

고추의 소포자 배양 시 전처리 후 배지의 교환, 배지의 첨가 및 2층배양 시 하층고체 배지의 양이 배의 생산에 미치는 영향

박은준 · 이종숙 · 안동주 · 김문자

The effect of medium change after pretreating microspores, medium addition, and volume of under solid medium in double layer culture on the production of embryos in isolated microspore culture of hot pepper (*Capsicum annuum* L.)

Eun Joon Park · Jong Suk Lee · Dong Joo An · Moonza Kim

Received: 6 September 2010 / Accepted: 20 September 2010
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract The effect of the addition of the fresh medium, volume of under solid medium in double layer culture as well as the medium change after pretreating microspores on the production of embryos in microspore culture of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) has been studied. When cultured after heat pre-treatment, changing pretreatment media with fresh culture media proved to be more effective for embryo production rather than supplementing additional culture media. Heat-pretreating for 3 days turned out more effective for embryo production than pretreating for 1 or 2 days. In the case of anther pretreatment, the addition of fresh medium after culture was not effective for embryo production. In pretreating microspores, however, supplementing additional fresh culture media greatly improved embryo yield and quality. The best time point of media addition was 4 days after culture commenced, and the most effective number of times of media addition was one time addition. Moreover, the effective volume of added medium in double layer culture for embryo production was 1.5 ml. The addition of media more than 1.5 ml reduced both embryo yield and quality. Double layer medium was more effective for embryo development than liquid medium. When the

volume of under solid medium increased ranging from 3 ml to 7 ml, more cotyledonary embryos were produced in either 5 ml or 7 ml compared to 3 ml, even though the total number of embryos were highest in 3 ml. These results can be used as an important data for establishing an efficient microspore culture system for producing high frequency of normal embryos in hot pepper.

Keywords Haploid, Microspore culture, *Capsicum annuum* L

서론

소포자 배양에 의해 생산된 반수체는 당대에 homozygous line을 생산할 수 있으므로 재래 육종방법이나 생명공학 적 방법에 의한 신품종 육성과 우성 또는 열성 돌연변이 유기에 매우 유용하게 이용될 수 있다 (Fukuoka et al. 1998; Harwood et al. 1995; Jähne and Lörz 1995; Swanson 1990; Swanson et al. 1989). 이뿐만 아니라 단세포 상태의 나출 소포자를 이용한 형질전환이나 돌연변이 유기 시에는 캘러스 조직을 이용할 때와는 달리 chimeric 상태가 아닌 solid 상태의 형질전환체와 돌연변이체를 획득할 수 있으며, 소포자배 발생과정을 통해 단세포부터 배가 발생하는 과정을 분자수준에서 연구하는 것이 가능하다 (Indrianto et al. 2001).

현재 유체를 비롯하여 담배, 밀, 보리 등에서는 소포자 배

E. J. Park · J. S. Lee · D. J. An · M. Z. Kim (✉)
목원대학교 생명과학과
(Department of Life Sciences, Mokwon University, 800 Doan-dong
Seo-gu, Daejeon 302-729, South Korea)
e-mail: kim70@mokwon.ac.kr

양에 의해 다수의 배와 식물체를 획득할 수 있으며 (Jähne and Lörz 1995; Kyo and Harada 1985; Swanson 1990) 실제 형질전환이나 돌연변이 유기 등에 이 기술이 이용되고 있다 (Fukuoka et al. 1998; Harwood et al. 1995; Swanson et al. 1989). 한편 고추에서는 그 동안 소포자 배양에 관한 연구가 많이 이루어져 왔으나 다핵체와 다세포체를 획득하였을 뿐 배를 획득하지 못하였는데 (Gonzalez-Melendi et al. 1996; Mitykó and Fári 1997; Regner 1996), 최근 Kim et al. (2008; 2009)이 나출 소포자 배양에 성공하여 비교적 많은 수의 배와 식물체를 획득 할 수 있게 되었다. 그러나 소포자 배양 시스템을 실제 반수체 육종이나 돌연변이 유기 등에 이용할 수 있으려면 배양 효율을 높여 더 많은 배와 식물체를 획득 할 수 있어야 한다.

소포자 배양 시 배의 발생은 배양 소포자의 발달 시기, 전처리 조건, 배양 온도, 배지의 조성 등 여러 가지 요인들에 의해 영향을 받는다 (Jähne and Lörz 1995; Swanson 1990). 이뿐만 아니라 전처리 후 배지의 교환, 배양 중 새 배지의 첨가, 사용하는 배지의 물리적 상태 등에 의해서도 크게 영향을 받는다 (Hansen and Svinnsset 1993; Immonen and Anttila 2000; Kott et al. 1988; Li and Devaux 2003; Polsoni et al. 1988; Zhou and Konzak 1989; Zhou et al. 1991).

전처리 후 배지의 교환은 전처리 시 사용하는 배지에 따라 다른데 전처리 배지를 따로 사용하는 밀, 보리 등의 경우에는 전처리 시 사용한 배지를 배양배지로 교환한 후 배양 한다 (Liu and Devaux 2003; Zheng et al. 2001). 한편 소포자 배양이 잘되는 것으로 알려진 *Brassica* 속 식물들에서는 대부분의 경우 전처리 배지를 따로 사용하지 않고 NLN 배양배지에 치상하여 31~33°C에서 수일간 고온처리 한 후 배지의 교환 없이 25°C에 옮겨 배양한다 (Swanson 1990). 그러나 같은 *Brassica* 속 식물이라도 전처리 후 배지를 교환하여 배양하기도 하는데 배지 교환 시 순무 (*Brassica napus* ssp. *rapifera*. DS)의 경우에는 배의 발생이 증가하지만 (Hansen and Svinnsset 1993) Tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* var. *costata* DC)의 경우에는 사용한 4품종 중 3품종에서 배의 발생이 감소한다 (Dias and Correia 2002). 이와 같이 고온처리 후 배지의 교환이나 첨가가 배의 발생에 미치는 영향은 식물종에 따라 또 같은 식물종도 품종에 따라 달라지는 것으로 알려져 있으나 교환과 첨가 효과를 직접 비교한 연구는 매우 드물다 (Zhao et al. 1996). 고추의 소포자 배양 시에는 고온처리한 후 전처리 배지를 NLNS 배양배지로 교환하여 25°C에서 배양하면 배가 발생하지만 (Kim et al. 2008, 2010) 전처리 후 배지의 교환이나 첨가가 배의 발생에 미치는 영향을 조사한 연구결과는 없다.

소포자 배양 3~4주 후 발생한 배들 중에는 발달단계가 각기 다른 배들 즉 구형배, 심장형배, 어뢰형 배, 자엽배들이 혼재할 뿐만 아니라 배의 발달이 정상적으로 이루

어지지 못하여 생겨난 배상체들도 많다. 배의 발달이 비동조적으로 일어나거나 비정상적으로 일어나는 경우 정상 자엽배가 아닌 배들은 재분화 배지로 이식 시 유식물로 발달하는 비율이 매우 낮다. 따라서 소포자 배양에 의해 다수의 식물체를 생산할 수 있으려면 배의 발생이 많을 뿐만 아니라 발생한 배들이 정상적으로 발달하는데 필요한 배양조건을 밝힐 수 있어야 한다. 정상 자엽배로 발달하지 못하는 가장 큰 원인은 배의 발달에 필요한 양분의 결핍과 배양 중 발생한 toxic한 물질이 배지에 축적되기 때문인데 배양 초기에 사용한 배지를 새 배지로 교환하거나 또는 새 배지를 첨가하면 배의 발생과 발달이 크게 좋아 지는 것으로 알려져 있다 (Dias and Correia 2002; Huang et al. 1990; Kott et al. 1988; Posoni et al. 1988; Swanson et al. 1987).

소포자배의 발생과 발달은 배지의 조성뿐만 아니라 배지의 물리적 성질에 의해서도 영향을 받는 것으로 알려져 있다 (Immonen and Anttila 2000; Li and Devaux 2003; Zhou and Konzak 1989; Zhou et al. 1991). Rye 약배양의 경우 고체배지, 액체배지, 및 ficoll이 첨가된 액체배지의 3가지 배지 중 고체배지 사용 시 캘러스와 녹색 식물체의 발생이 높으며 (Immonen and Anttila 2000), 밀의 약배양 시에도 발생한 배상체의 수는 액체배양 시 많으나 녹색 식물체의 발생 비율은 ficoll이 첨가된 액체배지 사용 시에 많다 (Zhou and Konzak 1989; Zhou et al. 1991). 소포자 배양 시에도 액체배지뿐만 아니라 2층배지도 사용되고 있다 (Hu and Kasha 1997; Pedroso and Pais 1994). 2층배지를 사용하는 경우 하층고체배지의 조성이나 양에 따라 배의 발생과 발달이 달라질 것으로 생각되나 대부분의 경우 상층 액체배지와 동일한 조성의 배지를 일정 양분주하여 사용하고 있다 (Hu and Kasha 1997; Pedroso and Pais 1994; Regner 1996). 고추의 경우 약배양과 shed-microspore culture 시에는 2층배지를 사용하여 다수의 배와 식물체를 획득하는데 성공하였다 (Dolcet-Sanjuan et al. 1997; Supena et al. 2006ab). 그러나 소포자 배양의 경우 2층배지 사용 시 소수의 다세포체만 획득하였을 뿐 배를 획득하지 못하였으며 (Regner 1996), 최근 소포자배양에 성공한 Kim et al. (2008, 2010)은 액체배지를 사용하였다. 따라서 고추의 소포자 배양 시에는 아직까지 2층배지를 사용하여 배를 획득한 연구 결과가 없다.

이상에서와 같이 소포자 배양 시 배의 발생은 전처리 후 배지의 교환 여부, 배양 중 새 배지의 첨가, 그리고 배지의 물리적 상태에 따라 배의 발생과 발달이 달라지는 것으로 알려져 있으나 고추에서는 이와 같은 연구 결과가 없다. 따라서 본 연구에서는 다수의 정상 자엽배를 생산할 수 있는 소포자 배양 시스템을 확립하는데 필요한 기초자료를 얻기 위해 이와 같은 요인들이 배의 발생과 발달에 미치는 영향을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에서는 고추 (*Capsicum annuum* L.)의 밀양재래 품종을 사용하였다. 전년도에 채종한 종자를 직경 20 cm 화분에 파종하여 3~4 주 동안 생육시켜 본엽이 2~3매 출현했을 때 생육정도가 비슷한 유묘들을 선별하여 직경이 25 cm인 화분에 이식하였으며 매주 파종하여 연중 재료 채취가 가능하도록 하였다. 유묘 이식 시 흙은 시판되고 있는 원예용 상토 (부농원예상토)에 화분 전용 복합비료로 시판되고 있는 파워스톤 (실험식물센터, 질소 10%, 인산 5%, 수용성 가리 10%)을 1개의 화분에 8 g씩 섞어 사용하였다.

모식물은 온도가 25/20°C (명/암), 광주기가 16/8 h (명/암)인 성장실에서 생육시켰다. 성장실의 광도는 형광등과 메탈램프를 이용하여 $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 가 되도록 하였고, 상대습도는 60%로 유지하였다. 식물의 성장을 위해 관수는 1~2일마다 실시하였으며, 수세가 약화되는 것을 막기 위해 관수 시 마다 적기가 지난 꽃봉오리를 제거하였다. 모식물은 정식 8주 후부터 12주까지만 사용하였다.

꽃봉오리는 꽃받침과 꽃잎의 길이가 거의 같은 것을 취하여 약의 2/4~3/4이 보라색으로 착색되어 있는 것을 확인한 후 사용하였다. 이와 같은 약내에는 배의 발생에 적기로 알려진 후기 1핵성 소포자나 초기 2핵성 화분이 내포되어 있는 것으로 알려져 있다 (Kim et al. 2004). 꽃봉오리는 실험 직전에 채취하여 2% sodium hypochlorite 용액으로 10 분간 소독하고, 멸균수로 3회 수세하였다.

소포자의 나출 및 수확

소포자 전처리 시 약 30개의 꽃봉오리를 micro-blender cup (steel waring blender container 20 ml, Eberbach Corporation, MI, USA)에 넣고 전처리 배지 (소포자 전처리 참고) 10 ml을 첨가한 후 10초씩 2회 blending (16,000~18,000 rpm)하여 소포자를 나출 시킨 후 50 ml centrifuge tube에 모았다. 약 내의 남아있는 소포자를 꺼내기 위해 전처리 배지 10 ml을 첨가하여 고속 (약 5,000 rpm)에서 15초씩 2회 vortexing 하였다. 구멍의 크기가 75 μm 와 35 μm 인 체를 이용해 크기가 큰 체 세포 조직 파편들을 제거한 후 소포자 현탁액을 다시 50 ml centrifuge tube로 옮기고 전처리 배지를 첨가하여 30 ml로 맞춘 후 1,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 소포자들을 모았다. 상등액을 제거한 후 전처리 배지 30 ml을 첨가하여 vortexing 한 후 1,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였으며, 이와 같은 수세과정을 2회 실시하였다. Blender와 전처리 배지는 4°C에 보관되었던 것을 실험 직전

에 꺼내 사용하였다. 약전처리 시에는 전처리한 약을 blender cup에 넣고 전처리 배지 4 ml을 첨가한 후 10초씩 2회 blending 하였으며 이후 소포자의 수확 및 수세는 소포자 전처리 시와 동일하게 하였다.

전처리

소포자 전처리 시에는 소포자 밀도가 1 ml에 약 2×10^5 이 되도록 hemocytometer를 사용하여 조정한 후 90 x 20 mm 배양접시에 8 ml 씩 분주하여 parafilm으로 밀봉하였다. 약전처리 시에는 30개의 꽃봉오리로부터 꺼낸 150~180개의 약을 액체상태의 전처리 배지 3 ml이 들어있는 60 x 15 mm 배양접시에 50~60개 씩 치상하였다. 소포자 현탁액이나 약이 들어있는 배양접시는 배지가 증발하는 것을 막기 위해 멸균수로 적신 filter paper가 들어있는 140 x 20 mm 배양접시에 넣은 후 다시 parafilm으로 밀봉하였다. 이와 같이 준비된 소포자와 약은 $32 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 고온 처리하였으며, 전처리 배지는 0.37 M mannitol + NLNS를 (Kim et al. 2010) 사용하였다.

전처리 후 배지의 교환 여부가 (소포자 배양 참고) 배의 발생에 미치는 영향을 조사한 실험에서는 1~3일 간 고온처리 하였으며 이외의 실험에서는 3일 간 고온처리 하였다. 또 소포자 현탁액의 분주는 60 x 15 mm 배양접시 각각에 첨가 시에는 1.5 ml 씩 교환 시에는 3 ml 씩 하였다.

배양 중 첨가시기를 달리한 새 배지의 첨가가 배의 발생에 미치는 영향을 조사한 실험에서는 소포자 및 약 전처리를 하였으며 이외의 실험에서는 소포자 전처리를 하였다.

소포자 배양

고온처리가 끝난 소포자들과 약전처리 후 나출한 소포자들을 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 전처리 배지를 제거한 후 배양배지에 현탁하였다. 이때 소포자의 밀도는 1 ml에 약 10×10^4 이 되도록 조정하였으며, 60 x 15 mm 배양접시에 1.5 ml 씩 분주하여 배양 하였다. 소포자가 들어있는 배양접시들은 투명한 plastic box에 넣어 25°C의 암 상태에서 4주 간 배양하였다.

배양배지는 10% sucrose가 첨가된 NLNS 배지 (Kim et al. 2008)를 사용하였으며, 2층배지 사용 시 하층 고체배지는 2% sucrose와 0.4% phytigel이 첨가된 1/2 NLNS를 사용하였다. 2층배지는 첨가하는 배지의 양이 배의 생산에 미치는 영향과 하층고체배지의 양이 배의 생산에 미치는 영향을 조사한 실험에서만 실시하였으며, 이외의 실험에서는 액체배지를 사용 하였다. 배지의 pH는 5.8~6.0이 되도록 조정하였다. 모든 액체배지는 pore size가 0.45 μm 와 0.22 μm 인 membrane을 사용하여 여과멸균

하였으며 2층배양 시 하층 고체배지는 고압 멸균하여 사용하였다.

전처리가 끝난 후 배지의 교환 여부가 배의 발생에 미치는 영향을 조사한 실험에서는 사용한 전처리 배지를 원심 분리하여 제거한 후 소포자 pellet을 배양 배지에 다시 현탁시켜 배양하거나 (이후 ‘교환’ 이라 칭함) 또는 전처리 배지가 들어있는 배양접시에 배양배지를 첨가 (이후 ‘첨가’ 라 칭함) 하여 배양하였다. 첨가의 경우에는 소포자의 밀도가 1 ml에 약 2×10^5 이 되도록 조정한 소포자 현탁액 1.5 ml이 들어있는 60 x 15 mm 배양접시에 배양 배지를 각각 1.5 ml씩 첨가하여 배양하였으며, 교환의 경우에는 전처리한 소포자들을 1.000 rpm에서 5분간 원심분리하여 전처리 배지를 제거 한 후 배양배지를 첨가하여 소포자 밀도를 1 ml에 약 1×10^5 이 되도록 재조정하였으며 60 x 15 mm 배양접시에 3 ml 씩 분주하여 배양하였다.

배양 중 새 배지의 첨가가 배의 발생에 미치는 영향을 조사한 실험에서는 60 x 15 mm 배양접시에 소포자 현탁액을 1.5 ml씩 분주하고 배양 1, 2, 3 및 4일 후 새 배지를 동량 첨가하였다. 또 새 배지 첨가 시 첨가 횟수가 배의 발생에 미치는 영향을 조사한 실험에서는 60 x 15 mm 배양접시에 소포자 현탁액을 1.5 ml씩 분주한 후 배양 1일 후부터 1.5 ml 씩을 1일 간격으로 1, 2 및 3회 첨가하였다. 한편 2층배양에서 새 배지의 첨가 시 첨가하는 배지의 양이 배의 발생에 미치는 영향을 조사한 실험에서는 하층고체배지가 7 ml 들어있는 60 x 15 mm 배양 용기에 소포자 현탁액을 1.5 ml 씩 치상하고 배양 1일 후 새 배지를 각각 1.5, 2 및 3 ml 씩 첨가하였다.

2층배양 시 하층고체배지의 양이 배의 발생에 미치는 영향을 조사한 실험에서는 60 x 15 mm 배양접시에 고체배지를 각각 3, 5 및 7 ml 씩 분주하여 미리 준비한 후 소포자 현탁액을 1.5 ml씩 분주하고 배양 1일 후 새 배지를 동량 첨가하였다.

결과조사

실험은 1개의 배양접시를 1반복으로 하여 한 처리에 4~5 반복씩 2회 이상 실시하였다. 배양 4주 후 해부 현미경 10 배의 배율 하에서 1개의 배양접시에 들어있는 배의 수를 계수하여 평균과 표준오차를 구하였다.

결과 및 고찰

전처리 후 배지의 교환이 배의 생산에 미치는 영향

전처리 후 배지의 교환여부가 배의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해 나출소포자를 1~3일간 고온처리한 후 사용한 전처리 배지를 새 배양배지로 교환하거나 배지의 교환 없이 배양배지를 첨가하여 4주 간 배양한 후에 배의 발생 및 발달을 조사하였다. 1개의 배양접시에서 발생한 배의 전체 수는 전처리 기간이 1, 2 및 3 일인 경우 모두 첨가의 경우에 비해 교환의 경우에 많았다. 배지의 교환여부가 배의 생산에 미치는 영향은 고온처리 기간에 따라 달랐다. 즉 고온처리 1일의 경우 첨가 시에는 17.3개 이었으나 교환 시에는 65.5개로 약 3배 이상 많았으며, 고온처리 2일의 경우 첨가 시에는 7.3개 이었으나 교환 시에는 74.3개로 약 10배 이상 많았다. 또 고온처리 3일의 경우 첨가 시에는 6.3개였으나 교환 시에는 136.0개로 약 21배나 많았다. 따라서 배지의 교환 효과는 고온처리 기간이 길어질수록 큰 것으로 나타났다. 배지의 교환 여부에 따라 고온처리 기간에 대한 반응도 달랐는데 1, 2 및 3일 처리 시 1개의 배양접시에서 발생한 배의 수가 첨가의 경우 각각 17.3, 7.3 및 6.3개로 처리 기간이 길어질수록 감소하였으나 교환의 경우에는 각각 65.5, 74.3 및 136.0개로 처리 기간이 길어질수록 크게 증가하였다 (Table 1).

배의 발달도 배지의 교환 여부에 따라 크게 차이가 나

Table 1 Influence of medium change after heat shock pretreatment on the production of embryos in isolated microspore culture of hot pepper (*C. annuum* L.)

Pretreatment period (days)	Medium change	No. of embryos/plate			
		Globular & Heart	Cotyledonary	ELS ^a	Total
1	Addition	6.0 ± 1.2	0	11.3 ± 5.2	17.3 ± 4.8
	Change	29.5 ± 8.5	0	36.0 ± 1.0	65.5 ± 7.5
2	Addition	4.5 ± 2.6	0	2.8 ± 1.3	7.3 ± 3.3
	Change	40.0 ± 22.6	0	34.3 ± 24.8	74.3 ± 46.0
3	Addition	4.5 ± 2.2	0	1.8 ± 1.3	6.3 ± 3.4
	Change	87.3 ± 13.9	0.5 ± 0.3	48.2 ± 20.6	136.0 ± 30.5

^aELS indicates embryo-like structure. Values are the means of two independent experiments ± SE (n=4). Every plate contained 30×10^4 microspores

서 배지의 교환 없이 배양배지를 첨가한 경우 colony와 proembryo가 많았으며 발생한 구형배들도 크기가 매우 작아 계수 되지 않은 것들이 많았다. 계수한 배들도 크기가 작은 구형배와 2개 이상의 구형배가 붙어있는 ELS가 대부분 이었다. 이에 비해 배지를 교환한 경우에는 첨가 시에 비해 배의 크기가 컸으며 구형배 뿐만 아니라 심장형배도 발생하였다. 교환 시 배의 발달은 고온처리 기간이 길어질수록 좋았다. 즉 교환의 경우 고온 전처리 1일에서는 크기가 작은 구형배와 2개 이상의 구형배가 붙어있는 ELS가 대부분이었으나 고온처리 기간이 길어질수록 배의 크기가 커졌으며 3일 고온처리 에서는 크기가 커진 구형배, 심장형배 뿐만 아니라 배축이 신장된 ELS가 발생하였으며 드물기는 하지만 자엽의 발달이 시작된 것들도 있었다 (Table 1). 따라서 전처리가 끝난 후에는 사용한 전처리 배지를 새 배양배지로 교환하여 배양하며, 고온처리는 1일보다는 3일을 하는 것이 소포자 배의 유기 및 발달에 효과적인 것으로 나타났다.

전처리 배지를 따로 사용하지 않는 *Brassica* 속 식물들에서는 대부분의 경우 소포자들을 NLN 배양배지에 치상하여 32°C에서 수일간 고온처리 한 후 배지의 교환 없이 25°C에 옮겨 배양하며 (Swanson 1990), 전처리 시기아배지를 사용하는 보리나 (Li and Devaux 2003) 밀 (Zheng et al. 2001)의 경우에는 전처리 시 사용한 배지를 배양 배지로 교환한 후 배양한다. 그러나 전처리 배지를 따로 사용하지 않는 *Brassica* 속 식물들에서도 고온 처리 후의 배지 교환 여부에 따라 배의 발생이 달라지는데 유채의 경우 NLN 배지에 현탁되어 있는 소포자들을 30°C에서 1일 간 배양한 후 배지를 교환하면 배의 발생과 발달이 크게 향상된다. 실험에 따라 배지 교환 후 전체 배의 수가 감소하는 경우도 있으나 배의 질은 항상 좋아 진다 (Kott et al. 1988; Polsoni et al. 1988). 순무 (Hansen and Svinnsset 1993)에서도 배지 교환 시 배의 발생이 증가하는데, 배양 3일 후 배지 교환 시 소포자배양에 대한 반응이 높은 품종인 Gry 사용 시에는 2배 증가하며 반응이 낮은 품종인 Stenhaug 사용 시에는 8배나 증가한다. 그러나 이와는 달리 *Tronchuda cabbage* (*Brassica oleracea* var. *costata* DC.)의 경우 치상 후 1일에서부터 5일까지 시기를 달리하여 배지를 교환 한 후 배의 발생을 조사하면 교환 시기와 상관없이 사용한 4품종 중 3품종에서 배의 발생이 감소한다 (Dias and Correia 2002). 또 유채 (*Brassica napus* L.)의 소포자 배양 시 1일간 고온처리 한 후 배지의 교환과 첨가가 배의 발생에 미치는 영향을 비교하면 배의 발생 비율이 첨가 시에는 15.4%이나 교환 시에는 8.7%로 크게 감소 한다 (Zhao et al. 1996). 이와 같이 고온처리 후 배지의 교환이나 첨가가 배의 발생에 미치는 영향은 식물 종에 따라 또 같은 식물종도 실험이나 품종에 따라 달라진다. 본 연구에서 고온처리 후 배지의

교환과 첨가 효과를 비교한 결과 순무와 유채 (Hansen and Svinnsset 1993; Kott et al. 1988; Polsoni et al. 1988)에서와 같이 배지교환 시에 배의 발생과 발달이 좋았다. 따라서 고추의 소포자 배양 시에는 고온처리 후 사용한 전처리 배지를 새 배양배지로 교환하여 배양 하는 것이 배의 생산에 효과적임을 밝힐 수 있었다.

소포자 배양 시 배지 교환에 의해 배의 발생과 발달이 좋아지는 것은 배양소포들로부터 발생한 독소가 제거되기 때문이며 (Kott et al. 1988; Polsoni et al. 1988), 배의 발생이 감소하는 것은 conditioned medium이 제거되거나, 배지를 교환하기 위해 원심분리 하는 중 세포가 상해를 받거나, 또는 크기가 커지고 좀 더 잘 부유하게 된 배발생적 소포자들이 원심분리 하는 과정에서 pellet을 생성하지 못하고 소실되기 때문이다 (Zhao et al. 1996). 따라서 본 실험에서 배지의 교환 시 배의 발생이 좋았던 것은 배지 교환에 의한 conditioned medium의 소실이나 원심분리에 의한 소포자의 물리적 상해에 의한 영향 보다는 toxin제거 효과가 더 크게 작용하였기 때문인 것으로 생각된다.

배의 발생은 배양배지 내 삼투압에 따라서도 달라지는데 밀의 경우 maltose를 9% 첨가한 배지의 삼투압은 300 mOsmol kg⁻¹H₂O로 배의 발생이 많으나 maltose의 농도가 이보다 낮아 삼투압이 낮은 경우 또는 9% maltose와 mannitol을 모두 첨가하여 삼투압이 더 높은 경우에는 배의 발생이 크게 감소한다 (Liu et al. 2002). 보리의 경우에도 배양배지 내 삼투압이 350 mOsmol kg⁻¹H₂O 일 때까지는 배상체가 증가하나 이보다 높아지면 오히려 감소한다 (Hoekstra et al. 1993). 본 연구에서는 전처리 배지로 0.37 M mannitol + NLNS (Kim et al. 2010)을 사용하였으며 배양배지는 10% sucrose가 포함된 NLNS를 사용하였다. 따라서 전처리 후 배지의 교환 없이 배양배지를 첨가하는 경우 배지 내에는 삼투압조절제 0.37 M mannitol과 sucrose가 모두 포함 되게 되고 이로 인해 배지 내 삼투압이 지나치게 높아지게 되었으므로 배의 발생이 억제되었던 것으로 생각된다.

고추의 약배양 시 소포자 배의 발생에 효과적인 전처리는 고온처리이며 (Dumas de Vaulx et al. 1981; Kim 1999), 소포자 배양 시에도 나출 소포자를 31 ± 1°C에서 3일간 고온처리 함으로서 다수의 배를 획득하는데 성공하였다 (Kim et al. 2008, 2010). 또 32°C에서 1~6일간 약을 전처리 한 후 소포자를 나출하여 배양하면 고온처리 기간이 길어질수록 배의 발달이 좋다 (Park et al. 2005). 따라서 본 연구에서도 처리기간을 1~3일로 달리하여 고온처리를 하였으며, 고온처리 후 배지를 교환하여 배양한 결과 고온처리 기간이 길어질수록 배의 발생과 발달이 크게 향상되었다. 이와 같이 고추의 소포자배양 시 배의 발생과 발달은 전처리 기간에 따라

서도 크게 영향을 받으므로 다수의 정상배를 생산하는 배양 시스템을 확립하기 위해서는 배의 생산에 적합한 고온전처리 기간을 밝힐 수 있는 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

배양 중 새 배지의 첨가가 배의 생산에 미치는 영향

배양 중 새 배지의 첨가가 배의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해 전처리가 끝난 소포자를 배양배지에 치상한 1, 2, 3 및 4일 후에 새 배지를 첨가하여 4주간 배양한 후 배의 발생 및 발달을 조사하였다. 새 배지의 첨가가 배의 발생에 미치는 영향은 전처리 재료에 따라 달랐는데 약전처리의 경우 새 배지를 첨가하지 않았을 때 1개의 배양접시에서 발생한 배의 전체 수는 66.8개이었으나 첨가한 경우에는 첨가시기에 따라 차이가 났으나 44.4~47.5개로 크게 감소하였다. 이와는 달리 소포자 전처리 시에는 새 배지를 첨가하지 않은 경우 107.5개이었으나 새 배지를 첨가 한 경우에는 첨가시기에 따라 차이가 났으나 136.1~185.9개로 크게 증가하였다. 증가한 정도는 첨가시기가 늦어질수록 커졌으며 4일 후 첨가 시에는 185.9개로 1일 후 첨가 시 107.5개에 비해 약 1.7배나 많았다 (Table 2).

발생한 배의 발달은 약전처리와 소포자 전처리 모두 새 배지 첨가 시에 좋았다. 약전처리의 경우 새 배지를 첨가하지 않았을 때는 구형배, 심장형배 및 ELS 모두 크기가 작았으나 새 배지를 첨가하였을 때는 구형배와 심장형배의 크기가 커졌으며 ELS들도 배축이 발달된 것들이 많았다. 소포자 전처리의 경우에도 새 배지를 첨가하지 않았을 때 발생한 배는 크기가 매우 작은 구형배와 ELS가 대부분이었으나 첨가한 경우에는 크기가 커진

구형배와 심장형배 뿐만 아니라 배축이 발달한 배들이 많았으며 드물게는 자엽배도 발생하였다. 따라서 배양 후 새 배지의 첨가는 약전처리 시에는 효과가 없으나 소포자 전처리 시에는 배의 발생과 발달을 크게 증가시키는 것으로 나타났으며, 효과적인 첨가 시기는 배양 4일 후인 것으로 나타났다 (Table 2).

본 연구결과 Kim et al. (2010)의 결과에서와 같이 약전처리 시에 비해 소포자 전처리 시에 배의 발생이 많았으며, 소포자를 전처리하여 배양 한 후 새 배지를 첨가하면 배의 발생이 증가할 뿐만 아니라 자엽배의 비율도 증가하였다. 소포자 전처리 시에 배의 발생이 많았던 것은 약전처리의 경우 약벽으로 인해 배지 내 양분이 소포자로 용이하게 공급되지 못하였으나 소포자 전처리 시에는 약벽 장벽이 없어 양분의 공급이 용이하게 이루어질 수 있었기 때문인 것으로 생각된다. 또 소포자 전처리 시 배지 첨가가 효과적이었던 것은 배의 발생을 억제하는 독성물질이 희석되었고, 배의 발달에 필요한 양분이 공급되었기 때문인 것으로 생각된다. 실제 유체의 소포자 배양 시에는 배양 소포자 자체에서 독소가 발생하며 이로 인해 배의 발생과 발달이 저해되는데, 배양 후 새 배지를 첨가하면 배의 발생과 발달이 모두 좋아진다 (Huang et al. 1990; Swanson et al. 1987). 그러나 약전처리 시에는 새 배지의 첨가 시 배의 발생이 오히려 감소하였는데 이와 같은 결과에 대해서는 추후 계속된 연구가 필요할 것으로 생각된다.

유체의 소포자를 고밀도 (1×10^6 spore/ml)에서 배양 하는 경우 배지 내에는 소포자로부터 분비된 toxin이 존재하게 되는데 배양 기간을 1, 2 및 3일로 달리 한 후 사용한 배지를 독소배지로 간주하여 배양배지에 일정 양 첨가한 후 배양하면 배양기간이 길어질수록 그 영향이 크다.

Table 2 Influence of adding the fresh medium at different days of culture on the production of embryos in isolated microspore culture of hot pepper (*C. annuum* L.)

Pretreatment material	Days after culture	No. of embryos/plate			
		Globular & Heart	Cotyledonary	ELS ^a	Total
Anther	0	17.8 ± 3.5	0	49.0 ± 9.4	66.8 ± 12.4
	1	8.3 ± 3.8	0	36.6 ± 6.7	44.9 ± 4.2
	2	13.4 ± 4.9	0	31.1 ± 5.9	44.4 ± 7.6
	3	13.4 ± 4.9	0	31.0 ± 5.9	44.4 ± 7.6
	4	9.0 ± 4.6	0	38.5 ± 3.9	47.5 ± 0.9
Microspore	0	63.8 ± 21.8	0	43.6 ± 24.0	107.5 ± 19.5
	1	80.6 ± 28.7	0.6 ± 0.3	54.8 ± 28.5	136.1 ± 55.0
	2	99.0 ± 49.5	0.4 ± 0.2	55.3 ± 32.5	154.6 ± 79.6
	3	113.5 ± 44.1	0.3 ± 0.2	61.3 ± 29.4	175.1 ± 72.3
	4	118.5 ± 34.9	0.3 ± 0.2	67.1 ± 28.5	185.9 ± 61.5

^aELS indicates embryo-like structure. Values are the means of two independent experiments ± SE (n=4) for anther pretreatment and three independent experiments ± SE (n=5) for microspore pretreatment. Every plate contained 15×10^4 microspores

즉 1일이나 2일 간 배양한 배지 보다는 3일간 배양한 배지를 첨가한 경우에 배의 발생과 발달이 더 많이 감소한다 (Kott et al. 1988). 또 유채 (*Brassica napus* L. cv. Topas)의 소포자 배양 시 배양 1, 2, 3 및 7일 후 새 배지를 첨가함으로써 소포자의 밀도를 낮추면 배의 발생이 증가하는데 그 정도는 새 배지를 첨가하는 시기에 따라 다르다. 즉 소포자를 고밀도 (40,000/ml)로 치상한 후 배지를 첨가하여 밀도를 낮추는 (10,000/ml 또는 4,000/ml) 경우 1일이나 2일 후에 첨가하는 것 보다는 3일이나 7일 후에 첨가할 때 배의 발생이 더 많다 (Huang et al. 1990). 이와 같은 결과들은 배양 기간에 따라 배지 내 toxin의 양이 달라지며, 배지 첨가시기에 따라 배의 발생이 달라진다는 것을 의미한다. 한편 옥수수의 소포자 배양 시 배양 3~4일 후부터 첫 번 분열이 시작되고, 5~7일 사이에는 다핵체가 발생한다 (Obert et al. 2005; Testillano et al. 2004). 또 보리의 경우에는 배양 1일 후 첫번 분열을 시작하고, 3일 후에는 다핵체, 5~7일 후에는 다세포체가 발생한다 (Maraschin et al. 2005). 고추에서도 배양 4~7일 후에 다핵체와 다세포체들이 발생한다 (Kim et al. 2008). 이와 같이 식물에 따라 다소 차이는 있으나 많은 경우 배양 소포자들은 1~3일 사이에 분열을 시작하며 5~7일 후에는 다핵체나 다세포체로 발달한다. 이후 이들 다핵체나 다세포체들은 계속된 분열을 통하여 배로 발달하게 되는데 이때 정상적인 분열이 계속되려면 이에 필요한 양분의 공급이 절대 필요하다. 본 연구에서 전처리가 끝난 소포자를 배양배지에 치상한 1일 후부터

4일 사이에 새 배지를 동량 첨가하여 배양한 후 배의 발생을 조사한 결과 4일 후 첨가 시 배의 발생이 가장 많았는데 이는 배양 4일 후 첨가 시 배지 내 축적된 toxin을 희석하는 효과가 가장 높았으며, 이와 동시에 발생한 다핵체와 다세포체들이 계속 분열하여 배로 발달하는데 필요한 양분이 적기에 공급되었기 때문인 것으로 생각된다.

새 배지의 첨가 횟수가 배의 생산에 미치는 영향

새 배지의 첨가 시 첨가 횟수가 배의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해 전처리가 끝난 소포자를 배양배지에 치상한 후 동량의 새 배지를 1~3회 첨가하여 배양 4주 후 배의 발생 및 발달을 조사하였다. 한 개의 배양접시에서 발생한 전체 배의 수는 1회 첨가 시에는 104.6개인 데 비해 2회 및 3회 첨가 시에는 각각 59.5개와 48.1개로 첨가 횟수가 많아질수록 감소하였으며 3회 첨가 시에는 1회 첨가 시에 비해 약 1/2 이하로 감소하였다 (Table 3).

배의 발달은 첨가 횟수가 증가할수록 좋아져서 배축이 발달한 배와 자엽배의 수가 증가하였다. 1회 첨가 시 발생한 배는 구형배, 심장형 배 또는 이들 배들이 서로 붙어있는 ELS가 많았으며 자엽배의 발생이 매우 적었다. 이에 비해 2회 또는 3회 첨가 시 발생한 배는 1회 첨가 시에 비해 배축이 길어졌으며, 자엽배의 발생도 1회 첨가 시 0.6개인 데 비해 2회와 3회 첨가 시에는 각각 2.9개와 3.2개로 크게 증가하였다 (Table 3, Fig. 1). 따라서 배양 후 새 배지

Table 3 Influence of the number of media addition on the production of embryos in isolated microspore culture of hot pepper (*C. annuum* L.)

No. of addition	No. of embryos/plate			
	Globular & Heart	Cotyledonary	ELS ^a	Total
1	28.4 ± 6.0	0.6 ± 0.7	75.6 ± 12.1	104.6 ± 15.0
2	10.7 ± 8.5	2.9 ± 2.7	46.3 ± 17.1	59.9 ± 21.7
3	7.3 ± 6.8	3.2 ± 3.0	37.5 ± 14.7	48.1 ± 17.3

^aELS indicates embryo-like structure. Values are the means of three independent experiments ± SE (n=5). Every plate contained 15 × 10⁴ microspores

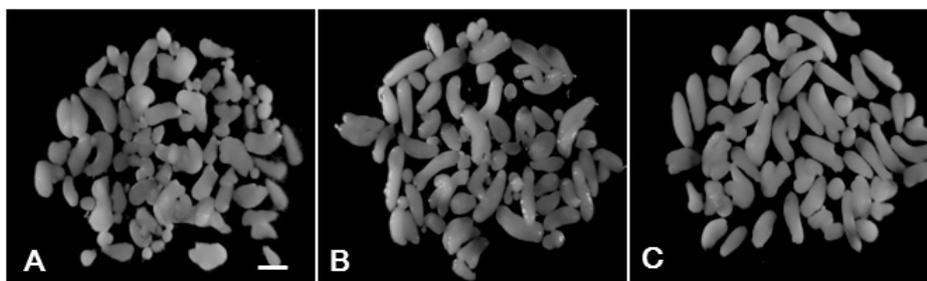


Fig. 1 Comparison of embryos developed from microspores cultured in liquid medium after adding the fresh medium with different numbers. (A) 1, (B) 2, (C) 3. The scale bar (1 mm) in (A) applies to all the figures

의 첨가 시 첨가 횟수가 증가할수록 배의 발생은 감소하나 발생한 배의 발달은 좋아지는 것으로 나타났다.

유채 (*Brassica napus* L. cv. Topas)의 소포자 배양 시 feeder culture를 하는 경우 배의 생산이 10배나 증가하며, 저밀도 (3,000, 4,000/ml) 배양 시 배양 소포자의 밀도가 30,000~40,000/ml인 상태에서 1일 간 배양한 배지를 conditioned medium으로 사용하면 배의 생산이 3배나 증가한다 (Huang et al. 1990). 이와 같은 사실들은 배양에 사용된 배지 내에는 division factor가 있다는 것을 의미한다. 본 연구 결과 배지 첨가횟수가 많아질수록 배의 발생이 감소하였으며 배의 질은 좋아졌는데 이와 같이 배의 발생이 감소한 것은 배지 내 division factor가 지나치게 희석되었기 때문이며, 배의 질이 좋아진 것은 배의 수가 적어 발생한 배들 간에 양분의 경쟁이 감소하였기 때문인 것으로 생각된다. 실제로 고추를 비롯하여 많은 식물들의 경우 배의 수가 감소하면 배의 질은 좋아진다 (Kim et al 2008; Kott al. 1988; Zhao et al. 1996).

2층배양 시 첨가하는 새 배지의 양이 배의 생산에 미치는 영향

첨가하는 새 배지의 양이 배의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해 액체배양이 아닌 2층배양을 하였으며 고체배지 위에 소포자 현탁액을 1.5 ml 치상한 1일 후에 새 배지를 1.5, 2 및 3 ml 첨가하여 4주간 배양 한 후 배의 발생 및 발달을 조사하였다. 1개의 배양접시에서 발생한 배의 전체 수는 새 배지를 1.5 ml 첨가한 경우 27.8개로 가장 많았으며 2 ml과 3 ml 첨가 시에는 각각 20.2개와 20.3개로 1.5 ml 첨가 시에 비해 감소하였다. 첨가배

지가 2 ml과 3 ml인 경우 배의 발생에 큰 차이가 없었다 (Table 4).

자엽배의 발생은 새 배지를 1.5 ml 첨가한 경우에 15.2개로 가장 많았으며 2 ml과 3 ml 첨가 시에는 각각 12.0개와 12.8개로 다소 감소하였다 (Table 4, Fig. 2). 액체배지를 사용한 실험들에서와는 달리 2층배지 사용 시 자엽배의 발생이 많았으며 ELS들도 비교적 길이가 길었다. 본 실험 결과 배의 발생과 발달에 적합한 첨가 배지의 양은 치상 당시와 동일한 1.5 ml 이며, 액체배지 사용 시에 비해 고체배지 사용 시에 배의 발달이 좋은 것으로 나타났다.

소포자배를 생산하기 위한 약이나 소포자 배양 시 고체배지, 액체배지, ficoll을 첨가한 액체배지, 또는 2층배지 등과 같이 물리적 상태가 다른 다양한 배지들이 사용되고 있는데 배지의 조성뿐만 아니라 사용한 배지의 물리적 상태에 따라서도 배의 발생과 발달이 달라지는 것으로 알려져 있다 (Hu and Kasha 1997; Immonen and Anttila 2000; Pedroso and Pais 1994; Zhou and Konzak 1989; Zhou et al. 1991). 고추에서도 약배양과 shed-microspore culture 시 2층배지를 사용하여 다수의 배와 식물체를 획득하는데 성공하였다 (Dolcet-Sanjuan et al. 1997; Supena et al. 2006a,b). 그러나 소포자 배양 시에는 2층배지를 사용한 경우 다핵체와 소수의 다세포체만 발생하였을 뿐 배가 발생하지 않았다 (Regner 1996). 또 고추의 소포자 배양에 성공한 Kim 등 (2008, 2010)이나 Lantos 등 (2009)은 액체배지를 사용하였다. 본 연구에서 액체배지와 2층배지를 사용한 결과 사용한 배지 모두에서 다수의 배를 획득하는데 성공하였다. 또 배의 발생은 감소하였

Table 4 Influence of volume of added medium in double layer culture of hot pepper microspheres on the production of embryos

Vol. of medium added (ml)	No. of embryos/plate			
	Globular & Heart	Cotyledonary	ELS ^a	Total
1.5	3.0 ± 1.9	15.2 ± 4.0	9.6 ± 1.5	27.8 ± 6.0
2	1.2 ± 1.0	12.0 ± 4.9	7.0 ± 3.8	20.2 ± 8.4
3	0.5 ± 0.2	12.8 ± 3.2	7.0 ± 0.8	20.3 ± 2.4

^aELS indicates embryo-like structure. Values are the means of three independent experiments ± SE (n=4). Every plate contained 15 x 10⁴ microspheres



Fig. 2 Comparison of embryos developed from microspheres cultured in double layer medium after adding different amount of fresh media. (A) 1.5 ml, (B) 2 ml, (C) 3 ml. The scale bar (2 mm) in (A) also applies to (B) and (C)

으나 발생한 배의 질이 크게 좋아졌으며 자엽배의 발생이 많았다 (Table 4,5; Fig. 3,4). 따라서 본 연구에서 사용한 소포자 배양의 효율이 비교적 높은 것으로 밝혀졌으며, 앞으로 배의 발생에 적합한 배양조건을 밝힘으로서 액체배양이 아닌 2층배양을 통해서 다수의 정상 자엽배를 생산 할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구 결과 첨가하는 배지의 양이 많아질수록 배의 발생이 감소하였을 뿐만 아니라 자엽배의 발생 비율도 감소하는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 액체배양 시 배지 첨가횟수가 많아질수록 배의 생산이 감소하였던 것과 같이 첨가하는 배지의 양이 많아질수록 치상 밀도가 최적 밀도 이하로 감소하게 되며 이로 인해 배지 내 division factor의 농도가 지나치게 낮아지게 되기 때문인 것으로 생각된다.

2층배양 시 하층고체배지의 양이 배의 생산에 미치는 영향

2층배양 시 하층고체배지의 양이 배의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해 하층고체배지의 양을 3, 5 및 7 ml로 달리한 후 그 위에 소포자 현탁액을 치상하여 배양 4주 후 배의 발생 및 발달을 조사하였다. 배양접시 1개에서 발생한 배의 전체 수는 하층고체배지의 양이 3 ml인 경우에는 40.9개이었으나 5 ml과 7 ml인 경우에는 각각

31.8개와 31.7개로 3 ml인 경우에 비해 크게 감소하였으며 5 ml과 7 ml 사이에는 차이가 없었다 (Table 5).

자엽배의 발생은 하층고체배지의 양이 3, 5 및 7 ml인 경우 각각 11.6, 14.4 및 17.1개로 고체배지의 양이 많아질수록 증가하였으며, 발생한 배들의 길이는 고체배지가 5ml과 7 ml인 경우 3 ml인 경우 비해 짧았다. 뿐만 아니라 하층고체배지의 양이 3 ml인 경우 발생한 배들은 배축의 길이는 길었으나 자엽이 배축 말단에서 겨우 발달하기 시작하였거나 자엽의 발달이 진행된 것들도 2개의 자엽이 서로 붙어있었으며 자엽이 전개된 것은 매우 드물었다. 이에 비해 하층고체배지의 양이 5 ml과 7 ml인 경우 발생한 배들의 배축은 짧았으나 자엽이 정상으로 발달하였고 2개의 자엽이 전개된 것들이 많았다 (Table 5, Fig. 3). 따라서 2층배지 사용 시 하층고체배지의 양은 배의 유기에는 3 ml이 효과적이나 발생한 배의 발달에는 7 ml이 효과적인 것으로 나타났다.

밀의 약배양 시 callus의 발생은 액체배지와 고체배지 중 액체배지에서 많으나 녹색식물체 발생 비율은 소포자가 배지 밑으로 가라앉는 것을 방지하기 위해 ficoll을 첨가한 액체배지에서 많으며 (Zhou and Konzak 1989; Zhou et al. 1991), rye (*Secale cereale* L.)의 약배양 시에서도 고체배지, 액체배지, 10% ficoll을 첨가한 액체배지, 또는 2층 (doble layer) 배지를 사용하는 경우 고체배지에

Table 5 Influence of volume of under solid medium in double layer culture of hot pepper microspheres on the production of embryos

Vol. of under solid medium (ml)	No. of embryos/plate			
	Globular & Heart	Cotyledonary	ELS ^a	Total
3	3.8 ± 3.2	11.6 ± 3.1	25.5 ± 6.6	40.9 ± 6.0
5	2.3 ± 2.0	14.4 ± 5.3	15.1 ± 4.3	31.8 ± 8.4
7	1.6 ± 1.7	17.1 ± 6.4	13.0 ± 6.4	31.7 ± 8.8

^aELS indicates embryo-like structure. Values are the means of three independent experiments ± SE (n=4). Every plate contained 15 x 10⁴ microspheres

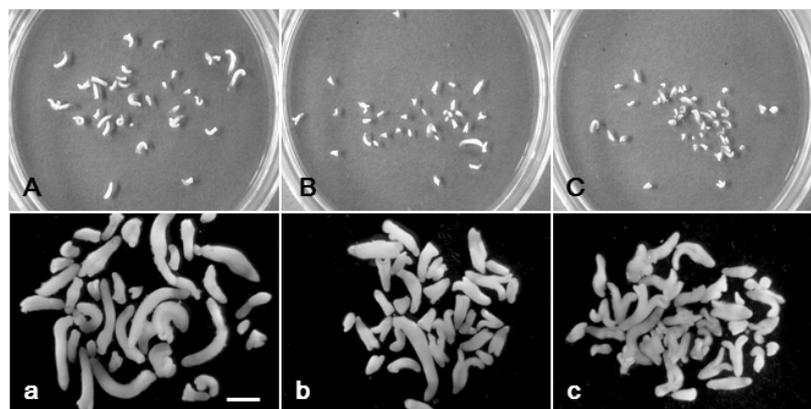


Fig. 3 Comparison of embryos developed from microspheres cultured in double layer medium with different volume of under solid medium. (A) 3 ml, (B) 5 ml, (C) 7 ml. A-C; embryos in culture plate, a-c; embryos under the stereo microscope (10 x). The scale bar (2 mm) in (a) also applies to (b) and (c)

서 발생한 캘러스에서 재분화 비율이 높다 (Immonen and Anttila 2000). 한편 보리의 소포자 배양 시에는 액체 배지에서 계속 6주간 배양하거나 또는 액체배지에서 3주간 배양하고 이를 다시 고체배지에 옮겨 3주간 배양한 후 배의 발생과 발달을 조사하면 3주간 액체배양 후 다시 3주간 고체배양 한 경우 배의 발생은 증가 하지 않으나 배의 질이 좋아지며 녹색식물체의 발생이 크게 증가 한다 (Li and Devaux 2003). 이와 같이 배지의 물리적 상태에 따라 배의 발생과 발달이 달라지므로 2층배양 시에도 하층고체배지의 양에 따라 배의 발생과 발달이 달라질 것으로 생각되어 하층 고체배지의 양을 3, 5 및 7 ml로 달리하여 배양한 결과 하층 고체배지가 7 ml 인 경우 배의 발생은 감소하나 배의 질이 향상되었으며 자엽배의 발생 비율이 증가하였다. 따라서 2층배지를 사용한 고추의 소포자 배양 시 배의 발생과 발달은 하층 고체배지의 양에 의해 영향을 받으며, 하층 고체배지의 양이 적절할 때 배의 발달이 좋아진다는 사실을 밝힐 수 있었다. 그러나 고체배지의 양이 많은 경우 배의 발달은 좋으나 배의 발생이 적었으므로 다수의 정상 자엽 배를 생산할 수 있으려면 배의 발달이 좋을 뿐만 아니라 배의 발생도 많은 배지와 배양방법을 개발할 수 있는 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다.

적 요

본 연구에서는 고추의 소포자 배양 시 전처리 후 배지의 교환 여부, 배양 후 새 배지의 첨가 및 2층배지 사용 시 하층고체배지의 양이 배의 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 고온 전처리 후 배양배지를 첨가하여 배양하는 것보다 사용한 전처리 배지를 새 배양 배지로 교환하여 배양 하는 것이 배의 생산에 효과적 이었으며, 고온전처리 기간은 1일이나 2일에 비해 3일이 효과적 이었다. 배양 후 새 배지의 첨가는 약전처리 시에는 효과가 없었으나 소포자 전처리 시에는 배의 유기와 발달 모두 크게 향상되었다. 새 배지의 첨가 시기는 배양 4일 후가, 첨가 횟수는 1회가 배의 생산에 가장 효과적이었다. 한편 2층배지 사용 시 첨가하는 새 배지의 양은 1.5 ml이 효과적이었으며 이보다 많은 양을 첨가하는 경우 배의 발생과 발달 모두 저하되었다. 액체배지 사용 시에 비해 2층배지 사용 시 배의 발달이 좋았다. 또 2층배지 사용 시 하층고체배지의 양이 3 ml 일 때 보다는 5 ml이나 7 ml일 때 배의 발생은 감소하였으나 배의 질이 향상되었다. 이와 같은 결과들은 고추에서 다수의 정상 자엽배를 생산 할 수 있는 소포자 배양시스템을 확립 하는데 중요한 기초자료가 될 것이다.

사 사

이 논문은 2010년도 목원대학교 연구년 지원에 의하여 연구되었음.

인용문헌

- Dias JS, Correia MC (2002) Effect of medium renovation and incubation temperature regimes on tronchuda cabbage microspore culture embryogenesis. *Sci Hortic* 93:205-214
- Dolcet-Sanjuan R, Claveria E, Huerta A (1997) Androgenesis in *Capsicum annuum* L.-Effects of carbohydrate and carbon dioxide enrichment. *J Amer Spc Hort Sci* 122: 468-475
- 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
- Fukuoka H, Ogawa T, Matsuoka M, Ohkawa Y, Yano H (1998) Direct gene delivery into isolated microspores of rapeseed (*Brassica napus* L.) and the production of fertile transgenic plants. *Plant Cell Rep* 17:323-328
- González-Melendi P, Testillano PS, Ahmadian P, Fadón B, Risueño MC (1996) New in situ approaches to study the induction of pollen embryogenesis in *Capsicum annuum* L. *European Journal of Cell Biology* 69:373-386
- Harwood WA, Bean SJ, Chen DF, Mullineaus PM, Snape JW (1995) Transformation studies in *Hordeum vulgare* using a highly regenerable microspore system. *Euphytica* 85:113-118
- Hansen M, Svinnsset K (1993) Microspore culture of swede (*Brassica napus* ssp. *rapifera*) and the effects of fresh and conditioned media. *Plant Cell Rep* 12:496-500
- Hoekstra, S, Van Zijderveld MH, Heidekamp F, Van der Mark F (1993) Microspore culture of *Hordeum vulgare* L.: the influence of density and osmolality. *Plant Cell Rep.* 12:661-665
- 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
- Huang B, Brid S, Kemble R, Simmonds D, Keller W, Miki B (1990) Effects of culture density, conditioned medium and feeder cultures on microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *Plant Cell Rep* 8:594-597
- Immonen S, Anttila H (2000) Media composition and anther plating for production of androgenetic green plants from cultivated rye (*Secale cereale* L.). *J Plant Physiol* 156:204-210
- Indrianto A, Barinova I, Touraev A, Heberle-Bors E. (2001) Tracking individual wheat microspores in vitro : identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo. *Planta* 212:163-174

- Jähne A, Lörz H (1995) Cereal microspore culture. *Plant Sci* 109:1-12
- Kim M (1999) The influence of temperature pretreatment on the production of microspore embryos in anther culture of *Capsicum annuum* L. *Kor J Plant Tissue 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
- Kim M, Jang IC, Kim JA, Park EJ, Yoon M, Lee Y (2008) Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep* 27:425-434
- Kim M, Park EJ, Lee Y (2010) Increased embryo production by manipulation of pretreatment materials and media in isolated microspore culture of hot pepper (*Capsicum annuum* L.). In : Kumar A, Sopory S (eds) Applications of plant biotechnology ; In vitro propagation, plant transformation and secondary metabolite production. International Publishing House Pvt Ltd, NewDelhi: 89-105
- Kott LS, Polsoni L, Ellis B, Beversdorf WD (1988) Autotoxicity in isolated microspore cultures of *Brassica napus*. *Can J Bot* 66:1665-1670
- 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
- Lantos C, Juhász AG, Somogyi G, Ötvös K, Vági P, Mihály R, Kristóf Z, Somogyi N, Pauk J (2009) Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. *Plant Cell Tiss Org Cult* 97:285-293
- Li H, Devaux P (2003) High frequency regeneration of barley doubled haploid plants from isolated microspore culture. *Plant Sci* 164:379-386
- Liu W, Zheng MY, Polle EA, Konzak CF (2002) Highly efficient doubled-haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis. *Crop Sci* 42:686-692
- Maraschin SF, Gaussand G, Pulido A, Olmedilla A, Lamers GEM, Korthout H, Spaink HP, Wang M (2005) Programmed cell death during the transition from multicellular structures to globular embryos in barley androgenesis. *Planta* 221: 459-470
- Mitykó J, Fári M (1997) Problems and results of doubled haploid plant production in pepper (*Capsicum annuum* L.) via anther- and microspore culture. *Acta Hort* 447:281-287
- Obert B, Szabó L, Mitykó J, Pret'ová A, Barnabás B (2005) Morphological events in cultures of mechanically isolated maize microspores. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 41:775-782
- Park EJ, Kim JA, Lee JS, J IC, Yoon MC, Chung SH, Kim M (2005) The influence of pretreatment period, 2-hydroxynicotinic acid, and anther co-pretreatment on embryo induction in isolated microspore culture of *Capsicum annuum* L. *Kor J Plant Biotech* 32:37-44
- Pedroso MC, Pais MS (1994) Induction of microspore embryogenesis in *Camellia japonica* cv. Elegans. *Plant Cell Tiss Org Cult* 37:129-136
- Polsoni L, Kott LS, Beversdorf WD (1988) Large-scale microspore culture technique for mutation selection studies in *Brassica napus*. *Can J Bot* 66:1681-1685
- 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: 77-89
- Supena EDJ, Muswita W, Suharsono S, Custers JBM (2006a) Evaluation of crucial factors for implementing shed-microspore culture of Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae* 107:226-232
- Supena EDJ, Suharsono S, Jacobsen E, Custers JBM (2006b) Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Rep* 25:1-10
- Swanson EB, Coumans MP, Wu SC, Barsby TL, Beversdorf WD (1987) Efficient isolation of microspores and the production of microspore-derived embryos from *Brassica napus*. *Plant Cell Rep* 6:94-97
- Swanson EB, Herrgesell MJ, Arnoldo M, Sippell DW, Wong RSC (1989) Microspore mutagenesis and selection: Canola plants with field tolerance to the imidazolinones. *Theor Appl Genet* 78:525-530
- Swanson EB (1990) Microspore culture in *Brassica* : In JW Pollard and JM Walker, eds, Methods in molecular biology, Vol. 6, Plant cell and tissue culture. Humana Press, New Jersey: 159-170
- Testillano P, Georgiev S, Mogensen HL, Coronado MJ, Dumas C, Risueno MC, Matthys-Rochon E (2004) Spontaneous chromosome doubling results from nuclear fusion during in vitro maize induced microspore embryogenesis. *Chromosoma* 112:342-349
- 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
- Zhou H, Konzak (1989) Improvement of anther culture methods for haploid production in wheat. Published in *Crop Sci* 29:817-821
- Zhou H, Zheng Y, and Konzak C.F, (1991) Osmotic potential of media affecting green plant percentage in wheat anther culture. *Plant Cell Rep* 10:63-66