

## 미나리아재비(*Ranunculus japonicus* Thunb.)의 약배양에 의한 미숙 화분 유래의 식물체 재분화

고정애\* · 김영선<sup>1</sup> · 김명준 · 은종선

전북대학교 농과대학 원예학과, <sup>1</sup>원광대학교 농과대학 원예학과

### Immature Pollen-Derived Plant Regeneration in Anther Cultures of *Ranunculus japonicus* Thunb.

Jeong Ae KO\*, Young Seon KIM<sup>1</sup>, Myung Jun KIM, and Jong Seon EUN

Department of Horticulture, Chonbuk National University, Chonju 560-756; and

<sup>1</sup>Department of Horticulture, Wonkwang University, Iri 570-749. \*Corresponding author.

In order to induce immature pollen-derived plants, anthers of *Ranunculus japonicus* Thunb. were cultured on Murashige and Skoog's medium supplemented with various combinations of auxins and cytokinins. The combinations of NAA and BA were more effective than those of 2,4-D and kinetin in the formation of calli and embryos. Up to 54.5% of the anthers cultured on medium containing 0.5 mg/L NAA and 1.0 mg/L BA gave rise to plantlets. The most suitable stage for anther culture in the induction of calli and/or embryos from immature pollens was at the uninucleate and early binucleate stage (3 days before anthesis). Immature pollens developed into embryos by repeated division of the vegetative nucleate after 60 days of culture.

**Key words:** binucleate stage, uninucleate, vegetative nucleate

미나리아재비는 우리나라 산야의 햇빛이 잘드는 풀밭이나 논, 밭둑에서 자라고 5-6월에 노란 꽃이 피는 야생초로서, 같은 속에 속하는 개구리자리(*Ranunculus sceleratus*)에 대해서는 줄기의 표피조직(Konar and Nataraja, 1965a, b)과 화기(Konar and Nataraja, 1969)로부터 체세포배를, 그리고 잎의 원형질체로부터는 기관분화를 통해 식물체를 재분화(Dorin et al., 1975)시키는 등 많은 연구가 되어진 반면에 미나리아재비에 대한 연구보고는 미흡한 상태이다. 본 연구에서는 미나리아재비의 조직배양에 있어서 미숙화분유래의 식물체를 얻기 위해서 약을 배양하여 배지내 첨가되는 생장조절제의 종류와 농도, 화분의 발육단계별로 캘러스, 배발생 및 식물체 재분화에 미치는 영향을 조사하였다.

#### 재료 및 방법

전북대학교 농과대학 실험포장에 자생하고 있는 미나리아재비(*Ranunculus japonicus* Thunb.)의 어린 화퇴의 약을 이용하였다. 배양에 적합한 약의 발육정도를 결정하기 위하

Table 1. Classification of pollen stage.

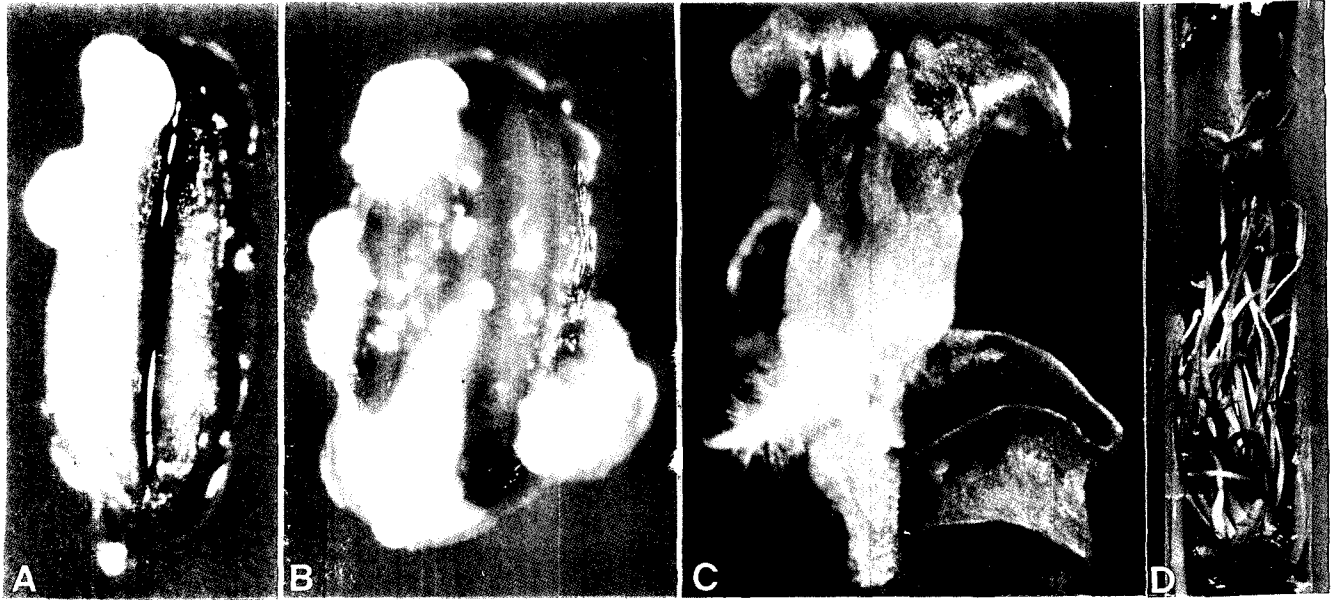
Pollen stage <sup>a</sup>	Bud length / Width <sup>b</sup> (mm)	Anther color	Days before anthesis
I	1.8 ± 0.4 / 2.1 ± 0.5	Greenish yellow	5
II	2.4 ± 0.5 / 2.9 ± 0.5	Light yellow	3
III	4.0 ± 0.7 / 3.4 ± 0.6	Yellow	1

<sup>a</sup> I : Dyad-tetrad, II : Uninucleate-early binucleate, III : Late binucleate pollen stage.

<sup>b</sup>The values represent means of 5 replications (±SE).

여 화퇴의 길이가 1.8 - 4.0 mm의 것을 크기별로 3군으로 나누어(Table 1) 약을 적출한 다음 2% propiono-carmin으로 염색한 후 화분의 발육정도를 조사하였다. 배양약은 개화 5일전의 2분자기 - 4분자기부터 개화 1일전 2핵성의 성숙 화분에 이르는 화퇴의 약을 사용하였다.

배지는 MS(Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에 2,4-D, NAA, kinetin 및 BA 등을 Table 2와 같이 조합하였고 30 g/L sucrose를 첨가하여 pH 5.8이 되도록 조절하였으며, 8 g/L의 한천을 첨가하여 사용하였다. 평균은 화퇴를 95%에



**Figure 1.** Embryogenic callus formation from the inner part of anther cultured on medium containing 0.5 mg/L NAA and 1.0 mg/L BA after 50 (A) to 70 (B) days of culture. Regenerated plants from the immature pollen-derived calli and embryos cultured on medium containing 0.5 mg/L NAA and 1.0 mg/L BA after 90 (C) to 120 (D) days of culture.

탄올에 수초간 침지한 후 7% calcium hypochlorite 수용액에 10분간 소독한 다음 약을 적출하여 처리구당 6개씩 15반복으로 치상하였으며 치상한 약은 25 ± 2°C 의 항온기에서 암배양하였다. 배양중 미숙화분의 변화를 조사하기 위하여 배양 10일간격으로 약을 꺼내 고정한 후 2% propioncarmine으로 염색하여 squash방법으로 관찰하였다. 유도된 캘러스와 배는 유식물체를 재분화시키기 위해 0.5 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA가 첨가된 MS배지에 옮긴 후 2,000 lux의 형광등 조명으로 계대배양하였다.

### 결과 및 고찰

미숙화분 유래의 캘러스 및 배발생에 미치는 성장조절제의 영향

배지내 첨가되는 성장조절제의 종류와 농도에 따라 캘러스 및 배의 발생에는 차이를 보여 성장조절제가 첨가되지 않은 대조구에서는 배양 90여일이 경과되어도 아무 변화가 없었고 0.5 mg/L 24-D 및 1.0 mg/L kinetin이 첨가된 경우 유연한 점액성의 캘러스가 어느 정도 증식하다가 갈변, 고사하였으며 2.0 mg/L 24-D와 1.0 mg/L kinetin이 첨가된 경우는 계속적으로 캘러스만 증식되고 있을 뿐 배의 발생이나 기관분화는 관찰할 수 없었다(Table 2). 그러나 NAA와 BA 혼용처리구에서는 배양 2주후부터 약의 표면이 담갈색화하였으며 배양 50일경에는 담갈색화된 약의 봉합선이 열개되면서 내부로부터 희고 단단한 배발생적 캘러스가 발생

**Table 2.** Effect of plant growth regulators on callus, embryo and plant regeneration in anther cultures of *Ranunculus japonicus* Thunb. after 120 days of culture.

Treatment (mg/L)				No. of anthers cultured	No. of anthers producing callus	No. of anthers producing embryos	No. of anthers producing plantlets
24-D	NAA	Kinetin	BA				
0			0	60			
0.5			1.0	64	2 ( 3.1) <sup>a</sup>		
1.0			1.0	66			
2.0			1.0	70	5 ( 7.1)		
	0.5		0.5	60		1 ( 1.5)	
	0.5		1.0	66	20 (30.0)	16 (24.2)	36 (54.5)
	0.5		2.0	60	7 (11.7)	2 ( 3.3)	9 (15.0)
	1.0		0.5	75			
	1.0		1.0	76		1 ( 1.3)	
	1.0		2.0	79	40 (50.6)	3 ( 3.7)	
	2.0		2.0	80	20 (25.0)	2 ( 2.5)	

<sup>a</sup>Numbers in parentheses indicate percentage to number of cultured anthers.

되었는데(Fig. 1A) 0.5 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA 처리에서는 배양 70일경에는 캘러스가 왕성하게 증식되었고(Fig. 1B), 배양 90일경에는 이들 배발생적 캘러스로부터 배가 발생되어 자엽과 뿌리가 분화되기 시작하였으며(Fig. 1C), 배양 120일경에는 정상적인 식물체로 재분화되었다(Fig. 1D). 그러나 NAA가 1.0, 2.0 mg/L로 농도가 높아짐에 따라 발생된 캘러스와 배는 갈변되었고 더 이상 식물체로 분화되지 않았다.

*Nicotiana tabacum* (Nitsch and Nitsch, 1969), *Datura innoxia* (Sunderland, 1974) 등의 몇몇 식물에서는 기본배지

**Table 3.** Effect of pollen stage on callus, embryos, and plantlets regeneration in anther cultures of *Ranunculus japonicus* Thunb.<sup>a</sup>

Pollen <sup>b</sup> stage	No. of anthers cultured	No. of anthers producing callus	No. of anthers producing embryos	No. of anthers producing plantlets
I	128	41 (32.3) <sup>c</sup>	12 (9.4)	8 (6.3)
II	146	70 (48.6)	23 (15.7)	2 (1.4)
III	126	0	0	0

<sup>a</sup>Anthers were cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/L NAA and 1.0 mg/L BA. Data were collected after 90 days of culture.

<sup>b</sup>Pollen stage is the same as Table 1.

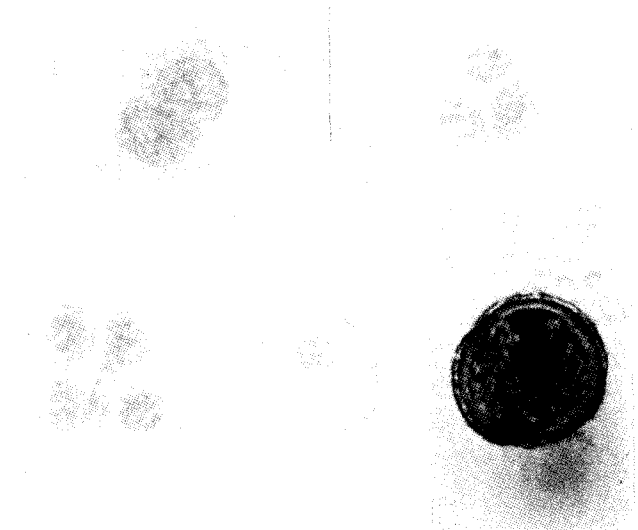
<sup>c</sup>Numbers in parentheses indicate percentage to the number of cultured anthers.

만으로도 약배양이 가능하지만 본 실험에서는 생장조절제가 첨가되지 않은 대조구에서는 배양 도중 전혀 반응이 없었던 것으로 보아 생장조절제에 의존적인 식물로 생각된다. 대부분의 식물에서는 기본배지내에 auxin 및 cytokinin 등과 같은 생장조절제가 첨가되었을 때 효과적이라 하여 생장조절제에 의해 크게 영향을 받는다(Maheshwari et al., 1982).

*Hyoscyamus niger* (Corduan, 1975)와 *Digitalis purpurea* (Corduan and Spix, 1975)는 2,4-D를 단독처리했을 때, 그리고 *Brassica oleracea* (Kameya and Hinata, 1970)와 *Lilium elegance* (Lee et al., 1992)는 2,4-D와 kinetin을 혼용처리했을 때, *Guizotia abyssinica* (Sarvesh et al., 1993)의 경우 2,4-D 및 kinetin과 NAA 및 BA 조성의 비교에서 2,4-D 및 kinetin을 혼용하였을 때는 배발생적 캘러스를, 그리고 NAA와 BA처리에서는 비배발생적 캘러스를 획득하여 2,4-D와 kinetin의 효과를 인정하였다. 그러나 본 실험의 미나리아재비는 2,4-D와 kinetin 조성에서는 극소수의 약에서 캘러스만 증식되었을 뿐 식물체의 재분화가 없었으나 NAA 및 BA 첨가구에서는 약내에서 희고 단단한 캘러스와 배가 다량으로 증식되어 도라지(Lee et al., 1993), 개구리자리(Lee et al., 1993)의 경우와 같은 결과로서 2,4-D 및 kinetin 보다는 NAA와 BA의 효과가 확실하였다. 한편, 1.0-2.0 mg/L NAA와 BA를 처리한 구에서는 발생된 캘러스와 배가 배양 기일이 경과됨에 따라 같변, 또는 생장의 지연이 계속되었고 0.5 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA 혼합처리구에서는 초기 발생된 캘러스 및 배가 왕성한 증식을 보이면서 배양 120일에서는 정상적으로 모식물체와 동일하게 재분화되어 적절한 배지조성이라고 생각된다.

#### 화분의 발육정도별 캘러스 및 배발생효과

화분의 발육정도가 캘러스 및 배발생에 미치는 영향을 조사하기 위해 2분자기 및 4분자기, 그리고 1핵성-초기 2핵성 미숙화분 및 개화 1일 전의 성숙화분 등으로 구분하여



**Figure 2.** Stages of pollen development in *Ranunculus japonicus* from stage I anther (5 days before anthesis) after 90 days of culture. (A): Dyad, (B): Tetrad, (C): Isolated microspores after dissolution of callose, (D): Metaphase of first pollen mitosis, (E): Pollen grain after first pollen mitosis.

MS 기본배지에 0.5 mg/L NAA 및 1.0 mg/L BA를 첨가하여 배양하였다(Table 3).

자연상태의 개화 5일전의 약내에는 2분자기 및 4분자기 대부분이었고 극소수에서만 4분자기에서 분리된 어린 1핵성 미숙화분에 해당되었는데(pollen stage I), 배양 2주일 후부터 약표면이 담황색화되기 시작하였고, 배양기간이 경과되면서 약의 표면과 화사의 절단면에서 담황색의 부스러지기 쉬운 비배발생적 캘러스가 발생되어 배양 50일경에는 치상약의 대부분이 캘러스덩이화 하였다. 그러나 개화 3일전의 약은 대부분 핵분열이 진행되고 있거나 핵분열 직후의 초기 2핵성 미숙화분으로서(pollen stage II) 배발생적 캘러스가 발생되기 시작하여 증식된 캘러스상에 둥근 모양을 띤 배들이 발생되고 있음이 관찰되었다. 발생된 캘러스 및 배를 분리하여 동일배지에 배양한 후 2,000 lux의 형광등에서 명배양시켰던 바 배로부터 정상적인 식물체로 급속증식되었다. 한편, 개화 1일전의 약(pollen stage III)은 핵분열 후 영양핵과 생식핵으로 구분되었고 세포질의 합성이 일어나 핵 및 세포질이 짙게 염색된 화분들이 대부분이며 배양 도중 약이 담갈색으로 변화된 후 캘러스 및 배발생에 대해 전혀 반응이 없었다.

약배양에 있어서 치상 당시 소포자의 발육단계는 캘러스 및 배의 유도에 중요한 요인이 된다고 보고된 후(Sunderland, 1974) 많은 식물에서 배양적기를 구명하고자 노력해 온 결과 대체적으로 식물체마다 적절한 약의 배양 시기가 있음이 밝혀졌다. 약배양이 잘되는 담배의 경우 소포자의 4분자기(Nakata and Tanaka, 1968), 1핵기 말기 즉 핵분열기 직전(Nitsch and Nitsch, 1969), 핵분열이 끝난 직

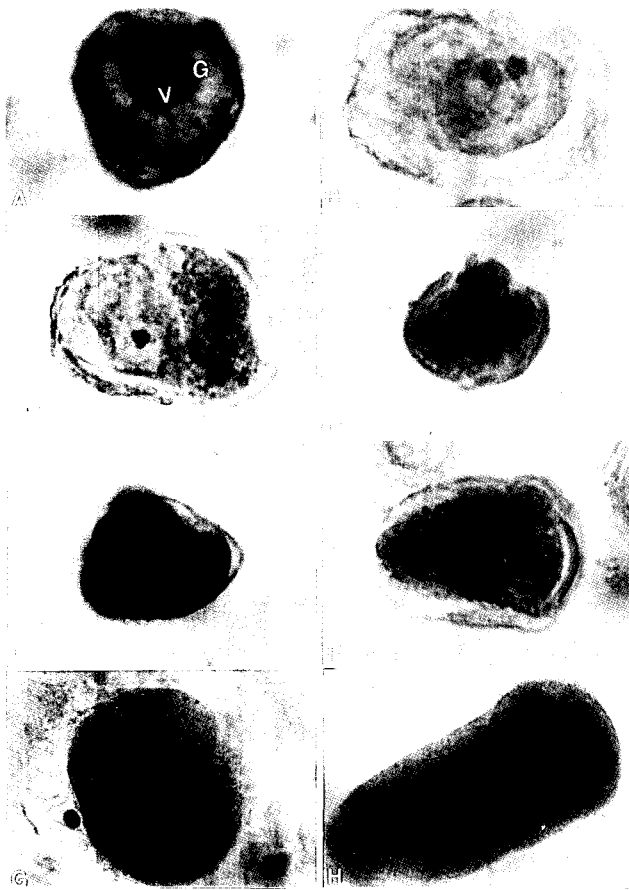


Figure 3. Callus and proembryo development in *Ranunculus japonicus* via division of vegetative nucleate from stage II anther (3 days before anthesis) after 30 to 60 days of culture. (A): Unequal division of vegetative (V) and generative (G) nuclei, (B): Equal size of vegetative nuclei, (C): Trinucleated immature pollen, (D): Multicelled pollen callus, (E-F): Trinucleated and multicelled pollens, (G-H): Globular or stick-like structure proembryos.

후의 성숙화분(Sunderland and Roberts, 1977)에 이르기까지 배양적기의 기간이 상당히 길다. 그러나 *Arabidopsis thaliana* (Gresshoff and Doy, 1972a), *Lycopersicon esculentum* (Gresshoff and Doy, 1972b), *Vitis vinifera* (Gresshoff and Doy, 1974)와 *Digitalis purpurea* (Corduan and Spix, 1975)의 경우와 같이 단지 감수분열기 때만 반응을 보이거나 *Hordeum vulgare* (Clapham, 1971), *Triticum aestivum* (Wang et al., 1973)의 경우는 1핵기 상태에서 가장 좋은 반응을 보인다고 하여 어느 특정 기간에서만 반응을 나타내는 경우가 많다.

본 실험에서 개화 5일전의 아주 어린 약에서는 배양 60일까지도 2분자기에서부터 4분자기 및 1핵기의 소포자를 관찰할 수 있었고 배양 90일경에는 4분자기에서 분리된 일부 소포자에서 pollen mitosis가 일어나 영양세포와 생식세포로 분열되는 미숙화분들을 관찰할 수 있었다(Fig. 2A-E). 한편, 개화 3일전의 약에서는 배양 30일경 일부 1핵성 미숙화분들

은 영양핵과 생식핵으로 불균등분열을 하거나(Fig. 3A), 동일한 크기의 핵으로 균등분열을 하였는데(Fig. 3B), 이들 분열된 화분들은 세포질의 합성도 왕성하게 진행되어 다른 미숙화분들에 비해 짙게 염색되고 크기도 큰 거대화분으로 발육되었다. 이와 같은 배발생적 화분들은 화분막 안에서 계속적으로 영양핵과 세포질이 분할되어 3핵 - 다핵화 되었는데(Fig. 3C), 핵분열때 세포질의 막을 형성하여 화분내에서 다세포성의 캘러스를 형성하고 배양 60일경에는 화분막이 터지면서 밖으로 나왔다(Fig. 3D). 또한, 배발생적 화분 가운데 극소수의 화분은 몇차례의 핵분열이 있는 후 세포질의 분할에 의해 세포질막은 형성되지 않고 계속적으로 세포질의 합성이 일어나 화분이 전체적으로 비대된 채 엷은 화분막 내에서 구형 또는 막대형의 화분유래의 배가 형성됨을 관찰하였다(Fig. 3E-H). 약배양에서 소포자는 직접 다핵화 내지 다세포화되어 배가 형성되거나 또는 캘러스가 형성된 후 캘러스를 통해 배가 형성되는 두가지 경우가 있는데 본 실험에서는 같은 약내에서도 두가지 경로를 거치고 있음을 관찰하였다.

배양 중 소포자가 배를 형성하는 과정에서 담배 (Sunderland and Wicks, 1971; Honer and Street, 1978), *Datura metel* (Iyer and Raiana, 1972), *Triticum aestivum* (Ouyang et al., 1973), *Triticale* (Wang et al., 1973) 등은 영양세포가, 그리고 아직까지 밝혀진 바에 의하면 *Hyoscyamus niger* (Raghavan, 1978)에서만 생식세포가 분열하여 배를 형성한다고 하였는데 본 재료에서도 다핵화되는 과정에서 영양세포가 계속적으로 분열하였던 것으로 전자의 경우와 같았다.

한편, 개화 1일전의 약배양에서는 전혀 반응이 없었는데 이것은 배양 전 거의 모든 화분이 성숙화분으로 되어 있었고 극소수의 지체화분들도 있었으나 이런 지체화분들 가운데 반응을 나타낼 수 있는 화분의 수는 극히 적었고, 개화 5일전의 어린 약도 배양 60일까지 2분자기 및 4분자기의 소포자들이 많이 존재하는 것으로 보아 오랜 배양기간이 소요될 것이므로 약배양에 적합한 시기라고 생각되지 않는다. 따라서 자연상태에서 이미 핵분열을 하고 있거나 또는 핵분열 직후의 초기 2핵성의 미숙화분들이 골고루 분포되어 있는 개화 3일전의 약이 배양에 적합한 시기라고 생각되며 이것은 약배양이 잘되는 담배에서와 같이 가장 적절한 약배양 시기가 1핵성 및 초기 2핵성의 미숙화분이었다는 보고 (Sunderland and Dunwell, 1977)와 일치하였다.

### 적 요

미나리아재비의 약을 배양하여 미숙화분 유래의 식물체를 획득하는데 있어서 생장조절제의 종류와 농도 및 배양적기를 구명하기 위해 화분의 발육단계별로 캘러스, 배발생 및 식물체 재분화에 미치는 영향을 조사하였다. 캘러스 및

배발생에는 2,4-D 및 kinetin 처리보다 NAA 및 BA 처리에서 효과적이었으며 특히 0.5 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA 처리구에서 가장 왕성하였다. 화분의 발육과정중 1핵성과 초기 2핵성의 pollen mitosis 전후기인 개화 3일전의 약의 발육상태가 캘러스, 배발생 및 식물체 재분화에 적합하였다. 화분 유래의 배발생은 영양세포의 계속적인 분열에 의해 이루어졌다.

## 인 용 문 헌

- Clapham D (1971) In vitro development of callus from the pollen of *Lolium* and *Hordeum*. Z Pflanzenzuchtg 65: 285-292
- Corduan G (1975) Regeneration of anther-derived plants of *Hyoscyamus niger* L. Planta 127: 27-36
- Corduan G, Spix C (1975) Haploid callus and regeneration of plants from anthers of *Digitalis purpurea* L. Planta 124: 1-11
- Dorin N, Chupeau Y, Bourgin JP (1975) Isolation, culture and regeneration into plants of *Ranunculus sceleratus* L. leaf protoplast. Plant Sci Lett 5: 325-331
- Gresshoff PM, Doy CH (1972a) Haploid *Arabidopsis thaliana* callus and plants from anther culture. Austr J Biol Sci 25: 259-264
- Gresshoff PM, Doy CH (1972b) Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). Planta 107: 161-170
- Gresshoff PM, Doy CH (1974) Derivation of a haploid cell line from *Vitis vinifera* and the importance of the stage of meiotic development of anthers for anther culture of this and other genera. Z Pflanzenphysiol 73: 132-141
- Horner M, Street HE (1978) Pollen dimorphism-origin and significance in pollen plant formation by anther culture. Ann Bot 42: 763-771
- Iyer RD, Raiana SK (1972) The early ontogeny of embryoids and callus from pollen and subsequent organogenesis in anther culture of *Datura metel* and rice. Planta 104: 146-156
- Kameya T, Hinata (1970) Induction of haploid plants from pollen grains of *Brassica*. Japan J Breeding 22: 82-87
- Konar RN, Nataraja K (1965a) Experimental studies in *Ranunculus sceleratus* L. development of embryos from the stem epidermis. Phytomorphology 15: 132-137
- Konar RN, Nataraja K (1965b) Experimental studies in *Ranunculus sceleratus* L. plantlets from freely suspended cells and cell groups. Phytomorphology 15: 206-211
- Konar RN, Nataraja K (1969) Morphogenesis of isolated floral buds of *Ranunculus sceleratus* L. in vitro. Acta Bot Neerl 18: 680-699
- Lee BK, Ko JA, Kim YS, Eun JS (1993) Embryogenesis and plant regeneration in anther cultures of *Platycodon grandiflorum*. Korean J Plant Tissue Culture 20: 153-157
- Lee BK, Ko JA, Park BM (1992) Plant regeneration by the anther culture of *Lilium elegance* 'ENCHANTMENT'. Bulletin of the Agri. Coll. Chonbuk Nat'l Univ 24: 9-18
- Lee BK, Ko JA, Kim YS, Eun JS (1993) Plant regeneration by the anther culture of *Ranunculus sceleratus* L. Korean J Plant Tissue Culture 20: 147-151
- Maheshwari SC, Rashid A, Tyagi AK (1982) Haploids from pollen grain. -Retrospect and prospect-. Amer J Bot 69: 865-879
- Nakata K, Tanaka M (1968) Differentiation of embryoids from developing germcells in anther culture of tobacco. Jap J Gen 43: 65-71
- Nitsch JP, Nitsch C (1969) Haploid plants from pollen grain. Science 163: 85-87
- Ouyang TW, Hu H, Chuang CC (1973) Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured in vitro. Scientia Sinica 16: 77-95
- Raghavan V (1978) Origin and development of pollen embryoids and pollen calluses in cultured anther segments of *Hyoscyamus niger* (henbane). Amer J Bot 65: 98-102
- Sarvesh A, Reddy TP, Kavi Kishor PB (1993) Embryogenesis and organogenesis in cultured anthers an oil yielding crop niger (*Guizotia abyssinica* Cass). Plant Cell Tissue Organ Culture 35: 75-80
- Sunderland N (1974) Anther culture as a means of haploid induction. In KJ Kasha, ed, Haploids in Higher Plants, Advances and Potential. Univ. of Guelph, pp 91-122
- Sunderland N, Dunwell JM (1977) Anther and pollen culture. In HE Street, ed, Plant Tissue and Cell Culture. Ed 2, Blackwell, Oxford, pp 223-265
- Sunderland N, Roberts M (1977) New approach to pollen culture. Nature 270: 236-238
- Sunderland N, Wicks FM (1971) Embryoid formation in pollen grains of *Nicotiana tabacum*. J Exp Bot 22: 213-226
- Wang CC, Chu CC, Sun CS, Wu SH (1973) The androgenesis in wheat (*Triticum aestivum*) anthers cultured in vitro. Scientia Sinica 2: 218-225

(1994년 8월 14일 접수)