

芍藥(*Paeonia lactiflora* Pall.)의 子葉組織으로부터 體細胞胚發生을 통한 식물체 獲得

신종희* · 손재근¹ · 김경민¹ · 박소득 · 김규원²
경북농촌진흥원 의성작약시험장 · ¹경북대학교 농학과 · ²영남대학교 원예학과

Plant Regeneration through Somatic Embryogenesis from Cotyledon of Herbaceous Peony (*Paeonia lactiflora* Pall.)

SHIN, Jong Hee* · SOHN, Jae Keun¹ · KIM, Kyung Min¹ · PARK, So Deug · KIM, Kiu Weon²

Euseong Peony Experiment Station, Kyungpook Provincial Rural Development Administration, Kyungpook, 769-800, Korea:

¹Department of Agronomy, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea: and

²Department of Horticulture, Yeungnam University, Kyongsan, 712-749, Korea. *Corresponding author.

The experiments were carried out to determine the optimum conditions for the direct embryogenesis from the cotyledon derived zygotic embryo culture of *Paeonia lactiflora* Pall. Different peony tissues derived from zygotic embryos were cultured on MS medium with and without 2,4-D. Somatic embryos were formed from the cotyledons cultured on the medium without 2,4-D. The somatic embryogenesis from cotyledons was promoted in the growth regulator-free MS medium containing 1.65~3.3 g/L NH_4NO_3 and 30~40 g/L sucrose. The maximum frequency (80.0%) of somatic embryo formation was obtained from the cotyledons excised from zygotic embryos that cultured on MS medium containing 3.3 g/L NH_4NO_3 . Epicotyl and roots were elongated from a somatic embryo by adding 0.3 mg/L GA_3 in the medium or the cold-treatment at 4° C more than three weeks at 4° C.

Key words: somatic embryo germination, epicotyl dormancy

芍藥의 번식은 주로 노두를 이용한 영양번식에 의존하고 있는데 이러한 영양 번식법은 특정한 병에 감염된 모주를 사용하게 되면 일시에 많은 피해를 받을 우려가 있고 번식력 또한 높지 못하다. 또한 종자번식의 경우도 종자 성숙에 장 기간이 소요되고 성숙된 종자라 하더라도 그대로 파종하게 되면 발아기간이 길 뿐만 아니라 발아율도 낮고 균일도 확보가 어렵다는 단점이 있다. 따라서 교배 종자로부터 얻어진 유묘의 형질이 우수하다고 하더라도 일정량의 묘를 확보하는데 오랜 시간이 소요된다. 그러므로 교배 육종을 통한芍藥의 신품종 육성이나 實生苗의 대량 번식을 위해서는 가급적 조기에 實生苗를 얻을 수 있는 방법의 개발이 필요하다.

한편 체세포배 발생에 관한 연구는 식물의 발생학, 유전 자원의 보존, 형질 전환 및 인공종자의 생산 등 다양한 분야에서 활용되고 있다. 뿐만 아니라 번식 속도가 느린 영양

번식 작물의 대량증식에서도 중요한 비중을 차지하고 있다 (Kim and De Hertogh, 1997; Kim and Kang, 1992; Termignoni et al., 1996; Zheng et al., 1996).芍藥의 경우 胚 유도에 관한 연구는 薊이나 花粉배양에서 반수체의 획득을 통한 육종연환의 단축을 목적으로 이루어 졌으며(Ham and Choi, 1976; Kim and Sohn, 1996; Kwon and Sohn, 1995; Lee, 1982; Sohn and Kim, 1993), 器內 增殖에 있어서는 Hosoki 등(1989)이芍藥의 정단조직배양에서 GA_3 와 BAP를 혼용한 배지에서 이론적으로 1년에 한 개체당 300~700배의 증식을 기대할 수 있다고 보고하고 있고, 국내에서는 Chung 등(1995)이芍藥 冬芽의 정아 및 액아 배양을 통한 器內 增殖에 관한 결과를 보고하였다. Jin-Jin 등(1987)은 종자의 胚에서 유기된 캘러스에서 체세포배를 획득하였으나 정상적인 식물체 획득은 성공하지 못하였다. 따라서 작약의 조직배양에 의한 급속증식 방법은 확립되어 있지 않은 실정이다.

따라서 본 연구에서는 芍藥의 기내 증식효율을 향상시키고자 芍藥의 완숙 종자의 배를 기내배양하여 얻어진 유묘를 배양재료로 이용하여 조직부위별 배발생정도, 배지내의 질소원과 탄소원이 체세포배형성에 미치는 영향 등에 관한 몇 가지 실험을 수행하여 얻어진 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

본 실험은 1995~1996년까지 2년간 경북농촌진흥원 의성작약시험장 포장에 재배되고 있는 芍藥 수집종들의 종자를 이용하여 수행하였다.

芍藥 완숙 종자로부터 분리해 낸 배를 30 g/L의 sucrose, 2 g/L의 gelrite가 첨가된 MS(Murashige and Skoog, 1962)배지에 치상하여 26 ± 1°C, 24시간 광조건(2,500 Lux)에서 30일간 배양하였다. 기내배양에서 얻은 유묘의 자엽, 하배축 및 뿌리 조직을 2,4-D농도를 달리한 상기 MS 배지에 치상하여 암배양(26 ± 1°C)하였다. 치상 30일 후에 조직부위 및 2,4-D농도 별 캘러스 형성 정도를 조사하였다. 배양조직 및 캘러스로부터 배발생을 위해서는 생장조절제를 첨가하지 않은 MS 기본배지에서 90일간 암배양하였다.

접합자배배양과 자엽배양에 적합한 배지 조건을 구명하고자 상기 MS기본배지의 NH₄NO₃농도를 1.65, 3.3, 6.6 g/L로 달리하여 접합자배를 배양한 후 무균배양으로 얻어진 자엽조직을 NH₄NO₃가 0.825, 1.65, 3.3 g/L 첨가된 MS기본배지에서 배양 하거나 기본 배지내 sucrose, fructose, glucose와 같은 탄소원의 농도(10~50 g/L)를 달리하여 90일간 암배양 후 각 처리별로 배발생 정도를 조사하였다.

자엽배양시 계대배양 횟수가 체세포배 발생에 미치는 영향을 알아보기 위하여 접합자배배양에서 얻어진 자엽조직을 생장조절제가 첨가되지 않은 MS기본배지에 치상하여 90일간 계대배양하지 않거나 10일(9회), 15일(6회) 및 30일(3회) 간격으로 새로운 배지로 이식하여 90일간 배양한 후 각 처리별 체세포배 발생률을 조사하였다.

자엽에서 얻어진 체세포배의 생육 정도를 알아보기 위해 GA₃농도를 0 또는 0.3 mg/L로 달리한 MS기본배지에서 30일간 배양 후 체세포배로부터 상배축신장 정도를 조사하였으며, 저온처리가 상배축의 휴면타파에 미치는 영향을 알아보기 위하여 자엽으로부터 얻어진 체세포배를 식물생장 조절제가 첨가되지 않은 배지에서 10일 간 배양 후 4°C, 암상태에서 0~5주간 저장하면서 1주일 간격으로 sucrose 30 g/L와 gelrite 2 g/L가 첨가된 1/2MS배지(Choi and Meyer, 1994)에 30일간 광조건에서 배양한 후 각 처리별로 상배축 신장정도를 조사하였다.

결과 및 고찰

Table 1. Effect of 2,4-D in MS medium on callus and somatic embryo formation in culture of different tissues of herbaceous peony.

Cultured tissues	2,4-D (mg/L)	No. of tissues cultured	Callus formation (%)	Embryo formation (%)
Cotyledon	0.0	184	5	27.2
	0.5	101	99	0
	1.0	100	98	0
	3.0	90	95	0
	5.0	100	100	0
Hypocotyl	0.0	46	0	1.0
	0.5	90	100	0
	1.0	100	99	0
	3.0	100	100	0
	5.0	100	100	0
Root	0.0	60	0	0
	0.5	100	99	0
	1.0	100	100	0
	3.0	100	100	0
	5.0	100	100	0

Table 2. Effect of NH₄NO₃ concentration in MS medium on direct somatic embryogenesis from cotyledons of herbaceous peony.

Zygotic embryos culture medium	NH ₄ NO ₃ (g/L) in		No. of cotyledons cultured	Percent of cotyledons forming embryos
	Cotyledons culture medium	Cotyledons culture medium		
1.65	0.825	0.825	107	25.3
	1.650	1.650	184	27.2
	3.300	3.300	40	10.0
3.30	0.825	0.825	60	66.6
	1.650	1.650	60	80.0
	3.300	3.300	40	60.0
6.60	0.825	0.825	66	24.2
	1.650	1.650	40	67.5
	3.300	3.300	40	77.5

완숙 종자의 배를 무균배양하여 얻어진 자엽, 하배축 및 뿌리 절편(Figure 1A)을 2,4-D의 농도가 다른 배지에서 배양한 결과(Table 1), 조직에 관계없이 2,4-D가 첨가된 상태에서 높은 캘러스 형성률을 나타내었지만 체세포배는 발생되지 않았다. 그러나 2,4-D를 첨가하지 않은 배지에서 배양된 자엽의 경우에는 27.2%의 체세포배 발생률을 보였다. 이와 같이 작약의 각종 조직으로부터 얻어진 캘러스에서 배가 발생되지 않았다는 결과는 芍藥의 접합자배배양시 캘러스를 통해서 체세포배 획득이 거의 불가능하고 체세포배가 획득되었다 하더라도 정상적인 식물체로 발육되기 어렵다고 한 Jin-Jin 등(1987)의 연구 결과와 유사했다.

배지내 NH₄NO₃의 농도가 체세포배 발생에 미치는 영향을 조사한 결과(Table 2), 접합자배를 MS기본배지의 2~4배

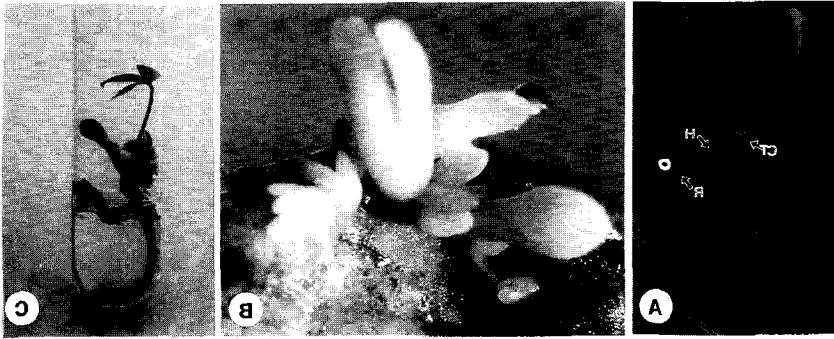


Figure 1. Direct somatic embryogenesis from cotyledons of herbaceous peony. A, Seedlings developed from zygotic embryos (CT : Cotyledon, H : Hypocotyl, R : Root). B, Somatic embryos formed from a cotyledon. C, Developed plant from somatic embryo.

Table 3. Effect of carbon sources and its concentrations in MS medium on direct somatic embryogenesis from cotyledons of herbaceous peony.

Carbon source	Concentration (g/L)	No. of cotyledons cultured	Cotyledons forming embryos (%)
Sucrose	10	80	7.5
	20	173	19.1
	30	184	27.2
	40	140	31.4
	50	30	13.3
Fructose	20	100	12.0
	30	110	18.2
	40	214	29.9
	50	129	2.3
Glucose	30	98	19.4
	40	98	15.3
	50	96	19.8

인 3.3~6.6 g/L의 NH₄NO₃가 첨가된 MS기본배지에서 30일간 배배양한 후, MS기본 배지의 NH₄NO₃농도인 1.65 g/L나 2배인 3.3 g/L가 첨가된 배지에서 자엽을 배양 할 경우 접합자배배양과 자엽배양 전과정에 걸쳐 기본 배지와 동일한 농도인 1.65 g/L 첨가된 MS기본배지에 배양한 경우에 비해 60% 이상의 높은 배발생률을 나타내었으며, 체세포배형성에 가장 효과적인 접합자배 및 자엽배양 배지의 NH₄NO₃의 농도는 각각 3.3 g/L, 1.65 g/L이며 80.0%의 높은 배발생률을 나타내었다.

접합자배배양에서 얻은 자엽을 다양한 농도의 sucrose, fructose 및 glucose가 첨가된 배지에서 배양한 결과(Table 3), 30~40 g/L의 sucrose, 40 g/L의 fructose가 첨가된 배지에서 27~31%의 높은 체세포배 발생률을 보였다. Sucrose나 fructose가 50 g/L 첨가되거나 glucose가 첨가된 배지에서는 체세포배 발생률이 낮았다. 이는 Kwon과 Sohn(1995)이芍藥의 藥배양에서 40 g/L의 sucrose가 첨가된 배지에서 배발생률이 가장 높았다고 한 결과와 같았다.

자엽의 계대배양 기간 및 횟수가 체세포배형성에 미치는 영향을 조사한 결과(Table 4), 90일 동안 계대배양하지 않은

Table 4. Effects of transplanting on direct somatic embryogenesis from cotyledons of herbaceous peony cultured for 90 days.

Transplanting time	No. of cotyledons cultured	Cotyledons forming embryos (%)
0	184	27.2
3	106	39.6
6	87	41.4
9	53	30.2

* Investigation was carried out at 90 days after first inoculation date. MS + 30 g/L sucrose + 2 g/L gelrite.

Table 5. Effects of GA₃ in MS medium on germination of somatic embryos derived from cotyledons of herbaceous peony.

GA ₃ (mg/L)	No. of somatic embryos cultured	Embryos developed roots (%)	Embryos developed epicotyls (%)
0	48	61.5	4.2
0.3	41	85.7	39.0

경우는 배형성률이 27.2%인 반면, 같은 기간 동안 15~30일간격으로 3~6회 새로운 배지에 이식한 것은 39.6~41.4%로 배 발생률이 향상되었다.

자엽배양으로부터 유도된 체세포배(Figure 1B)의 발아에 미치는 GA₃가 영향을 조사한 결과(Table 5), GA₃ 0.3 mg/L 첨가된 배지에서 뿌리와 상배축이 동시에 형성된 개체(Figure 1C)의 비율이 39%로 높게 나타났다. 이는 Sohn 등(1994)이芍藥 藥배양에서 형성된 배에서, Shin 등(1996)이芍藥의 접합자배 배양에서 GA₃가 0.3 mg/L첨가된 배지에서 높은 발아율을 보였다는 결과와 같은 경향을 보였으며 Binzel 등(1996)과 Das 등(1995)이 각각 고추와 *Hardwickia binata*로부터 유도한 체세포배를 발아시키기 위해서는 GA₃가 효과적이라고 한 것보다 비슷한 경향이었다.

자엽으로부터 유래된 체세포배의 상배축 신장에 미치는 저온처리의 영향을 조사한 결과(Table 6), 4°C에서 5주간 처리하는 것이 87.7%로 가장 높은 상배축 신장률을 보였다. 이는 Sohn 등(1994)과 Shin 등(1996)이 각각芍藥의 藥배양

Table 6. Effects of cold treatment on germination of somatic embryos derived from cotyledons of herbaceous peony.

Duration of 4°C treatment (Week)	No. of somatic embryos cultured	Embryos developed roots (%)	Embryos developed epicotyls (%)
0	77	93.5	10.4
1	76	93.4	35.5
2	71	97.2	40.4
3	73	97.3	53.0
4	54	96.3	57.5
5	57	98.2	87.7

에서 얻어진 배와芍藥의 미숙종자에서 분리해 낸 접합자배의 발아에 저온처리가 효과적이라고 한 결과와 일치하는 경향이었다.

적 요

芍藥의 체세포 조직배양에 의한 기내증식방법을 확립하기 위하여 완숙종자의 접합자배를 배양하여 얻어진 유묘의 자엽으로부터 체세포 배발생에 영향을 미치는 몇 가지 요인에 대해 실험한 결과는 다음과 같다.

배양부위에 관계없이 2,4-D가 첨가된 배지에서는 높은 캘러스 형성률을 나타내었지만 체세포배는 발생되지 않았다. 그러나 2,4-D를 첨가하지 않은 배지에 자엽을 배양했을 때는 경우는 27.2%의 체세포배발생률을 나타내었다.

NH₄NO₃가 3.3 g/L 첨가된 배지에서 접합자배배양으로 얻은 자엽을 NH₄NO₃ 1.65 g/L 첨가된 배지에서 배양한 경우 체세포배발생률이 80.0%로 가장 높았다. 탄소원의 경우, 30~40 g/L의 sucrose나 40 g/L의 fructose가 첨가된 배지에서 체세포배발생률이 높았다. 자엽은 15~30일 간격으로 3~9회 새배지로 이식한 것이 39.6~41.4%의 높은 체세포배발생률을 나타내었으며, 자엽에서 얻어진 체세포배는 0.3 mg/L의 GA₃가 첨가된 배지에서 배양할 경우 39%의 상배축신장율을 나타내었다. 체세포배에서 발아한 유묘의 상배축휴면 타파를 위해서는 4°C에서 3주 이상 처리하는 것이 효과적이었다.

인 용 문 헌

Ammirato PV (1989) Recent progress in somatic embryogenesis. Newsletter, International Association for Plant Tissue Culture 57: 2-16
 Baker CM, Durham RE, Burns JA, Parrott WA, Wetzstein HY (1995) High frequency somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using mature, dry seed. Plant Cell Reports 15: 38-42
 Binzel ML, Sankhla N, Joshi S, Sankhla D (1996) Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum*

annuum L.). Plant Cell Reports 15: 536-540
 Choi SJ, Meyer JrMM (1994) Effect of Medium Components on Discoloration and Necrosis of Cultures in Peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) Micro Propagation. Korean J Plant Tissue Culture 21: 173-176
 Chung JD, Harn JS, Jee SO (1995) In Vitro Propagation of *Paeonia lactiflora* Pall. Through Shoot-Tip Culture of Winter Buds. Korean J Plant Tissue Culture 22: 101-104
 Das AB, Rout GR, Das P (1995) In vitro somatic embryogenesis from callus culture of the timber yielding tree *Hardwickia binata* Roxb. Plant Cell Reports 15: 147-149
 Ham C, Choi KT (1976) Studies on the Anther Culture of Cultivated *Paeonia albiflora*. Korean J Plant Tissue Culture 4: 9-13
 Hosoki T, Ando M, Kubara T, Hamada M, Itami M (1989) In vitro propagation of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by a longitudinal shoot-split method. Plant Cell Reports 8: 243-246
 Jin-Jin, Tomas JA, Meyer JrMM (1987) Amer Peony Soci.Bull 263: 24-30
 Kim KW, De Hertogh AA (1997) Tissue Culture of Ornamental Flowering Bulbs (Geophytes). Horticultural Reviews 18: 87-169
 Kim KW, Kang MS (1992) Somatic embryogenesis and plant regeneration from gladiolus callus in vitro. J Kor Soc Hort Sci 33: 87-94
 Kim NY, Sohn JK (1996) Plant Regeneration from Microspore Culture of *Paeonia lactiflora* Pall. Korean J Breed 28: 415-419
 Kwon YS, Sohn JK (1995) Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Embryo Formation in Anther Cultures of *Paeonia lactiflora* Pall. Korean J Plant Tissue Culture 23: 147-150
 Kamada H, Harada H (1979) Studies on the organogenesis in carrot tissue culture. I Effect of amino acids and inorganic nitrogenous compounds on somatic embryogenesis. Z Pflanzen Physiol 91: 453-463
 Lee MS (1982) Effect of Low Temperature Treatment to Floral Bud on the Anther Culture of *Paeonia*. Korean J Plant Tissue Culture 9: 1-6
 Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15: 473-497
 Shin JH, Sohn JK, Kim JC, Park SD (1996) Effect of GA₃ on Seed Germination of Peony(*Paeonia lactiflora* Pall.). Korean J Plant Tissue Culture 23: 231-234
 Sohn JK, Kim KS, Kim KM (1994) Development 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
 Temignoni RR, Wang PJ, Hu CY (1996) Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. Plant Cell Tissue Organ Culture 45: 129-132
 Zheng Q, Dessai AP, Prakash CS (1996) Rapid and repetitive plant regeneration in sweetpotato via somatic embryogenesis. Plant Cell Reports 15: 381-385