

## *Petunia hybrida*의 約培養으로부터 callus 形成에 미치는 培養條件의 影響

鄭載東 · 李姪姬 · 池仙玉

慶北大學校 農科大學 園藝學科

Effects of Culture Condition on Callus Formation  
from Anther Culture of *Petunia hybrida*

Jae Dong CHUNG · Jung Hee LEE · Sun Ok JEE

Dept. of Horticulture, Coll. of Agriculture,  
Kyungpook National University.

### Abstracts

The study was conducted to get basic information for haploid production of *Petunia hybrida* through anther culture by investigating several factors, namely anther stage, culture medium, cold treatment, and genotypes. The results are summarized as follows;

Four genotypes of *Petunia hybrida* were used in a study of anther culture. Plants of each genotype were grown in controlled environments at 20–30°C with a 16h photoperiod. Equal numbers were harvested from each genotype. The anthers were taken from buds which had received the 14 days' cold treatment at 4°C. Anthers were dissected out aseptically and plated on 1/2 strength MS agar medium containing 5.0mg/ℓ 6-Benzylaminopurine(BAP). Four weeks after culture, light green callus was formed. From these calli, plantlets were regenerated on MS medium containing 2.0mg/ℓ 2-isopentenyl adenine(2ip) after 3 weeks.

Key Words : *Petunia hybrida* Anther culture, callus induction.

### 緒 論

自植性作物의 交雜育種에 半數體를 利用하게 되면 新品種의 育種年限을 크게 短縮시킬 수 있고, 他植性작물에 있어서도 半數체는 交配母本의 遺傳의 純度を 높이는데 매우 有用하

게 利用될 수 있다.

1920年代에 *Datura*, *Nicotiana*, *Triticum* 등에서 自然 半數체가 발견된 이래 植物遺傳育種學分野에서 半數체에 관한 많은 研究가 進行되어 왔으나, 人爲의 半數체를 얻는다는 것은 그리 쉬운 일이 아니었다. 그러나, 1964

년 Guha와 Maheshwari가 *Datura innoxia*의 藥을 器內培養하여 小孢子由來의 반수체를 얻는데 成功하므로서 藥培養에 의한 반수체식물의 獲得 可能性을 提示하였으며, 그 후 1967년에는 담배(Nüzeki and Kita, 1975; Sunderland and Nitsch, 1969)와 1968년에는 벼(Nüzeki and Kita, 1968)의 약배양으로부터 반수체식물을 얻은 이래 지금까지 많은 식물의 藥 또는 花粉배양을 통해서 반수체식물을 얻고 있다.

花卉類에 있어서도 약배양을 통하여 반수체식물을 얻고자하는 시도는 이루어지고 있지만, 일반主穀작물에 비해 그다지 큰 成果를 얻지 못하고 있는 실정이다. 그러나 화훼류 중에는  $F_1$ 雜種種子의 栽培에 이용하는 경우가 많기 때문에 능률적인 약배양방법이 開發되어 반수체식물의 획득이 容易해져서 단기간내 純系를 얻어  $F_1$ 종자 생산을 위한 교배모본으로 活用할 수 있다면 優良種子生産에 크게 寄與할 수 있을 것으로 생각된다.

화단용 초화류로 널리 재배되고 있는 페튜니아는 주로 교잡육종에 의해 품종이 改良되고 있어서 신품종育成에 상당한 육종연한이 소요되고 있는 실정이다. 그러므로, 페튜니아에서 효과적인 반수체생산법이 확립된다면 신품종의 육종연한도 크게 短縮될 수 있을 것이다.

약배양시 童貞生殖이 일어나는 경우(Last et al., 1990)는 소포자가 接合자와 같은 機能을 지녀 대부분의 球狀形단계에 있는 胚는 心臟形, 魚雷形단계로 발달하며 최종적으로 성숙한 배는 子葉이 전개되면서 小植物體로 성장하는 直接동정생식과, 소포자는 배가 형성되는 대신에 細胞分裂이 일어나 켈러스가 형성되며 켈러스가 계속 성장함에 따라 藥壁을 파열하고 밖으로 나오는 間接동정생식이 있는데 본 실험의 結果는 켈러스가 나와서 增殖하는 도중에 器官이 형성되어 식물체가 分化되는 後者の 과정을 가졌다.

본 실험에 사용한 페튜니아의 경우, 타화훼류에 비해서 약배양에 관한 연구가 다소 많이 이루어진 편으로 Engvild(1973), Sangwan과 Norreel(1975)은 약배양의 적절한 時期, 低溫處理效果, 再分化個體의 遺傳의 特性 등을 위

시하여 소포자배양을 통한 반수체식물 획득 가능성 등에 관하여 실험을 修行한 바 있다.

본 연구에서는 페튜니아의 반수체 생산效率를 向上시키고자 약배양에 影響을 미치는 약의 置床時期, 培地の 助成, 약의 前處理效果, 品種別 배양효율등에 대한 몇 가지 실험을 수행하여 얻어진 結果를 報告하는 바이다.

## 材料 및 方法

본 실험에서는 *Petunia hybrida*의 4개 品種 cv. "Titan red", "Titan blue", "Supermagic rose", "Supermagic white"를 사용하였다. 供試 품종의 種子는 버미큐라이트에 播種하고 1개월 후에 幼苗를 비닐포트에 가식시킨 다음 부엽:모래:발효물 3:1:1의 비율로 混合한 培養土를 넣은 直徑 12cm 비닐포트에 移植하여 8週후에 直徑 15cm 포트에 定式하고, 20-25°C의 恒溫室內에서 재배하였다.

裂開전의 花蕾를 採取하여 70%의 알코올로 30초간 表面殺菌하고 난 후에 즉시 2겹의 필터페이퍼를 간 패트리디쉬에 옮겨서 흔들어 주면서 알코올을 除去시킨 후 花冠을 切開하여 약을 花絲없이 切取해서 培地가 7ml씩 分注된 2.5cm×9cm 試驗管의 斜面배지상에 약 6-7개씩 置上한 후 25±2°C의 培養室內에서 7日間 暗培養한 후 2,000lux, 16시간 明培養 하였다.

각 처리별에 켈러스형성율은 배양 4주 또는 배양 8주째 調査하였으며, 치상한 전체약수에 대한 켈러스 형성수의 百分率로 계산하였다.

약배양으로부터 켈러스형성에 미치는 要因을 알기 위해 (표 1)과 같은 실험을 수행하였다.

먼저 花冠의 크기를 0.4-2.0cm으로 채취하여 4단계로 나누어서 적절한 크기의 花冠의 약을 7가지의 기본배지에 넣어서 배지효과를 緋明하고, 生長調節劑로 사용하는 NAA와 BAP의 添加시 나타나는 켈러스 유기율을 조사하였다. 약배양시 전처리 효과를 알아보기 위해서 開花전에 花冠이 달린 花株를 채취하여 滅菌水를 넣은 삼각플라스크내에 담구어서 4, 8, 15, 25°C에 5-20일간 처리하고 난 후 약을 分離배

Table 1. Some treatments to investigate factors affecting in anther culture of *P. hybrida*

Investigated factors	Treatments
Size of flower bud	0.4-0.8, 0.9-1.2, 1.2-1.6, 1.6-2.0cm
Culture medium	MS', 1/2MS', B <sub>5</sub> ', RP', Miller', Nitsch', White'
Growth regulators	NAA; 0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0mg/ℓ BAP; 0.1, 0.5, 1.0, 5.0mg/ℓ
Cold pretreatment and duration	Temp.; 4, 8, 15, 25°C Days; 5, 10, 15, 20.
Cultivars	'Titan red', Titan blue', 'Supermagic white' 'Supermagic rose'

Abbreviations; MS:Murashige & Skoog(1962), RP:Raquin & Pilet(1972), B<sub>5</sub>;Gamborg et al. 1968, Miller;Miller(1983), Nitsch; Nitsch(1969), White; White(1963), NAA:1-Naphthalene acetic acid. BAP:6-Benzylamino purine.

양하였다. 또, 품종간 배양효율을 알아보고자 공시품종 4종의 종자에서 나온 試料의 화너를 채취하여 1/2 MS배지에서 약을 치상한 후 1주일간격으로 조사하였는데 각 품종간 20反復으로 수행하였다.

#### 結果 및 考察

페튜니아의 藥培養에 있어서 약의 발육단계에 따른 캘러스형성율을 알아 보고자 花雷의 크기를 4단계로 나누어 배양한 결과는 (표 2)와 같다.

Table 2. Effect of size of flower bud on anther culture of *P. hybrida* cv. Supermagic rose.

Bud size (cm)	No. of anther inoculated	No. of callus induced (%)	
		After 30 days	After 60 days
0.4-0.8	134	54 (41.2)	62 (47.3)
0.8-1.2	134	64 (47.7)	64 (47.2)
1.2-1.6	112	50 (43.5)	50 (43.5)
1.6-2.0	101	18 (17.8)	18 (70.8)

Culture medium : B<sub>5</sub> (Gamborg et al, 1968), 1mg/ℓ NAA, 1mg/ℓ BAP.

화너의 길이가 0.8-1.2cm일 때의 약으로부터 캘러스 형성율이 가장 높았으며, 이 때의 약은 미숙상태인 1核期 상태로 관찰되었고, 화너의 크기가 클수록 감소하는 경향이있었다(Fig. 1.)

Engvild(1973)는 *P. axillaris*의 화너의 길이가 1.0-1.5cm일 때의 약을 배양하여 식물체를 얻

었다고 하였으며, Sopory와 Maheshwari(1973)는 花粉有絲分裂期에서 2核期の 약을 배양하여 식물체를 재생시켰다고 하였으나, 이들의 결과는 본 실험과 다소 차이가 있었다. 이는 대체로 花粉 4粉子期에서 1 핵기 末期의 화분을 배양함이 좋은 반응을 보인다고 하였으며,

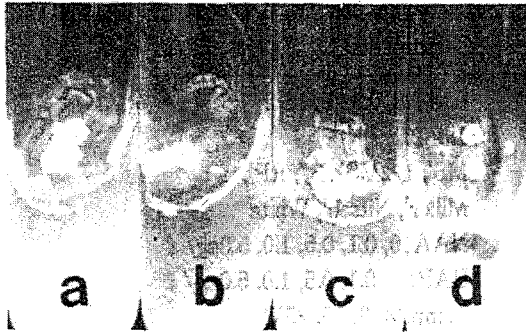


Fig. 1. Formation of green callus from anther culture of *Petunia hybrida* cv. Supermagic rose, 4 weeks after culture. Callus derived from flower bud size 0.4–0.8cm (a), 0.8–1.2cm (b), 1.2–1.6cm(c), 1.6–2.0cm (d).



Fig. 2. Proliferation of greenish compact callus, 8 weeks after culture.

遺傳子型에 따라 화서의 길이와 화분발육단계가 일치하지 않고 또한 동일 약내에서도 화분의 생성시기가 같지 않는데 起因하는 것으로 생각된다. 그러나 실질적인 면에 있어서는 유전자형별 화서의 크기와 화분발육과의 관계를

조사하여 이를 배양의 指標로 삼아야만 할 것으로 생각된다.

基本培地가 페튜니아의 약배양으로부터 캘러스 형성에 미치는 影響을 보면 (표 3)과 같다.

Table 3. Effect of basic media on callus formation from anther culture of *P. hybrida* cv. Supermagic rose.

Medium	No. of anther inoculated	No. of anthers with callus	
		After 4 weeks	After 8 weeks
MS	139	19 (13.6)	43 (30.9)
1/2 MS	138	49 (35.5)	71 (51.4)
B <sub>5</sub>	130	27 (20.7)	58 (44.6)
RP	164	34 (20.7)	78 (35.4)
Miller	170	37 (21.8)	61 (36.1)
Nitsch	169	39 (23.1)	13 ( 7.9)
White	165	4 ( 5.5)	

Hormone combination : 1.0mg/ℓ BAP, 1.0mg/ℓ NAA.

이들 배지중 1/2 MS배지에서 캘러스 형성을 이 가장 높은 편이었으며, B<sub>5</sub>배지 또는 Miller 배지에서도 40%이상으로 비교적 양호한 편이

었다(Fig. 2).

Raquin(1982)은 1/2MS배지에서 *P. hybrida*의 약을 배양했을 때 胚가 형성되었다고 하였으

며, Raquin과 Pilet(1972)은 MS배지에서 *P. hybrida* "Rose du ciel"의 약을 배양하여 1-2%의 캘러스가 형성되었으나 다른品種에서는 전혀反應을 나타내지 않았다고 하였다. 이외 Nitsch배지 또는 Nitsch and Nitsch배지를 사용하여 페튜니아의 약배양으로부터 캘러스 형성을 誘導한 예도 있으며, 이 배지에서 6-20%의 캘러스 형성율을 나타내었다고 하였다.

이와 같이 연구자에 따라 사용한 種 또는 品種, 培養用培地도 다르며 이에 따라 캘러스

형성율도 상당한 差異를 나타내고 있다. 이와 같은 결과는 遺傳子型에 따른 반응이 주된 要因일 것으로 판단되나, 본 실험의 결과 기본배지간 캘러스 형성율의 차이도 크기 때문에 培養效率을 높이기 위해선 보다 適合한 배지를 選定함도 중요하다고 하겠다.

배지내 함유된 生長調節물질이 약배양으로부터 캘러스형성에 미치는 영향을 보면 (표 4)와 같다.

Table 4. Effect of growth regulator on callus formation from anther culture of *P. hybrida* cv. Supermagic rose.

BAP(mg/ℓ)	NAA(mg/ℓ)	No. of anther cultured	No. of anther with callus(%)	
			After 4 weeks	After 8 weeks
0.1	0	137	0 ( 0 )	0 ( 0 )
	0.1	153	1 ( 0.6)	5 ( 3.2)
	0.5	134	26(19.4)	67(50.0)
	1.0	123	19(14.1)	65(50.8)
	5.0	131	21(16.0)	82(62.6)
0.5	0	121	0 ( 0 )	0 ( 0 )
	0.1	120	4 ( 3.3)	17 (14.1)
	0.5	125	16(12.8)	47(37.6)
	1.0	133	24(18.0)	82(61.6)
	5.0	140	21(15.0)	92(65.7)
1.0	0	141	0 ( 0 )	0 ( 0 )
	0.1	139	6 ( 4.3)	15 (10.7)
	0.5	141	40(28.3)	78(55.3)
	1.0	151	43(30.5)	84(53.6)
	5.0	119	34(28.5)	76(63.6)
5.0	0	133	0 ( 0 )	0 ( 0 )
	0.1	152	14 ( 9.2)	23 (15.0)
	0.5	141	45(31.9)	72(51.0)
	1.0	146	46(31.5)	73(50.0)
	5.0	142	51(35.9)	98(69.0)

Culture medium : 1/2 MS

BAP에 첨가된 NAA 농도가 증가됨에 따라 캘러스 형성율은 증가하는 경향을 나타내었으며, 이들 조합 중 BAP와 NAA가 각각 5.0mg/ℓ 첨가된 배지에서 캘러스 형성율이 가장 높

은 경향이었으나 캘러스의 상태가 극히 불량한 반면, BAP 0.5mg/ℓ 또는 1.0mg/ℓ 에 NAA 5.0mg/ℓ 가 첨가된 배지에서 캘러스 형성율 및 상태도 양호한 편이었다.

Raquin과 Pilet(1972), Sangwan과 Norreel(1975)은 페튜니아의 藥培養을 위해 NAA 0.1 mg/ℓ 와 BAP 1.0mg/ℓ 를 첨가한 배지를 사용하여 캘러스를 유도한 바 있고, Wager와 Hess(1973)는 NAA 0.5mg/ℓ 와 BAP 2.0mg/ℓ 를 첨가한 배지에서 다양한 染色體數를 가진 배를 유기한 바 있다고 하였다. 이와 같이 페튜니아의 약배양에 있어서 배지내 生長調節物質

의 농도에는 차이가 있으나 BAP와 NAA가 주로 이용되고 있으며 농도에 따라 캘러스, 배, 또는 식물체로 유기되는 양상이 다르므로 목적에 따라 적절한 농도의 生長調節물질이 배지에 첨가되어야 할 것으로 생각된다.

低溫處理시 온도 및 處理期間이 약배양으로부터 캘러스형성에 미치는 영향에 관해 檢討하였던 바 그 결과는 (표 5)와 같다.

Table 5. Effect of cold treatment on callus formation from anther culture of *P. hybrida* cv. Supermagic rose.

Temp. (°C)	Duration (days)	No. of anther cultured	No. of anther with callus (%)
con.	-	72	39 (54.1)
4	5	65	43 (66.1)
	10	64	46 (71.8)
	15	54	40 (74.0)
	20	60	39 (65.0)
	8	5	68
8	10	53	41 (77.3)
	15	51	17 (33.0)
	20	48	18 (37.5)
	15	59	34 (57.6)
25	5	40	20 (50.0)

Culture medium : 1/2MS, 5.0mg/ℓ BAP, 5.0mg/ℓ NAA

8°C로 조절된 恒溫機內에서 10일간 처리 후 약을 채취해서 배양하였을 때 77.4%로 가장 높은 캘러스 형성율을 보였으며, 4°C에서 10일 또는 15일간 처리후 약을 배양했을 때에도 높은 傾向이었으나, 15°C 또는 高溫處理와 8°C에서 15일간 長期間 處理는 캘러스 형성이 不良하였다. Mitchell등(1980)과 Martineau등(1981)은 5°C에서 5일간, Gupta(1982)는 5°C 또는 7-9°C에서 3-12일간, Malhotra와 Maheshwari(1977)는 6°C에서 2일간, 그리고 Babbar와 Gupta(1980)는 0°C에서 5일간 처리함으로써 培養効率が 增大되었다고 하였는데 이는 본 실험의 결과와 거의 類似하였으므로 다른 作物에서와 마찬가지로 페튜니아에서도 약배양전에 저온처리를 하는 것이 캘러스형성을

爲始하여 배발생에도 효과적인 것으로 判斷된다.

지금까지 *Petunia hybrida* cv. Supermagic rose를 이용하여 基礎實驗을 한 결과 약배양으로부터 캘러스 유도를 위한 最適條件을 이용하여 서로 다른 유전자형에 있어서 약배양의 효율을 검토코자 4품종을 對象으로 약을 배양하였던 바 그 결과는 (표 6)과 같다.

캘러스 형성율에 있어서 Supermagic rose가 가장 높은 傾向이었으나 그의 3품종은 22-28% 정도의 거의 비슷한 편이었다. 그리고 Supermagic계가 Titan보다 더 나은 캘러스 형성율을 나타내었으며 같은 Supermagic계내에서도 Rose가 White보다 거의 2배의 캘러스 형성율을 나타내었다.

Table 6. Callus formation from anther culture of several cultivars of *P. hybrida* cvs.

Cultivars	No. of anther cultured	No. of anthers with callus	
		After 4 weeks	After 8 weeks
Supermagic rose	162	58 (35.8)	86 (53.0)
Supermagic white	130	31 (23.8)	37 (28.4)
Titan red	156	18 (11.5)	34 (21.7)
Titan blue	145	20 (13.7)	33 (22.7)

Culture medium : 1/2 MS, 0.5mg/ℓ BAP, 5mg/ℓ NAA.

이와 같은 결과를 볼 때 품종간 또는 중간 캘러스형성에 미치는 영향이 다르다는 것을 보여주고 있다.

그리고 위의 실험에서 형성된 캘러스로부터 배양 3주후 2ip 2.0mg/ℓ가 함유된 MS 배지에서 식물체가 분화되었다(Fig. 3.).

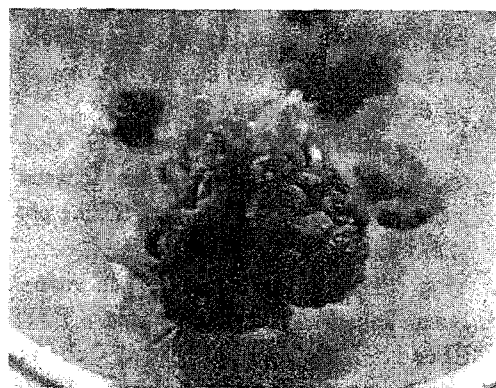


Fig. 3. Regeneration of multiple plantlets from callus after 3 weeks' culture.

### 摘 要

본 연구는 *Petunia hybrida* F<sub>1</sub> hybrid를 葯培養하여 半數體를 얻을 목적으로 葯의 置床時期와 培地の 種類, 生長調節物質의 종류와 농도, 葯의 前處理와 品種에 따른 캘러스 형성률을 조사하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

약배양하기 전 0.8-1.2cm의 길이의 花蕾가

달린 母本의 줄기를 4°C에서 15일간 低溫處理 하였다. 葯을 채취하여 1/2 MS배지에 NAA 5.0mg/ℓ, BAP 0.5mg/ℓ를 첨가한 배지 (sucrose 30 g/ℓ, 2 g/ℓ, pH 5.8)에서 배양 4주후 연녹색의 캘러스가 형성되었으며, 이들 캘러스로부터 배양 3주후 2ip 2.0mg/ℓ가 함유된 MS배지에서 식물체가 분화되었다.

### 引 用 文 獻

1. Babbar, S. B. and S. C. Gupta. 1980. Chilling induced androgenesis in anthers of *Petunia hybrida* without any culture medium. In : Evans, D. V., W. R. Sharp, P. V. Ammirato, and Yasuyki Yamada. 1983. Handbook of Plant cell culture. volume 5 : p. 662-692.
2. Engvild, K. C. 1973. Triploid petunias from anther culture. IN : Evans, D. V., W. R. Sharp, P. V. Ammirato, and Yasuyki Yamada. 1983. Handbook of Plant cell culture. volume 5 : p. 662-692.
3. Guha S. and S. C. Maheshwari. 1964. In vitro propagation of embryos from anthers of *Datura*. Nature. 204:497.
4. Gupta, P. P. 1982. Genesis of microspore-derived triploid petunias. IN : Evans, D. V., W. R. Sharp, P. V. Ammirato, and Yasuyki Yamada. 1983. Handbook of Plant cell culture. volume 5, pp. 662-692.
5. Last, D. I. and I. Richard and S.

- Brettell : 1990, Embryo yield in wheat anther culture is influenced by the choice of sugar in the culture medium. *Plant cell Reports*. 9 : 14-16.
6. Malhotra, K. and Maheshwari, S. C. 1977. Enhancement by cold treatment of pollen embryoid development in *Petunia hybrida* IN : Evans, D. V., W. R. Sharp, P. V. Ammirato, and Yasuyki Yamada. 1983. *Handbook of Plant cell culture*. volume 5, pp. 662-692.
  7. Martineau, B, Hanson, M. R, and Ausubel, F. M. 1981. Effect of charcoal and hormones on anther culture of *Petunia* and *Nicotiana*. IN : Evans, D. V., W. R. Sharp, P. V. Ammirato, and Yasuyki Yamada. 1983. *Handbook of Plant cell culture*. volume 5, pp. 662-692.
  8. Mitchell, A. Z, Hanson, M. R., Skvirsky, R. C., and Ausubel, F. M. 1980. Anther culture of *Petunia* : Genotypes with high frequency of callus, root or plantlet formation. IN : Evans, D. V., W. R. Sharp, P. V. Ammirato, and Yasuyki Yamada. 1983. *Handbook of Plant cell culture*. volume 5, pp. 662-692.
  9. Niizeki, H. and K. Oono. 1968. Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proc. Japan. Acad.* 1 : 1-11.
  10. Niizeki, M, and F. Kita. 1975. Production of aneuploid plants by anther culture in *Nicotiana tabacum* L. *Japan. J. Breed.* 1 : 52-58.
  11. Raquin, C. 1982. Genetic control of embryo production and embryo quality in anther culture of *Petunia*. *Theor. Appl. genet.* 63 : 151-154.
  12. Raquin, C. and pilet, V. 1972. Production de plantules 'a partir d' antheres de *Petunias* cultivees in vitro. IN : Evans, D. V., W. R. Sharp, P. V. Ammirato, and Yasuyki Yamada. 1983. *Handbook of Plant cell culture*. volume 5, pp. 662-692.
  13. Sangwan, R. S. and B. Norreel. 1975. Induction of Plants from anthers of *Petunia* cultured in vitro. *Nature*. 257 : 222-224.
  14. Sopory, S. K. and Maheshwari, S. C. 1973. In vitro production of plants from the anthers of *Petunia hybrida*. IN : Evans, D. V., W. R. Sharp, P. V. Ammirato, and Yasuyki Yamada. 1983. *Handbook of Plant cell culture*. volume 5, pp. 662-692.
  15. Sunderland, N. and C. Nitsch. 1969. Cultivation of haploid plants from tobacco pollen. *Nature*. vol. 224. No. 5225. pp. 1227-1229.
  16. Wager, G. and D. Hess. 1973. In vitro-Befruchtung be : *Petunia hybrida*. IN : HEvans, D. v, W. R. Sharp, P. V. ammirato, and Yasuyki Yamada. 1983. *Handbook of Plant cell culture*. volume 5, pp. 662-692.