

작약(*Paeonia lactiflora* Pall.)의 약배양에서 형성된 배의 형태가 유식물 발달에 미치는 영향

손재근* · 권용삼 · 김경민
경북대학교 농과대학 농학과

Effect of Embryo Morphology on Plant Development in Anther Cultures of *Paeonia lactiflora* Pall.

Jae Keun SOHN*, Yong Sham KWON, and Kyung Min KIM

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

The embryos formed from anther culture of peony exhibited divergent morphologies. The frequency of normal embryos with two cotyledons was about two times higher in the embryos formed through direct embryogenesis than those formed from callus. About 69% of the embryos with two cotyledons converted into normal plants, but conversion rate of the abnormal embryos with one and three or four cotyledons was only 4 to 9%. The embryos of horn and bowling pin shape did not undergo development into normal plants.

Key words: cotyledonary variation, herbaceous peony, pollen plant

기내 배양된 식물 세포나 조직으로부터 재분화되는 식물체의 획득 빈도를 향상시키기 위해서는 일정한 발육단계를 갖는 정상적인 배의 획득 빈도를 높이는 것이 무엇보다 중요한 것으로 지적되고 있다. 그러나 대부분의 식물 조직배양에서는 자엽이 2개인 정상적인 배 이외에 자엽의 수가 하나 또는 3개 이상인 것이 형성되거나 나팔 모양과 보울링핀 형태의 비정상적인 배가 높은 빈도로 출현하고 있는 것으로 알려져 있다(Ammirato, 1987; Lee and Soh, 1993; Merkle et al., 1987). 이러한 배의 형성에는 배지내에 첨가되는 sucrose의 농도(Steward et al., 1975), 성장조절제의 종류와 농도(Lazzeri et al., 1987a; Levi and Sink, 1991), 배양 환경(Ammirato, 1983) 등이 관여하는 것으로 알려져 있다. 이들 비정상적인 배는 정상 배에 비해 식물체의 획득 효율을 저하시키는 주된 요인중의 하나로 지적되고 있어(Wetzstein and Baker, 1993), 배양조건과 배의 형태 및 배의 형태별 식물체 발육 양상 등에 관한 연구는 배양 효율 향상에 크게 기여하리라고 생각된다.

우리나라에서 중요한 약용식물의 하나인 작약의 약배양에서 약의 배양 적기, 배지 내의 성장조절제의 조성 등을 개선하여 화분소포자 유래의 배형성과 식물체 재분화에 성공하고 있고 약배양에서 재분화된 식물체의 배수성에 대한

연구 결과도 보고된 바 있으나(Sohn and Kim, 1993; Sohn et al., 1994), 아직도 약에서 재분화되는 반수체의 획득 빈도는 실용적인 수준에 크게 미달되어 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 작약의 약배양에서 화분소포자로부터 재분화되는 식물체의 획득효율을 향상시키기 위하여 배양조건에 따른 배의 형태별 분포도와 여러 가지 형태의 배가 식물체로 발육되는 양상 등에 대한 실험을 수행하여 얻어진 결과를 보고한다.

재료 및 방법

본 실험에는 경상북도 농촌진흥원에서 수집 보존해 오고 있는 국내 재배 품종인 “의성작약(*Paeonia lactiflora* Pall.)”의 약을 배양 재료로 공시하였다. 1993년 5월에 공시 품종의 화분 발달단계를 현미경으로 검정한 다음 약의 저온처리 및 약배양 방법은 Sohn과 Kim (1993)의 방법에 준하여 실시하였고, 약배양과 배형성은 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지되는 항온실에서 암상태로, 식물체 분화는 16시간 명상태(2,500 lx)로 배양하였다. 저온 처리된 약을 성장조절제가 첨가되지 않는 MS (Murashige and Skoog, 1962)배지와 1 mg/L의 2,4-D가

단용된 배지 및 2,4-D (0.1, 0.5, 1.0 mg/L)와 3 g/L의 활성탄이 혼용된 배지에 배양하여 캘러스로부터 형성된 배와 약에서 직접 발생한 배와의 형태적 특징을 비교하고 이들 배의 형태별로 유식물 분화 양상을 조사하였다. 배의 형태별 유식물 분화는 여러 형태의 배를 0.3 mg/L의 GA₃가 첨가된 MS 배지가 40 ml씩 분주된 배양병(5×11 cm)에 3개씩 20일 동안 배양하여 발아율을 조사한 후 발아된 배는 4°C에 8주 동안 저온처리한 다음 26 ± 1°C, 1일 16시간 명상태(2,500 lx)로 유지되는 항온실에 배양하여 배양 20일 후에 배의 형태별로 유식물의 분화정도를 비교하였다.

결과 및 고찰

작약의 약배양에서 2,4-D의 첨가여부에 따라 배의 형성과정 및 배의 형태별 분포가 다르게 나타났는데, 2,4-D가 첨가되지 않거나 2,4-D와 활성탄이 혼용된 배지에서 배양된 약은 캘러스 형성과정을 거치지 않고 직접 배가 형성되었고, 배의 형태별 분포에서도 2개의 자엽을 갖는 정상적인 배(Figure 1A)의 출현 빈도가 80% 이상으로 높게 나타났다. 그러나 1 mg/L의 2,4-D가 단용된 배지에서는 직접 배형성과정이 일어나지 않고 캘러스가 형성되었으며, 이들 캘러스를 생장조절제가 첨가되지 않거나 zeatin (0.2 mg/L)이 첨가된 배지로 이식하였을 때 배가 형성되었는데, 이 경우에는 2개의 자엽을 갖는 정상배의 출현 빈도가 38.1%로 낮아진 반면, 자엽이 3개(Figure 1B-b) 또는 4개이거나 그 형태가 보올링핀(Figure 1C) 또는 나팔모양(Figure 1D)인 비정상적인 배의 출현빈도가 상대적으로 높게 나타났다(Table 1).

배의 형태별 유식물 발육 양상 비교에서도(Table 2), 자엽의 수가 2개인 정상 배는 기내에서의 발아율이 81%로 가장 높았을 뿐만 아니라 저온처리후 상배축이 신장되어 정상적으로 발육되는 개체(Figure 1F)의 비율도 68.6%로 가장 높게 나타났다. 그리고 자엽의 수가 1개인 배(Figure 1B-a)

Table 1. Morphological variation of embryos formed through direct embryogenesis and from callus in anther culture of *P. lactiflora*.

2,4-D (mg/L)	Activated charcoal (g/L)	No. of cultured anthers	No. of anthers forming embryo(%)	No. of total embryos	Percent of cotyledonary variation ^b					
					one	two	three	four	bowling pin & horn shape	
0	0	780	134(17.2)	283	13.3	80.0	5.7	-	1.1	
0.1	3	400	154(38.5)	181	7.5	80.6	8.1	-	3.8	
0.5	3	380	165(43.4)	187	6.4	84.5	8.6	-	7.5	
1.0	3	360	118(32.8)	148	4.1	82.4	5.4	0.5	8.1	
1.0	0	360	109(19.5) ^a	205	5.8	38.1	26.3	10.7	19.0	

^a Embryos formed from callus.

^b "One", "two", "three", "four", "bowling pin" and "horn shape" indicate cotyledon number and shape of pollen-derived embryos.

Table 2. Frequency of plant development from pollen-derived embryo with cotyledonary variation in anther cultures of *P. lactiflora*.

Cotyledonary variation	No. of embryos cultured ^a	No. of embryos germinated(%) ^b	No. of normal plant(%) ^c
One	80	29(36.3)	7(8.8)
Two	970	786(81.0)	35(3.6)
Three	87	24(27.6)	6(6.9)
Four	106	31(29.2)	4(3.8)
Bowling pin and horn shape	100	40(40.0)	0(0.0)

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

^b Germinated embryos were treated for 8 weeks at 4°C, dark condition.

^c MS + 30 g/L sucrose + 2 g/L gelrite.

도 GA₃가 첨가된 배지에서 자엽이 전개되고 저온처리후에 일정 기간 동안은 엽병과 뿌리가 신장되었지만(Figure 1E) 그 이후 본엽이 전개되어 정상적인 발육을 보이는 개체의 비율은 8.8%로 낮아졌으며, 자엽의 수가 3~4개인 배의 경우도 정상적인 유묘로 발육되는 개체의 비율은 3.8~6.9%로 낮아졌고 특히 보올링핀 모양의 배와 나팔 모양의 배는 정상적인 유식물로 발육되는 개체가 전혀 없었다.

기내 배양된 식물조직으로부터 형성되는 체세포배의 형태에는 2,4-D가 크게 관여하는 것으로 알려지고 있는데, 콩의 미숙배 배양에서 NAA보다는 2,4-D 첨가 배지에서(Lazzeri et al., 1987a), 2,4-D가 저농도에서 보다는 고농도에서 비정상적인 배의 비율이 높았다고 하며(Choi et al., 1994), 이러한 비정상적인 배는 정상적인 배에 비하여 식물체의 획득 효율을 저하시키는 것으로 콩(Lazzeri et al., 1987b), *Feijoa swellowiana* (Cruz et al., 1990), 땅콩(Baker and Wetzstein, 1992; Wetzstein and Baker, 1993) 등의 조직 배양에서 알려져 있다.

본 연구에서는 약으로부터 직접 형성된 배는 2개의 자엽을 갖는 정상적인 배가 전체의 80% 이상으로 높게 나타난 반면, 캘러스로부터 형성된 배는 전체의 60% 이상이 자엽이 1, 3, 4개이거나 배의 모양이 보올링핀 또는 나팔 모양인 비정상적인 배가 출현되는 것으로 보아, 기내 배의 형태에는 2,4-D보다는 배의 형성과정이 더욱 크게 관여하는 것으로 추정되었다. 그리고 유식물 발육양상면에서도 자엽이 2개인 배는 대부분 정상 식물체로 발육되는 반면에 자엽이 1, 3 및 4개인 비정상적인 배가 정상 식물체로 발달하는 효율은 4~9%에 불과하고 대부분 고사하였으며, 특히, 보올링핀 또는 나팔 모양의 배는 전혀 정상적인 식물체로 발달하지 못하였는데, 이러한 연구 결과는 기내 배의 형태가 유식물의 발육에 결정적인 영향을 미친다는 것을 입증해 주는 좋은 자료가 될 것으로 생각된다.

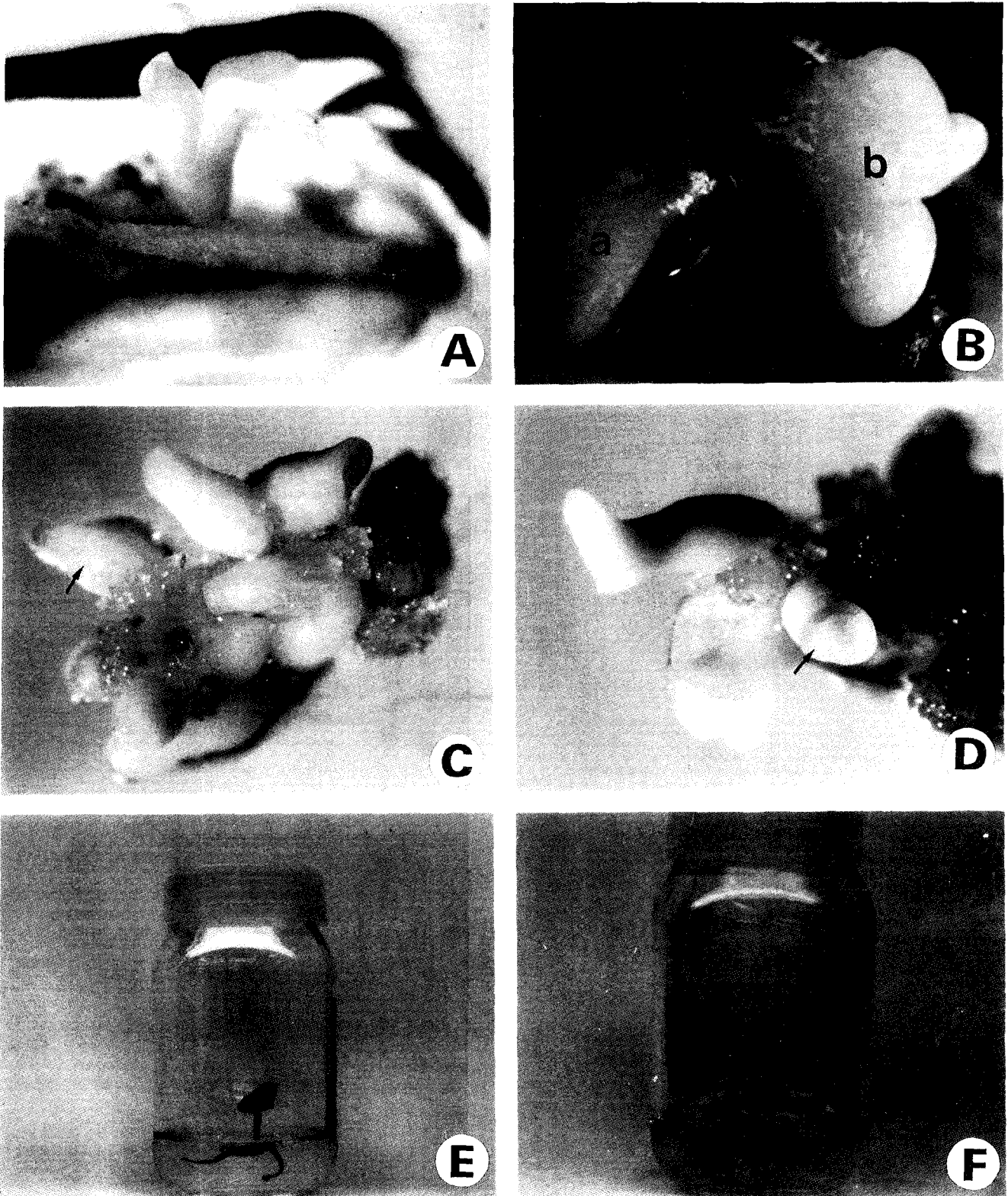


Figure 1. Morphological variation and plant development of pollen-derived embryo in anther cultures of *P. lactiflora*.
A: Normal embryo with two cotyledons formed from anther, B: One (a) and three (b) cotyledonary embryos, C: Bowling-pin shape embryo(↑) formed from anther-derived callus, D: Horn shape embryo(↑) formed from callus, E: Abnormal plant developed from one cotyledonary embryo, F: Normal plant developed from two cotyledonary embryos.

적 요

작약의 약배양에서 재분화되는 식물체의 획득 빈도를 향상시키기 위하여 화분소포자에서 유래된 배의 형태 및 형태별 유식물 분화양상에 관한 실험을 수행한 바, 성장조절제가 첨가되지 않거나, 2,4-D와 활성탄이 혼용된 배지에서 약으로부터 직접 형성된 배는 80% 이상이 2개의 자엽을 갖는 정상배이었으나, 캘러스로부터 형성된 배의 경우는 자엽이 1개, 3개 또는 4개이거나 불링핀 및 나팔 모양의 비정상적인 배의 출현율이 60% 이상 높게 나타났다. 2개의 자엽을 갖는 정상 배의 경우는 발아율이 81%로 높았고 정상 식물체로 발육되는 비율도 68.6%로 높게 나타났다. 그러나 자엽이 1개 또는 3~4개인 배는 정상적으로 발육되는 식물체의 비율이 10% 이하로 매우 낮았으며, 특히 불링핀 및 나팔 모양의 배는 전혀 식물체로 발달하지 못하였다.

사 사 - 이 논문은 1994년도 농촌진흥청 특정 개발 연구비에 의하여 연구된 것임.

인 용 문 헌

- Ammirato PV** (1983) Embryogenesis. In DA Evans, WS Sharp, PV Ammirato, Y. Yamada eds, Handbook of Plant Cell Culture Vol 1, Macmillan Pub, New York, pp 82-123
- Ammirato PV** (1987) Organizational events during somatic embryogenesis. In CE Greens et al., eds, Plant Tissue and Cell Culture, Alan R, Liss Inc, New York, pp 57-81
- Baker CM, Wetzstein HY** (1992) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaflets of peanut, *Arachis hypogaea*. Plant Cell Reports 11: 71-75
- Choi PS, Soh WY, Cho DY, Liu JR** (1994) Somatic embryogenesis in immature zygotic embryo cultures of Korean soybean (*Glycine max* L.) cultivars and effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on somatic embryo morphology. Korean J Plant Tissue Culture 21: 7-13
- Cruz GS, Canhoto JM, Abreu MAV** (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. Plant Science 66: 263-270
- Lazzeri PA, Hilderbrand DF, Collins GB** (1987a) Soybean somatic embryogenesis : Effect of hormones and culture manipulations. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 10: 197-208
- Lazzeri PA, Hilderbrand DF, Collins GB** (1987b) Soybean somatic embryogenesis : Effect of nutritional, physical and chemical factors. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 10: 209-220
- Lee KS, Soh WY** (1993) Somatic embryogenesis and structural aberrancy of embryos in tissue cultures of *Aralia cordata* Thunb. Korean J Plant Tissue Culture 20: 77-83
- Levi A, Sink KC** (1991) Somatic embryogenesis in asparagus: The role of explants and growth regulators. Plant Cell Reports 10: 71-75
- Merkle SA, Wetzstein HY, Sommer HE** (1987) Somatic embryogenesis in tissue cultures of peacan. HortScience 22: 128-130
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15: 71-78
- Sohn JK, Kim KS, Kim KM** (1994) Development of pollen-derived embryos and ploidy level of their regenerated plants in *Paeonia lactiflora* Pall. Korean J Plant Tissue Culture 21: 215-219
- 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
- Steward FC, Israel HW, Mott RL, Wilson HJ, Krikorian AD** (1975) Observations on growth and morphogenesis in cultured cells of carrot (*Daucus carota* L.). Philos Trans R Soc London Ser B 273: 33-53
- Wetzstein HY, Baker CM** (1993) The relationship between somatic embryo morphology and conversion in peanut (*Arachis hypogaea* L.). Plant Science 92: 81-89

(1995년 6월 2일 접수)