

芍藥(*Paeonia lactiflora* Pall.) 花粉에서 由來된 胚의 發達과 分化植物體의 倍數性

孫再根* · 金光洙 · 金敬旻
경북대학교 농학과

Development of Pollen-Derived Embryos and Ploidy Level of Their Regenerated Plants in *Paeonia lactiflora* Pall.

Jae Keun SOHN*, Kwang Su KIM, and Kyung Min KIM

Department of Agronomy, Kyungpook National University, Taegu, 702-701. *Corresponding author.

Pollen-derived embryos cultured on the hormone-free medium showed a low germination frequency (12.5%) and poor growth response after germination. The greatest frequency of germination (81.3%) was obtained from the embryos cultured on medium with 0.3 mg/L GA₃. The embryos precultured for 20 days on medium with 0.3 mg/L GA₃ were transferred to the medium with various combinations of hormones such as IAA, kinetin, zeatin, 6-benzylaminopurine (BA) and GA₃. The germination frequency of cotyledonary stage embryos showed above 72% on media with all of the hormonal combinations, but the embryos germinated on medium with 2 mg/L BA or 0.1 mg/L kinetin and 0.3 mg/L GA₃ developed more vigorously into plantlets than those of other hormonal combinations. Torpedo-stage embryos cultured on medium with 0.3 mg/L GA₃ were pretreated for 8 weeks at 2-week intervals at 4°C. The germination frequency of the cold-pretreated embryos increased with the increment of pretreatment period from 2 to 8 weeks. The greatest frequency of germination (73.3%) was obtained from the embryos pretreated for 8 weeks at 4°C. The chromosomes of the root-tip cells of 77 plants grown for 40 days after germination were observed. Most of the regenerated plants were haploid (55.8%) or diploid (31.2%), but triploid (1.3%), tetraploid (5.2%), or aneuploid (6.5%) were also detected among them.

Key words: anther culture, cold treatment, embryo germination

일반적으로 식물의 藥이나 體細胞培養에서 形成된 성숙된 器內胚는 生長조절제가 첨가되지 않은 배지에서도 발아가 가능하지만 식물의 종류에 따라서는 器內胚의 성숙 및 발아율을 높이기 위해서 胚를 일정기간 저온처리하거나 배지내에 生長조절제를 첨가하는 것이 효과적인 것으로 알려져 있다 (Bhojwani and Razdan, 1983). 芍藥의 종자에서 절취된 胚培養에서도 일정기간 저온처리되지 않은 胚의 경우는 上胚軸이 신장되지 않아 발육이 부진하였으나 저온처리된 胚의 경우는 幼植物의 발육이 촉진되었다고 하며 (Meyer, 1976), BA와 GA₃가 혼용된 배지에 배양했을 때 발아 후의 생육이 양호했다는 보고도 있다 (Buchheim et al., 1994). 우리나라 栽培芍藥(*Paeonia lactiflora*)의 藥培養에서도

1核期 花粉小胞子를 갖는 藥을 2,4-D와 活性炭이 혼용된 배지에 배양했을 때 비교적 높은 빈도의 배형성률을 나타내었으나 (Sohn and Kim, 1993), 이들 小胞子由來의 胚를 前處理를 거치지 않고 生長조절제가 없는 배지로 이식했을 때는 子葉이 전개되고 일정기간 뿌리는 신장되었지만 그 이후의 생육은 정지되어 대부분의 경우 정상적인 식물체로 발육하지 못하였다.

따라서 본 연구에서는 芍藥의 藥培養에서 얻어진 胚의 발아 및 幼植物分化에 알맞은 조건을 구명하여 藥培養效率를 향상시키고자 이에 관여하는 몇 가지 요인에 대한 실험을 수행하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

본 연구에는 慶尙北道 農村振興院에서 蒐集保存해 오고 있는 地域種인 “義城芍藥”을 공시하였다. 1992년 5월 중순에 직경이 1.5 cm~2.0 cm인 花雷를 花莖이 10 cm 정도 부 착된 상태로 채취하여 증류수가 든 (5 cm 깊이) 비이커에 꽃아 외부를 비닐로 밀봉한 다음 5°C에 10일간 저온처리하였다. 저온처리된 花雷로부터 芍藥을 분리하기 전에 70% ethanol로 표면을 소독하고 멸균수로 2~3회 洗滌한 다음 꽃잎을 조심스럽게 제거하고 花雷當 50~60개의 芍藥을 배지가 20 mL씩 분주된 샬레에 20립씩 배양하였다. 芍藥을 24-D 가 1 mg/L, sucrose와 Gelrite가 각각 30 g/L, 2 g/L 첨가된 MS배지 (Murashige and Skoog, 1962)에 배양하여 캘러스를 誘起하였고, 배양 40일 후에 誘起된 캘러스를 sucrose와 Gelrite의 농도가 동일하고 zeatin이 0.2 mg/L 첨가된 MS배지 (胚形成培地)에 이식하여 배양 45일 후에 형성된 子葉出現期の 胚를 배양재료로 공시하였다.

Gibberellic acid (GA₃)가 胚의 발아 및 발육에 미치는 영향을 조사하고자 GA₃가 0~0.5 mg/L 첨가된 배지에 胚를 이식하여 40일 후에 각 처리별 胚의 발아를 및 생육양상을 조사하는 한편, 子葉出現期の 胚를 0.3 mg/L의 GA₃가 첨가된 MS배지에서 20일간 前培養한 다음 이들 胚를 IAA (0.2 mg/L), kinetin (0.1 mg/L), zeatin (0.2 mg/L), 6-benzylaminopurine (BA, 2 mg/L) 및 GA₃ (0.3 mg/L)가 단 용 또는 혼용된 배지에 이식하여 배양 40일후에 생장조절제의 조성별 胚의 발아률과 발아후의 생육양상을 비교하였다. 子葉出現期の 胚를 0.3 mg/L의 GA₃가 첨가된 배지에 이식하여 4°C에 2주간격으로 8주동안 저온처리하면서 저온 처리기간별 胚의 발아 및 생육양상을 조사하였다. 胚의 발아후 생육양상은 분화식물체의 shoot 신장이 3 cm 이상인 개체가 전체의 30 % 이상일 때를 양호한 생육상태 (++++)로 하고, 10% 미만일때를 불량(+)으로 하였다. 발아후 shoot와 뿌리의 생육이 양호한 개체를 vermiculite와 모

Table 1. Effect of GA₃ on organ formation from pollen-derived embryos.

GA ₃ (mg/L)	Activated charcoal (g/L)	Frequency of organ formation from embryos			
		No. of cultured embryos ^a	Embryos forming root(%)	Embryos forming shoots(%)	Embryos forming roots and shoots(%)
0	0	48	0 (0.0)	0 (0.0)	6(12.5)
0.3	0	48	4 (8.3)	5(10.4)	39(81.3)
0.5	0	45	3 (6.7)	9(20.0)	30(66.7)
0.3	5	57	0 (0.0)	12(21.1)	15(26.3)
0.5	5	45	0 (0.0)	6(13.3)	21(46.7)

^aMS basal medium contained 30 g/L sucrose and 2 g/L Gelrite.

래가 1:1로 혼합된 滅菌된 培養土에 이식하여 배양실에서 2 주동안 순화시킨 다음 온실에서 재배하였다.

芍藥培養에서 얻어진 식물체의 염색체수를 조사하고자 분화식물체의 根端 組織을 절취하여 0.002M의 5-hydroxyquinoline용액에 前處理 (15°C, 3시간)한 다음 acetic acid와 ethanol이 1:3 으로 혼합된 용액에서 24시간 고정하였다. 고정된 시료를 1N HCl용액 (60°C)에서 20초간 脫水시키고 45%의 acetic acid와 2% aceto-orcein을 각각 한방울씩 첨가해 5분간 염색하여 염색체를 검경하였다.

결과 및 고찰

芍藥의 芍藥培養에서 유기된 캘러스를 胚形成培地에 이식한 바, 배양후 45일경에 子葉出現段階의 胚 (Figure 1 A)로 발달하였다. 芍藥의 화분에서 유래된 子葉出現期の 胚를 GA₃와 活性炭이 첨가된 배지에 이식하여 배양 40일후에 각 처리별 胚의 발아 및 발아후의 생육양상을 조사한 바 (Table 1), 0.3 mg/L의 GA₃를 함유한 배지에서 胚의 발아률이 81.3 %로 가장 높았고 GA₃와 活性炭이 혼용된 배지에서도 GA₃가 첨가되지 않은 배지에서 보다는 胚發芽率이 높은 경향이었으나 GA₃단용에서 보다는 胚의 발아률도 낮고 생육양상도 불량하였다. 子葉出現期の 胚를 0.3 mg/L의 GA₃가 첨가된 배지에 이식하여 7~10일 정도 경과 되었을 때 子葉이 연한 녹색을 띄면서 완전하게 전개되었고(Figure 1 B), 25~30일 후에는 본엽이 출현되면서 뿌리가 신장되었다.

본 연구에서 芍藥의 子葉出現期の 胚를 GA₃ (0.3 mg/L)가 함유된 배지에 배양했을 때 胚의 발아률이 향상되었고 발아후의 생육양상도 양호하게 나타났는데 이는 *Citrus*屬 식물의 器內胚를 1 mg/L의 GA₃가 첨가된 배지에 배양했을 때 胚의 발아가 촉진되었다고 한 Gmitter와 Moore (1986)의

Table 2. Effect of plant hormones on organ formation from pollen-derived embryos.

Hormones(mg/L)					Frequency of organ formation from embryos				Growth ^b response
IAA	Kinetin	zeatin	BA	GA	No. of cultures embryos	Embryos forming root(%)	Embryos forming shoots(%)	Embryos forming roots and shoots(%)	
0.2	0	0	0	0	50	0 (0.0)	4 (8.0)	40(80.0)	++
0.2	0.1	0	0	0	50	4 (8.0)	10(20.0)	36(72.0)	+
0.2	0	0.2	0	0	50	0 (0.0)	4 (8.0)	46(92.0)	++
0	0.1	0	0	0	50	0 (0.0)	4 (8.0)	46(92.0)	++
0	0.1	0	0	0.3	50	8(16.0)	6(12.0)	36(72.0)	++++
0	0	0.2	0	0	50	2 (4.0)	0 (0.0)	42(84.0)	++
0	0	0	2	0	50	0 (0.0)	12(24.0)	38(76.0)	++++
0	0	0	0	0	50	4 (8.0)	0 (0.0)	46(92.0)	++

^aEmbryos were precultured for 20 days on MS medium with 0.3 mg/L GA₃.

^bGrowth response: ++++: excellent, +++: good, ++: moderate, +: poor.

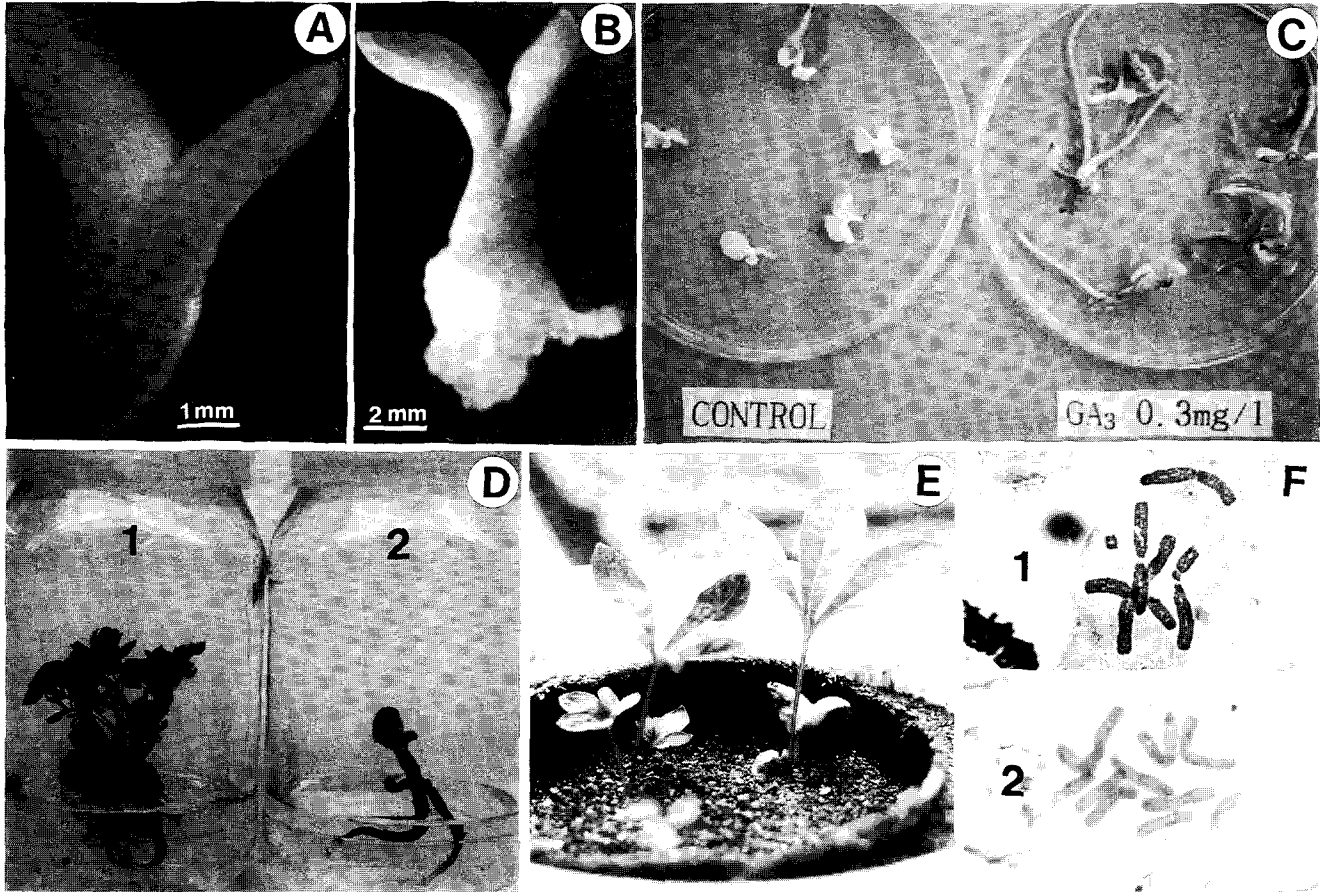


Figure 1. Haploid production and embryo formation from microspores in anther cultures of *Paeonia lactiflora*.

A: Cotyledonary stage embryo after 45 days of callus culture on MS medium with 0.2 mg/L zeatin. B: Embryo germination after 7 to 10 days of cotyledonary-embryo culture on medium with 0.3 mg/L GA₃. C: Effect of GA₃ on organ formation from embryos. D: Plantlets after 8 weeks at 4°C (1), and at 25°C (2). E: Plantlets transplanted in potting soil. F: Chromosomes of haploid (1) and diploid plants (2) derived from pollens.

보고 및 caraway의 器內胚를 0.3 mg/L 이하의 GA₃가 함유된 배지에 배양했을 때 胚의 발육이 양호했다고 한 Ammirato (1977)의 연구결과와 GA₃의 처리효과면에서는 유사한 경향이였다.

0.3 mg/L의 GA₃가 첨가된 배지에서 20일동안 前培養된 胚를 IAA, kinetin, BA, zeatin 및 GA₃가 단독 또는 혼용된 배지에 배양하여 배양 40일후에 각 처리별 胚의 발아 및 생육양상을 조사한 바 (Table 2), 모든 처리구에서 72% 이상의 높은 발아를 보였으나, 식물체의 생육면에서는 0.1 mg/L의 kinetin과 0.3 mg/L의 GA₃가 혼용되거나 2 mg/L의 BA가 단독된 배지에서 가장 양호한 것으로 나타났다. Kinetin (0.1 mg/L)이 단독되거나 IAA (0.2 mg/L)와 zeatin (0.2 mg/L)이 혼용된 배지에서도 胚의 발아률은 92%로 높게 나타났으나 발아후의 생육이 좋지 못한 경향이였다. Vicitez 등 (1992)은 *Fagus*屬의 器內胚를 BA가 0.5~1 mg/L 첨가된 배지에 배양했을 때 胚가 신장되고 녹색으로 변하면서 완전한 식물체로 발달하였다고 하였고, Ellis 등 (1991)은 *Picea gluca*의 不定芽 誘導에 zeatin보다는 BA (2 mg/L)가 효과적

이었다고 하였는데 본 연구에서도 GA₃가 첨가된 배지에서 일정기간 前培養된 胚를 kinetin이나 zeatin이 각각 단독된 배지에 이식하는 것보다는 2 mg/L의 BA가 단독된 배지에 이식하였을 때 胚의 발아후 생육이 촉진되는 것으로 나타나 芍藥의 경우 子葉出現期の 胚를 GA₃ (0.3 mg/L)가 첨가된 배지에서 약 20여일간 前培養한 후 BA (2 mg/L)를 함유한 배지에 이식하는 것이 幼植物 발육에 효과적일 것이라고 생각된다.

0.3 mg/L의 GA₃가 첨가된 배지에 子葉出現期の 胚를 배양하여 4°C에 2주간격으로 8주동안 저온처리하면서 저온처리 기간별 배양 20일후의 胚의 발아률 및 생육양상을 조사한 바 (Table 3), 전체적으로 저온처리기간이 길어질수록 胚의 발아률 및 생육양상이 향상되었는데, 저온처리되지 않은 胚의 발아률은 33.3%로 낮은 데 비해 8주동안 저온처리된 胚의 경우 발아률이 73.3%로 높게 나타났고, 발아후의 식물체 생육양상도 가장 좋았다. Rajasekaran과 Mullins (1979)는 葡萄의 藥培養에서 형성된 胚를 4°C에 2주간 저온처리하지 않으면 정상적인 식물체를 얻기 어렵다고 하였고

Table 3. Effect of low temperature pretreatment on organ formation from pollen-derived embryos.

Pretreatment ^a (days)	Frequency of organ formation from embryos				Growth ^c response
	No. of cultured embryos ^b	Embryos forming root(%)	Embryos forming shoots(%)	Embryos forming roots and shoots(%)	
0	24	0 (0.0)	7(29.2)	8(33.3)	++
14	43	1 (2.3)	19(44.2)	16(37.2)	++
28	73	27(37.0)	17(23.3)	29(39.7)	+++
42	117	11 (9.4)	15(12.8)	80(68.4)	+++
56	135	12 (8.9)	10 (7.4)	99(73.3)	++++

^aPretreatment: 4°C, dark condition.^bMS + 0.3 mg/L GA₃ + 30 g/L sucrose + 2 g/L Gelite.^cGrowth response: ++++: excellent, +++: good, ++: moderate, +: poor.

Vilaplama-Mashall과 Mullins (1986)는 葡萄의 胚培養에서 저온처리와 GA₃ 또는 cytokinin의 조합에 의해 최고의 문제점인 胚의 休眠을 타파할 수 있어서 胚發芽率을 1%에서 20~30%로 향상시킬 수 있었다고 하였다. 芍藥의 종자에서 절취된 胚培養에서도 저온처리에 의해 幼植物의 발달을 촉진시킬 수 있었다고 하였는데 (Meyer, 1976) 이러한 연구 결과들은 器內胚의 低溫處理 효과면에서 본 연구의 결과와 유사한 경향이였다.

芍藥의 藥培養에서 재분화된 식물체 77개체에 대한 염색체수를 조사한 바(Table 4), 半數體와 二倍體가 각각 55.8%, 31.2%로 가장 많았으며, 3倍體(1.3%)와 4倍體(5.2%)도 있었고, 染色體數가 4개(1.3%) 또는 6개(5.2%)인 異數體도 있었다. 식물의 藥培養에서 재분화된 식물체는 이론적으로는 半數體이어야 하나 대부분의 경우 半數體와 2倍體의 出現頻度가 가장 높고 식물에 따라서는 多倍體와 異數體도 출현된다는 것이 잘 알려져 있고, Sunderland (1974)와 Bajaj(1983)는 이러한 染色體變異의 원인에 대해서 보고한 바 있다.

적 요

藥培養에서 형성된 胚를 GA₃가 첨가되지 않은 MS배지에 배양한 결과 발아률이 12.5%로 낮았으나, 0.3 mg/L GA₃가 첨가된 배지에서는 81.3%의 높은 발아률을 보였고 발아후의 생육양상도 양호하였다. 子葉出現期の 胚를 GA₃ (0.3 mg/L)가 첨가된 MS배지에서 20일 동안 前培養한 후 IAA, cytokinin 및 GA₃가 단용 또는 혼용된 배지에 배양한 바 胚의 발아률은 모든 처리에서 72% 이상의 높은 발아률을 보였으나 발아후의 생육면에서는 2.0 mg/L의 BA 단용 또는 0.1 mg/L의 kinetin과 0.3 mg/L의 GA₃가 혼용된 배지에서 가장 좋았다. 0.3 mg/L의 GA₃가 첨가된 배지에 子葉出現期

Table 4. Ploidy level of plants regenerated from anther culture of *P. lactiflora*

No. of chromosomes	No. of plants (%)
4	1 (1.3)
5	43(55.8)
6	4 (5.2)
10	24(31.2)
15	1 (1.3)
20	4 (5.2)
Total	77(100.0)

의 胚를 이식하여 4°C에 8주동안 저온처리하면서 저온처리기간별 胚의 발아률 및 발아후의 생육양상을 조사한 바 저온처리기간이 길어질수록 胚의 발아률이 향상되어 8주동안 저온처리된 배에서 73.3%의 가장 높은 발아률을 나타내었고 발아후의 생육양상도 가장 양호하였다. 芍藥의 藥培養에서 재분화된 식물체의 배수성을 조사한 바 분화식물체 77개체 중 半數體와 二倍體가 각각 55.8%와 31.2%로 가장 많았고, 4倍體(5.2%)와 3倍體(1.3%)도 있었으며 염색체수가 4개(1.3%) 또는 6개(5.2%)인 異數體도 있었다.

사 사

이 논문은 1993년도 농촌진흥청 특정개발연구비에 의하여 연구된 것임.

인 용 문 헌

- Ammirato PV (1977) Hormonal control of somatic embryo development from cultured cells of Caraway. *Plant Physiol* 59: 579-586
- Bajaj YPS (1983) In vitro production of haploids. In DA Evans, WR Sharp, PV Ammirato, Y Yamada, Handbook of Plant Cell Culture Vol. 1. Macmillan, New York, pp 228-287
- Bhojwani SS, Razdan MK (1993) Plant tissue culture: theory and practice. Elsevier, Amsterdam, pp 91-141
- Buchheim JAT, Burkhart LE, Meyer MM Jr (1994) Effect of exogenous gibberellic acid, abscisic acid, and benzylaminopurine on epicotyl dormancy of cultured herbaceous peony embryos. *Plant Cell, Tissue, and Organ culture* 36: 35-43
- Meyer MM Jr (1976) Culture of *Paeonia* embryos by in vitro techniques. *Amer Peony Soc Bul* 217: 32-35
- Ellis DD, Barczynska H, McCown BH, Nelson N (1991) Comparison of BA, zeatin and thidiazuron for adventitious bud formation from *Picea glauca* embryos and epicotyl explants. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 27: 281-287.

- Gmitter FG Jr, Moore GA (1986)** Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic calli of *Citrus*: embryo production, germination and plant survival. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 6: 139-147
- Sohn JK, Kim YH (1993)** Effect of plant growth regulators on callus and embryo formation in anther culture of *Paeonia lactiflora* Pall. *Korean J Plant Tissue Culture* 20: 255-259
- Murashige T, Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 71-78
- Rajasekaran K, Mullins MG (1979)** Embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines. *J Exp Bot* 30: 399-407
- Sunderland N (1974)** Anther culture as a means of haploid induction. *In* KJ Kasha, ed, *Haploids in Higher Plants-Advances and Potentials*, Guelph, Canada, pp 91-122
- Vieitez FJ, Ballester A, Vieitez AM (1992)** Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cell suspension cultures of *Fagus sylvatica* L.. *Plant Cell Reports* 11: 609-613
- Vilaplama-Marshall M, Mullins MG (1986)** Establishment of grapevines from somatic embryos. *HortScience* 21: 182

(1994년 6월 18일 접수)