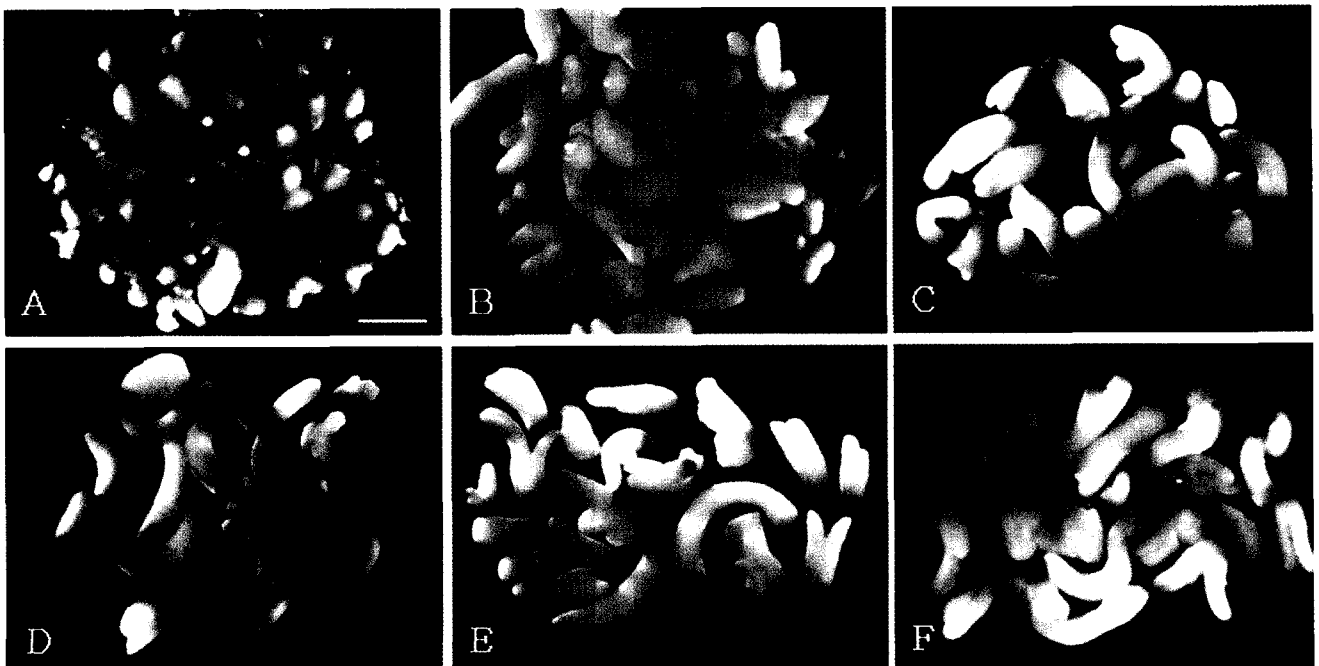


Figure 3. Embryos formed after 4 weeks in induction medium after different pretreatment period. A, 1 day; B, 2 day; C, 3 day; D, 4 day; E, 5 day; F, 6 day. Bar (1 mm) in (A) applies to all the figures.

본 실험의 결과 고온처리 기간이 1~2일로 짧은 경우 소포자배의 발생은 높았으나 대부분이 발달초기의 구형 또는 어뢰형배 이었으며 자엽배의 발생은 매우 드물었다. 또 계수하지는 않았으나 매우 작은 크기의 구형체나 캘러스들도 많이 발생하였다. 그러나 고온처리 3일 이상에서는 배 발생은 크게 감소하였으나 구형이나 어뢰형배 이외에 자엽배가 다수 발생하였으며 작은 크기의 구형배나 캘러스의 발생은 드물었다. 이와 같은 결과는 소포자가 배발생소포자로 되는 데 뿐만 아니라 배발생소포자가 배로 발달하는 데에도 고온처리가 영향을 미친다는 것을 의미한다.

일반적으로 소포자 배양에 있어서 전처리나 배양초기의 온도는 소포자가 배발생소포자로 되어 배우체가 아닌 조포체인 배로 발달하도록 하는데 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 특히 유채 (*Brassica napus*)의 경우 배양 2일 후부터 온도에 따라 소포자의 발달 방향이 달라져서 18℃에서는 양성배우체로, 25℃에서는 양성배우체나 조포체로, 32℃에서는 조포체로 분열하고, 15일 후 배의 발생은 대부분이 32℃에서 일어난다고 알려져 있다 (Custer et al. 1994, 1996). 그러나 온도처리에 따라 배발생소포자의 발달방향이 달라진다는 보고는 매우 드물다. 소포자 배양은 아니지만 치커리의 잎 배양시 20℃와 25℃에서는 캘러스와 신초가 발생하고, 35℃에서는 배가 발생한다고 하였다 (Decout, 1994). 즉 배양온도에 따라 캘러스로 발달하기도 하고 배로 발달하기도 하는데 배의 발달은 고온조건에서 일어난다고 하였다. 이와 같은 결과는 배의 발달에 최소한 3일 이상의 고온처리가 필요한 본 연구결과와 일치한다. 따라서 고추의 소포자 배양 시 소포자배의 발생 비율을 높일 수 있을 뿐만 아니라 배의 발달에도 효과적인 고온처리조건을 밝히는 것이 매우 중요한 것으로 생각된다.

전처리 시 2-HNA가 소포자배의 발생에 미치는 영향

소포자배 유기에 효과적인 화합물로 알려진 2-HNA의 영향을 조사하기 위해 0 mg/L에서 100 mg/L 까지 농도를 달리하여 약전처리 배지에 첨가한 결과 2-HNA 첨가 시 배의 발생은 무처리 시 11개인데 비해 13.7~15.4개로 다소 높

았다. 또 처리 농도 중 50 mg/L 첨가 시 15.4개로 가장 많았으나 처리간 차이는 크지 않았다. 배의 발달은 2-HNA 처리시 오히려 억제되어 자엽배는 무처리에서만 발생하였다 (Table 2).

밀에서는 2-HNA 첨가 시 배의 발생이 높으며 녹색 식물체가 높은 비율로 발생한다. 또 8 mg/L에서 40 mg/L까지 농도를 달리하여 첨가했을 때 25 mg/L 첨가 시 배의 발생이 가장 높다 (Zheng et al. 2001). 본 실험의 결과 고추에서는 2-HNA 첨가시 배의 발생이 다소 증가되었으나 밀에서와 같은 뚜렷한 효과가 없었으며 가장 효과적인 처리 농도도 밀에서와는 달리 25 mg/L 첨가 보다는 50 mg/L 첨가에서 높았다. 따라서 고추의 소포자 배양 시 다수의 배를 획득하기 위해서는 2-HNA 이외에 배의 유기에 효과적인 화합물들과 처리 농도를 탐색하는 것이 필요할 것으로 생각된다.

약공동전처리가 소포자배의 발생에 미치는 영향

소포자 전처리시 약의 첨가 효과를 조사한 결과 1개의 Petri dish에서 발생한 배의 수는 약을 첨가하지 않았을 때는 약 73개였으나 약을 첨가한 경우에는 39개로 매우 낮았다. 배의 발달도 약을 첨가했을 때 발생한 배들의 대부분이 구형 또는 소형의 ELS로 무처리 시 보다 억제되었다 (Table 3).

식물에 따라 전처리 시 사용되는 재료가 달라 이삭 (spike), 꽃봉오리, 약, 또는 나출 소포자를 전처리 하는 등 여러 가지 경우가 있다. 이삭, 꽃봉오리 또는 약을 전처리 하는 경우 전처리 기간 중에 일어나는 초기소포자의 변화를 관찰할 수 없을 뿐만 아니라 약 전처리는 꽃봉오리로부터 일일이 약을 추출하는데 많은 노력과 시간이 필요하므로 소포자 전처리가 바람직하다. 그러나 소포자배의 발생은 전처리 재료에 따라 크게 영향을 받으며 식물에 따라서는 소포자 전처리 시에는 배의 발생이 어려운 경우가 많다. 아스파라거스의 경우 4℃에서 7~9일 간 꽃봉오리를 전처리 한 후 약에서 자연적으로 방출된 소포자와 약을 7~21일 간 공동배양할 경우 캘러스의 발생이 높았으며, 공동배양 기간이 3일 이하에서는 캘러스의 발생이 심하게 감소되었다 (Peng & Wolyn 1999). 밀의 경우에서도 (Touraev et al. 1996) 약이

Table 2. Effect of 2-hydroxynicotinic acid (2-HNA) on the induction of embryos in isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.)

2-HNA (mg/L)	No. of embryos/plate ^a			No. of ELS ^b /plate	No. of total embryos/plate
	globular	heart or torpedo	cotyledonally		
0	8.4±2.3	1.2±1.2	0.3±0.1	1.1±0.8	11.0±2.8
25	8.5±1.4	1.9±1.6	0	3.1±1.9	13.7±3.0
50	8.1±4.7	3.6±3.0	0	3.4±1.2	15.4±6.5
100	5.4±2.7	3.6±2.1	0	5.4±2.7	14.7±4.9

^aEach number is a mean (n=6) ± standard error

^bELS = Embryo-like structure.

Table 3. Effect of co-pretreatment of microspores with anthers on the induction of embryos in isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.)

Pretreatment	No. of embryos/plate ^a			No. of ELS ^b /plate	No. of total embryos/plate
	globular	heart or torpedo	cotyledonally		
Without anther	30.1 ± 6.5	26.4 ± 8.8	0.6 ± 0.2	33.7 ± 15.9	72.7 ± 25.7
With anther	27.3 ± 3.2	2.1 ± 0.6	0.5 ± 0.3	28.8 ± 9.6	39.0 ± 5.3

^aEach number is a mean (n=6) ± standard error

^bELS = Embryo-like structure.

나 이삭을 전처리 할 경우 배가 발생하지만 나출 소포자를 전처리 할 경우에는 분열이 일어나 다세포체는 생기지만 배로 발달하지 못한다. 본 연구에서도 소포자 전처리 시에는 약 전처리 시에 비해 배의 발생은 다소 높았으나 배의 발달이 억제되어 대부분이 매우 적은 크기의 구형 또는 초기 심장형 배였다 (결과 미제시). 따라서 소포자 전처리 시 약의 첨가 효과를 조사하였으나 배의 발생이 감소하였을 뿐만 아니라 발생한 배의 발달도 억제되었다. 이와 같은 결과로 보아 고추의 경우 꽃봉오리로부터 적출한 직후의 약은 소포자에 양육조직으로 작용하기보다는 유독하게 작용하는 것으로 생각된다.

적 요

고추의 나출 소포자로부터 배를 유기하는데 최적의 조건을 확립하기 위하여 micro-blender를 사용하여 소포자들을 나출한 후 NLN 배지에 배양하였으며 32°C의 고온처리 기간, 전처리 배지내 2-hydroxynicotinic acid의 첨가, 그리고 약과 소포자의 공동전처리가 소포자배의 발생에 미치는 영향을 조사하였다. 나출 소포자들을 기아배지에서 고온처리한 후 NLN 배지에 배양하였을 때 다수의 배가 발생하였다. 배양 3주 후부터 구형 및 어뢰형배가 관찰되었는데 이때 배의 발생은 비동조적으로 일어났다. 배양 4주가 되면 구형과 어뢰형배 이외에 자엽배들이 발생하였다. 발생한 배들 중 자엽배들은 2% sucrose가 첨가되고 성장조절물질은 첨가되지 않은 B5 고체배지로 옮겨졌을 때 정상인 유식물들로 발달하였다. 고온처리 기간이 1~2일로 짧은 경우 소포자배의 발생은 높았으나 대부분이 발달초기의 구형 또는 심장형배 이었으며 자엽배의 발생은 매우 드물었다. 고온처리 3일 이상에서는 배의 발생은 크게 감소하였으나 자엽배가 다수 발생하였다. Inducer chemical로 알려진 2-hydroxynicotinic acid를 약전처리배지에 첨가하였을 때 배의 발생은 다소 높았으나 발달은 오히려 억제되어 대부분이 구형 또는 심장형 이었다. 소포자 전처리시 약을 첨가한 경우 배의 발생이나 발달 모두 억제되었다. 본 연구결과 고추의 나출 소포자로부터 다수의 배를 획득하였고 식물체를 재분화 시키는데 처음으로 성공하였다. 이와 같은 소포자 배양시스템은 앞으로 더 많은 배를 생산할 수 있는 배양조건이 확립되어야 하

지만 homozygous한 배가 반수체의 생산 뿐만아니라 형질 전환과 열성 또는 우성의 돌연변이체 선발에 매우 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구 (R05-2003-000-10209-0) 지원으로 수행되었음.

인용문헌

- Baillie AMR, Epp DJ, Hutcheson D, Keller WA (1992) *In vitro* culture of isolated microspores and regeneration of plants in *Brassica campestris*. Plant Cell Rep 11: 234-237
- Barany I, Testillano PS, Mityko J, Risueno MC (2001) The switch of the microspore developmental program in Capsicum involves HSP70 expression and leads to the production of haploid plants. Int J Dev Biol 45(S1): S39-S40
- Binarova P, Hause G, Cenklova V, Cordewener JHG, van Lookeren Campagne MM (1997) A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L. Sex Plant Reprod 10: 200-208
- Castillo AM, Cistue L, Vallés MP, Sanz JM, Romagosa I, Molina-Cano JL (2001) Efficient production of androgenic doubled-haploid mutants in barley by the application of sodium azide to anther and microspore cultures. Plant Cell Rep 20: 105-111
- Chuong PV, Beversdorf WD (1985) High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *B. carinata* braun. Plant Sci 39: 219-226
- Cistue L, Ziauddin A, Simion E, Kasha KJ (1995) Effects of culture conditions on isolated microspore response of barley cultivar Igri. Plant Cell Tiss Org Cult 42: 163-169
- Custers JBM, Cordewener JHG, Dons HJM, van Lookeren Campagne MM (1996) Regulation of the inductive phase of microspore embryogenesis in *Brassica napus*. In: Dias JS, Crute I, Monteiro AA, (eds), Proc Int Sym on *Brssicas*, Ninth Crucifer Genetics Workshop, Acta Hort 407, pp 209-217
- Custers JBM, Cordewener JHG, Nöllen Y, Dons HJM, van

- Lookeren Campagne MM (1994) Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. Plant Cell Rep 13: 267-271
- Datta SK, Wenzel G (1987) Isolated microspore derived plant formation via embryogenesis in *Triticum aestivum* L. Plant Sci 48: 49-54
- Decout E, Dubois T, Guedira M, Dubois J, Audran JC, Vasseur J (1994) Role of temperature as a triggering signal for organogenesis or somatic embryogenesis in wounded leaves of chicory cultured *in vitro*. Jour of Exp Bot 45: 1859-1865
- 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°C treatments. Agronomie 1: 859-864
- Gamborg OL, Murashige T, Thorpe TA, Vasil IK (1976) Plant tissue culture media. In Vitro 12: 473-478
- Heslop-Harrison JS (1992) Cytological techniques to assess pollen quality. In: Cresti M, Tiezzi A, (eds), Sexual plant reproduction, Spriger-Verlag, Berlin, pp 41-48
- Hoekstra S, van Zijderveld MH, Louwerse JD, Heidekamp F, van der Mark F (1992) Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv Igri. Plant Sci 86: 89-96
- Höfer M (2004) *In vitro* androgenesis in apple-improvement of the induction phase. Plant Cell Rep 22: 365-370
- Hu T, Kasha KJ (1997) Improvement of isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) through ovary co-culture. Plant Cell Rep 16: 520-525
- Jahne A, Becker D, Brettschneider R, Lorz H (1994) Regeneration of transgenic, microspore-derived, fertile barley. Theor Appl Genet 89: 525-533
- Kim M (1999) The influence of temperature pretreatment on the production of microspore embryos in anther culture of *Capsicum annuum* L. Korean J Plant Tiss Cult 26: 71-76
- Kim M, Kim J, Yoon M, Chio D, Lee KM (2004) Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum*) Plant Cell Tiss Org Cult 77: 63-72
- Kyo M, Harada H (1985) Studies on conditions for cell division and embryogenesis in isolated pollen culture of *Nicotiana rustica*. Plant Physiol 79: 90-94
- Kyo M, Harada H (1986) Control of the developmental pathway of tobacco pollen *in vitro*. Planta 168: 427-432
- Lichter R (1982) Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. Z Pflanzen Physiol 105: 427-434
- Liu W, Zheng MY, Konzak CF (2002) Improving green plant production via isolated microspore culture in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) Plant Cell Rep 20: 821-824.
- Miyoshi K (1996) Callus induction and plantlet formation through culture of isolated microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.). Plant Cell Rep 15: 391-395
- Peng M, Wolyn DJ (1999) Improved callus formation and plant regeneration for shed microspore culture in asparagus (*Asparagus officinalis* L.). Plant Cell Rep 18: 954-958
- Penhuizic CLL, Chatelet C, Kloareg B, Potin P (2001) Carrageenan oligosaccharides enhance stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica oleracea* var. *italira*. Plant Sci 160: 1211-1220
- Pescitelli SM, Johnson CD, Petolino JF (1990) Isolated microspore culture of maize: effects of isolation technique, reduced temperature, and sucrose level. Plant Cell Rep 8: 628-631
- Raina SK, Irfan ST (1998) High-frequency embryogenesis and plantlet regeneration from isolated microspores of indica rice. Plant Cell Rep 17: 957-962
- Regner F (1996) Anther and microspore culture in *Capsicum*. In: Jain SM, Sopory SK, Veilleux RE, (eds), *In vitro* haploid production in higher plants, vol. 3, Kluwer Academic Publ, Dordrecht the Netherlands, pp 77-89
- Stoger E, Fink C, Pfosser M (1995) Plant transformation by particle bombardment of embryogenic pollen. Plant Cell Rep 14: 273-278
- Swanson EB, Herrgesell MJ, Arnoldo M, Sipell DW, Wang RSC (1989) Microspore mutagenesis and selection: canola plants with field tolerance to the imidazolinones. Theor Appl Genet 78: 525-531
- Swanson EB (1990) Microspore culture in *Brassica*. In: Pollard JW, Walker JM, (eds), Methods in molecular biology, Vol. 6, Plant cell and tissue culture. Humana Press, New Jersey, pp 159-170
- Telmer CA, Newcomb W, Simmonds DH (1993) Microspore development in *Brassica napus* and the effect of high temperature on division *in vivo* and *in vitro*. Protoplasma 172: 154-165
- Testillano PS, Gonzalez-Melendi P, Ahmadian P, Fadon B, Risueno MC (1995) The immunolocalization of nuclear antigens during the pollen developmental program and the induction of pollen embryogenesis. Exp Cell Res 221: 41-54
- Touraev A, Indrianto A, Wratschko I, Vicente O, Heberle-Bors E (1996) Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. Sex Plant Reprod 9: 209-215
- Zhao J, Simmonds D, Newcomb W (1996) Induction of embryogenesis with colchicine instead of heat in microspores of *Brassica napus* L. cv. Topas. Planta 198: 433-439
- Zheng MY, Liu W, Weng Y, Polle E (2001) Culture of freshly isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores treated with inducer chemicals. Plant Cell Rep 20: 685-690