

In Semi-Vitro 달맞이꽃花粉의 石灰에 의한 生長促進과 DNP 및 低溫의 그 抑制作用에 關하여

郭 炳 華 · 尹 慶 恩

(高麗大學校 農科大學 園藝學科)

Influences of DNP and Low Temperature on the Promotive Action of Calcium in *Oenothera* Semi-Vitro Pollen Growth

KWACK, Beyoung-Hwa and Kyung-Eun YOON

(Dept. of Horticulture, College of Agriculture, Korea University)

ABSTRACT

The promotive effect of Ca in semi-vitro culture of *Oenothera biennis* pollen was by and large identical to that of in vitro systems. This promotive effect became additive when boron was supplemented to the media and even more so if K was further supplemented. No such Ca action was observed when performed under the conditions of relatively low temperature. An uncoupling agent of ATP in respiration, DNP, inhibited the promotive action of B, but not that of Ca. The inhibitory effect of DNP was greater at low temperatures. IAA was rather inhibitory on pollen growth in semi-vitro culture, even much greater than it if DNP was supplemented to the IAA-containing media.

緒 論

花粉을 人工培養液에서 獨立的으로 伸長시켜 그 生長生理를 研究하기 보다 그 花粉을 암술切片 속을 直接 生長케 함으로써 一層 더 花粉生長을 自然狀態로 觀察할 수 있는 利點이 있는데 암술組織이 없는 *in vitro* 培養에 있어서의 花粉生長에 對한 石灰(Ca)의 效果는 *in semi-vitro* 培養에 있어서도 그에 恰似한 結果를 나타내고 있으나(Kwack—1965 B, Kwack—1968) 2,4—dinitrophenol(DNP)와 低溫을 作用시켜 呼吸効率을 낮게 함으로써 암술組織內에서 生長하는 花粉에 對한 石灰의 促進的作用을 그대로 維持시킬수 있는 것인가 아닌가를 花粉의 *in semi-vitro* *Oenothera* 培養에 便利한 달맞이꽃 花粉과 그 암술을 利用하여 實驗檢定한 結果를 考察報告하는 마이다.

材 料 및 方 法

供試된 花粉과 암술은 모두 달맞이꽃을 使用했는데 野生の *Oenothera biennis* 와 栽培種인 *O. organensis* 를 選擇했는데 이들의 암술대는 比較的 길고 花粉이 많으며 成熟한 花蕾狀態에서 쉽게 花粉이 發芽할 뿐만 아니라 암술도 反應的이어서 當日 저녁에 開花할 봉오리를 採取하여 柱頭가 달린 암술을 집어내어 十字로 分岐한 柱頭를 그 基部에서 切去한 다음 他花의 花粉을 受粉시키고(*O. organensis* 는 和合個體間) slide 上에 半圓形(直徑 10mm 內外, 높이 1.0~1.5mm)으로 滴下시킨 人工固形培養基(10% 蔗糖 + 100ppm 硼酸 + 1% 麥天)에 Fig. 2에 나타나 있는 것과 같이 1滴에 對해서 5mm 길이의 암

술대 1本式 直立시켜 1mm 길이로 挿入하고 培養했다. 이 培養基는 標準培養基로서 Ca가 包含되어 있지 않아 “-Ca”로 表示하고 Ca 添加培養基(300mg/l $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 또는 CaCl_2 와 100mg/l KNO_3 또는 KCl 即 窒酸物은 窒酸物끼리, 鹽化物은 鹽化物끼리 添加시키는데 이때 K ion의 添加는 Ca ion의 作用을 補助시킴에 그 意義가 있다)는 Ca 處理試驗用으로 使用했으며 DNP를 使用할 때는 언제나 5mg/l, indole 醋酸(IAA)도 5mg/l로 했다. 短時間培養이란 條件과 緩衝液의 成分影響을 憂慮해서 緩衝劑는 쓰지 않았으며 pH는 大概 5.5~6.0이었다. 이리하여 定溫器內의 29°C(高溫處理)와 冷藏器의 10°C(低溫處理)에 各各 5~7時間 生長시켜 암술切片下端部에서 生長한 花粉管數를 밝히고 그 中 最長의 것을 擇하여 顯微鏡下에서 micrometer로 測定한 다음 各處理의 效果를 檢定했다. 各滴에 插植된 암술로 부터의 值를 1反覆으로 잡고 每處理當 10反覆으로 하여 그 平均値를 求하여 相互比較하였다.

結 果

本 研究에 使用한 달맞이꽃은 屢次에 걸친 本 實驗培養法(過去 *O. organensis*에 適用시킨 方法)(Kwack 1965 B, Kwack 1968)으로 確認한 바에 依하면 完全花인 *O. biennis*는 同一花內에서 암수가 完全自家和合임을 發見했는데 이때 他花나 自家授粉에 있어서 암술內 花粉生長의 別差는 없었다. 이리한 가운데 標準培養基에 適量의 Ca나 硼素(B)分을 添加시켰을 때는 花粉生長이 促進되었고 Ca와 B가 共存하면 그 促進性이 增加되는 傾向이 있었는데(Table 1) 呼吸作用에 있어서의 adenosine diphosphate(ADP)의 uncoupling agent인 DNP를 極히 少量濃度 即 生理的濃度에서 作用시켰을 때는 高溫에서는 花粉生長을 甚히 阻害했으며 여기에 B를 混用했을 때에도 그 抑制作用을 除去할수 없었다(Table 2).

花粉管이 암술內를 生長할 때 下部에서 供給되는 Ca의 促進效果는 比較的 높은 溫度에서 顯著하였고(Fig. 2) DNP의 抑制效果는 低溫에서 더 甚했다. Ca의 이러한 效果는 高溫에서는 甚하지 않았든 便이었다(Table 3). Ca와 DNP를 培養基에 共添했을 때는 DNP의 效果와 Ca의 效果가 다같이 나타났던 것 같으나 無處理에 比하면 有意性있는 程度의 抑制的 效果는 보이지 않았다(Table 3, Fig. 2).

Table 1. Length of *Oenothera biennis* pollen tubes in millimeters as influenced by the standard medium(O), 300mg/l $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Ca) and or 100mg/l H_3BO_3 (B) at 29°C.

O*	Ca	B	Ca+B
4.46	6.37	6.92	7.79

LSD (1%)=1.83

*O.....10% sucrose+1% agar

Table 3. Length of *Oenothera biennis* pollen tubes in millimeters as influenced by the standard medium(O), 300mg/l $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Ca) and or 2,4-dinitrophenol(DNP) at two different temperatures.

	O*	Ca	DNP	Ca+DNP
10°C	5.9	6.22	0	0
29°C	5.19	7.94	1.83	4.04

LSD (1%)=1.53

* O.....10% sucrose+100mg/l H_3BO_3 +1% agar

Table 2. Length of *Oenothera biennis* pollen tubes in millimeters as influenced by the standard medium(O), 100mg/l H_3BO_3 (B) and or 5mg/l 2,4-dinitrophenol(DNP) at 29°C.

O*	B	DNP	B+DNP
4.46	6.92	1.28	2.73

LSD (1%)=1.86

*O.....10% sucrose+1% agar

Table 4. Length of *Oenothera biennis* pollen tubes as influenced by the standard medium(O) 300mg/l $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Ca) and or 100 mg/l KNO_3 (K) at 29°C.

O*	Ca	K	Ca+K
7.00	8.76	7.47	10.38

LSD (1%)=0.50

* O.....10% sucrose+100mg/l H_3BO_3 +1% agar

Table 5. Length of *Oenothera biennis* pollen tubes in millimeters as influenced by the standard medium (O), 5mg/1 indole acetic acid (IAA) and or 5mg/1 2,4-dinitrophenol (DNP) at 29°C.

O*	IAA	DNP	IAA+DNP
6.70	4.93	2.36	3.01

LSD (1%)=1.77

* O.....10% sucrose+100mg/1 H₃BO₃+1% agar

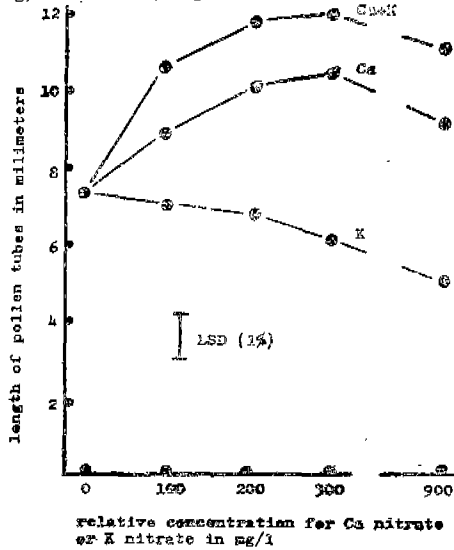


Fig. 1. Length *Oenothera biennis* pollen tubes as influenced by supplemented KNO₃ (K) and Ca(NO₃)₂ · 4H₂O, either alone or together to the standard medium (10% sucrose+100mg/1 H₃BO₃+1% agar) at 29°C.



Fig. 2. Growth of pollen tubes in styles of *Oenothera organensis* at 29°C.
 a...10% sucrose+100mg/1 H₃BO₃+1% agar(O)
 b...0+300mg/1 Ca(NO₃)₂ · 4H₂O(Ca)
 c...0+5mg/1 2,4-dinitrophenol

少量의 K가 標準培養基에 單獨으로 添加되었을 때는 花粉生長은 그다지 促進的效果가 없었으나 Ca는 그와 달리 效果가 컸다. Ca와 K가 共存할 때는 그들이 全然 없을 때나 各各 따로 單獨으로 存在할 때 보다는 越等하게 附加的인 效果를 나타내었다(Table 4).

여기서 各物質의 濃度를 달리했을 때에도(0~900 mg/l) 같은 傾向의 效果를 보였는데 Ca는 鹽酸

鹽으로서 300mg/l 內外가 가장 効果의 이었다(Fig. 1). IAA 는 암술을 通過하는 花粉生長은 抑制的으로 作用하며 그 程度는 DNP 보다는 적은것이었는데 IAA 와 DNP 가 共存했을 때에는 이 抑制效果가 附加되지는 않았다(Table 5). *O. biennis* 의 이같은 效果는 *O. organensis* 에도 同傾向이었다.

考 察

花粉이 암술內生長을 하는동안 *in semi-vitro* 狀態에서는 *in vitro* 때와 거의 同一한 樣의 Ca 效果와 B 效果(Brewfaker and Kwack 1963)를 나타내고 있으며 이들을 共添했을 때도 同一한 附加的인 效果를 나타냈다. B의 效果는 Ca의 境遇와는 달리 DNP와 共存했을 때 DNP의 花粉에 對한 生長抑制效果가 매우 顯著했음에 비해 Ca가 DNP와 共存했을 때에는 그 抑制效果가 甚하지 못했는데 B作用은 呼吸作用에 있어서의 ATP와 關係하는 metabolic한 것인데 비해 Ca는 이와 달리 non-metabolic한 過程을 밟아 作用하고 있음을 暗示하고 있다. Ca의 花粉生長에 미치는 *in vitro* 培養에 있어서의 效果는 non-metabolic한 過程임은 既報(Kwack 1965 A)한 바와 같으나 本研究에서는 B의 DNP에 對한 效果가 興味롭다. DNP의 花粉生長에 對한 抑制效果는 高溫에서보다 低溫에서 그 程度가 甚함은 DNP와 低溫이 다같이 呼吸 energy 生産을 다같이 協力해서 抑制하고 있는 까닭으로 생각되는데 Ca의 生長促進은 低溫에서 적어지고 高溫에서는 顯著해지는 것은 既刊(Kwack 1965 A)에서 考察한 바와 같이 花粉管壁上에서 pectin에 吸着하는 Ca가 高溫에서는 더욱 많아지고 또 反應的이 되는데 그 意義가 있다. DNP의 生長抑制效果는 大豆의 幼軸切片에 對해서도 恰似하였다(Kwack and Yoon 1968). *semi-vitro* 狀態에서의 Ca 效果는 K ion과 같은 補助的物質이 共存함으로 해서 더욱 顯著히 되는것은 *in vitro* 狀態와 같은 것인데 K뿐만 아니라 다른 여러가지 水溶性 無機 또는 有機物을 同伴했을 때도 그렇게 되는 事實과 理由는 既報(Kwack and Macdonald 1965)한 바와 같다. 花粉生長에 미치는 IAA 效果는 오히려 抑制的으로 作用하거나 거의 없는 것으로 알려져 있는데(Johri and Vasil 1961, Linskens 1964)筆者도 *in vitro* 狀態에서 그것을 確認했으며(Kwack and Macdonald 1965) 本研究의 *semi-vitro* 條件下에 있어서도 그러했고 相當히 抑制的이었는데 IAA가 DNP와 共存했을 때 나타낸 DNP의 附加的인 抑制效果는 마로 IAA의 作用이 生理的으로 metabolic한 過程을 지니고 있음을 指摘해주고 있는데 암술內生長을 하는 花粉管은 直接的으로 IAA作用을 안 받고 있으며 比較的 non-metabolic한 影響을 받아 자라남을 表示하고 있다. 이것은 auxin이 花粉生長을 아마 促進한다는 過去의 思考(安田 1951)와는 反對되는 現象이라 하겠다. IAA의 抑制效果에 DNP의 附加的인 效果가 없었다면 IAA作用이 呼吸 energy와 關係없이 行해지는 것이라 보겠지만 그렇지 못해 metabolic하게 作用하고 있음은 IAA의 花粉管生長 以外の 植物生長에 미치는 그 效果와 作用의 機構에 또한 恰似한 關連性이 있는 것이 아닐가 앞으로의 이方面的 研究發展이 注目된다.

摘 要

달맞이꽃(*Oenothera biennis* 및 *O. organensis*)花粉의 生長에 있어서 石灰의 促進的効果는 *in semi-vitro* 와 *in vitro* 에 있어서 서로 恰似한 것이며 그 作用이 硼素의 共存에 依해서 더욱 促進되고 加里의 添加로서 다시 促進되었는데 이의 單獨의 處理는 그러한 效果가 없었다 그러나 石灰效果는 DNP가 共存할때나 低溫下에서는 低下되었다.

DNP는 硼素作用을 많이 妨害하나 石灰作用은 그보다 弱하게 妨害했는데 이때 DNP作用은 低溫에서 더욱 甚했다.

IAA는 花粉 *in semi-vitro* 生長에 오히려 抑制的으로 作用했는데 DNP에 對한 低溫의 效果처럼 IAA에 DNP가 培養基에서 附加되었을 때 IAA 單獨時보다 더 甚한 程度의 抑制作用을 나타냈다.

文 獻

1. Brewbaker, J.L. and Kwack, B.H. (1963). The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. Amer. Jour. Bot. (USA) 50:859-865.
2. Johri, B.M. and Vasil, I.K. (1961). Physiology of pollen. Bot. Rev. (USA) 27:325-381.
3. Kwack, B.H. (1965A). On the action of Ca in pollen growth as influenced by interaction of the different Ca concentration, acidity and temperature. Kor. Jour. Bot. (Korea) 8:19-23.
4. Kwack, B.H. (1965B). Styler culture of pollen and physiological studies of self-incompatibility in *Oenothera organensis*. Physiol. Plant. (Sweden) 18:297-305.
5. Kwack, B.H. (1968). Semi-vitro culture of *Oenothera* pollen as influenced by calcium application. Kor. Jour. Hort. Sci. (Korea) 3:6-9.
6. Kwack, B.H. and Macdonald, T.(1965). The role of calcium in pollen growth as expressed by various water-soluble substances. Bot. Mag. (Japan) 78:163-170.
7. Kwack, B.H. and Yoon, K.E. (1968). Physiological activities exerted by various growth regulators, Ca and K ion on elongation of soybean hypocotyl segments. Kor. Jour. Bot. (Korea) 11:22-26.
8. Linskens, H.F. (1964). Pollen physiology. Ann. Rev. Plant Physiol. (USA) 15:256-270.
9. 安田貞雄(1951). 高等植物生殖生理學(東京).