

## 고추 약배양을 통한 고빈도 배발생 및 식물체 재분화

안민영 · 김용권<sup>1</sup> · 민성란 · 정원중 · 인동수 · 유장렬\*  
생명공학연구소 식물세포 및 분자생물학 Research Unit, 농협종묘개발센터

### High Frequency Embryogenesis and Plant Regeneration in Anther Cultures of Pepper

AHN, Min Young · KIM, Yong Kweon<sup>1</sup> · MIN, Sung Ran ·  
JEONG, Won Joong · IN, Dong Soo · LIU, Jang Ryol\*

Plant Cell and Molecular Biology Research Unit, Korea Research Institute of  
Bioscience and Biotechnology (KRIBB), P.O. Box 115, Yusong, Taejeon, 305-606, Korea:  
and <sup>1</sup>Seed Research and Development Center, N.A.C.F., Anseoung, 456-820, Korea. \*Corresponding author.

Culture conditions for high frequency embryogenesis and plant regeneration in anther cultures of various F<sub>1</sub> hybrid and homozygous lines of pepper (*Capsicum annuum* L.) are described. Anthers pigmented less than halfway from the distal end were dissected from the flower bud in which petals elongated 2 mm higher than the receptacle. They were placed on Dumas medium supplemented with 0.1 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L kinetin. After four weeks of culture, embryos began to appear on anthers. After eight weeks of culture, frequencies of embryo formation reached up to 58.3%. Upon transfer to MS basal medium, greater than 95% of embryos developed into plantlets.

**Key words:** anther culture, Dumas medium, pepper, plant regeneration, somatic embryogenesis

고추는 국내에서 가장 중요한 채소작물중의 하나이다. 고추의 조직배양에 의한 식물체 재분화는 자엽, 하배축, 혹은 원형질체로부터 기관발생을 통하여 이루어진 바 있다 (Gunay and Rao, 1970; Phillips and Hubstenberger, 1985; Agrawal et al., 1989; Diaz et al., 1989; Ochoa-Alejo and Moreno, 1990; Lee et al., 1993). 최근에는 식물체 재분화가 미국(Harini and Lakshmi Sita, 1993)과 국내 품종(Jeong et al., 1994; Jo et al., 1996)의 미성숙 접합자배로부터 직접 체세포배발생 경로로도 가능하게 되었으며, 현탁배양 세포로부터 체세포 배발생을 통한 재분화에도 성공하였다(Jeong et al., 1996).

한편 약배양은 품종개량을 위한 세대단축에 활용되고 있다. 고추 약배양의 경우 식물생장조절물질의 조합, 약의 소포자 발달단계에 따른 캘러스와 배의 유도가 국내에서 보고 되었으나 발생빈도는 3%미만이였다(Harn et al., 1975). 또한 약의 소독 전처리, 식물의 연령, 소포자 성숙도가 배발생에 미치는 영향이 보고된 바 있다(Kim and Kim, 1984). 최근에 국내의 여러 종묘회사에서 고추 약배양이 행하여지

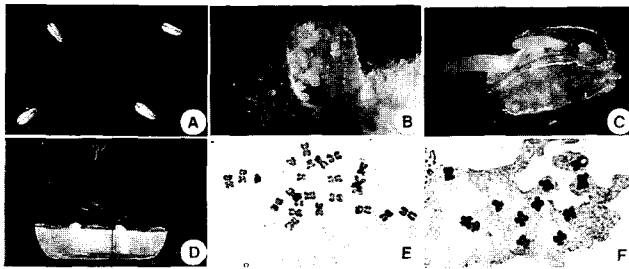
고 있으나 배발생 빈도는 논문으로 보고된 바 없다. 고추 약배양 논문 중 가장 특기할 만한 것은 Dumas de Vaulx 등(1981)에 의해 보고되었다. 이들은 약을 35°C의 암소에서 배양함으로써 약 30% 빈도의 식물체를 얻을 수 있었다. 본 연구에서는 기본적으로 Dumas de Vaulx 등(1981)의 방법을 이용하여 농협종묘개발센터의 여러 계통의 고추에 대하여 고빈도의 배발생 및 식물체 재분화 시스템을 확립하였다.

### 재료 및 방법

#### 공시재료

경기도 안성 농협종묘개발센터에서 재배하고 있는 고추 (*Capsicum annuum* L.)의 순계(P71: 재래양녹과: P72: C-HC: P73: C-NH: P74: 밀양: P75: California Wander TMR) 5계통 및 F<sub>1</sub> 잡종(품종명은 아직 없으며 포장시험단계임.) 18 품종의 미성숙 약을 배양재료로 하였다. 온실에서

재배하고 있는 식물체로부터 96년 4월부터 8월까지 화퇴를 채취하였다. 재배기간중 식물체에 일체의 농약사용을 금하였다. 화퇴의 채취는 오전 9시에서 10시경으로 제한하였다. 화퇴의 길이는 3-5 mm, 꽃받침 위로 꽃잎이 2 mm 올라온 것을 선별하여 적출한 약 중에서 전체 길이의 절반 이하로 착색된 것을 사용하였다(Figure 1A). 세균 오염을 최소화하기 위하여 화퇴의 꽃받침을 제거하고, 화퇴를 70% 에탄올에 20초간 침지한 후 10%로 희석한 상업용 표백제(유한락스)에 15분 표면살균한 다음 멸균증류수로 3회 수세하였다.



**Figure 1.** Plant regeneration in anther cultures in *C. annuum* L. A: Anthers placed on medium; B: Globular embryos developed from pollen grains; C: Torpedo-shaped embryos; D: Plantlet regenerated from anther derived embryo; E: Root-tip chromosomes of diploid plant ( $2n=2x=24$ ) regenerated from anther; F: Root-tip chromosomes of haploid plant ( $n=x=12$ ) regenerated from anther.

**Table 1.** Frequency of embryo and callus formation in anther cultures of *C. annuum* L.

Line		<sup>a</sup> No. of anthers cultured	<sup>a</sup> No. of anthers forming embryos	% Anthers forming embryos	% Anthers forming calli
Inbred	P71	310	60	19.35 ± 19.03	14.19 ± 15.10
	P72	259	1	0.3861 ± 3.01	42.85 ± 24.06
	P73	492	56	11.38 ± 7.42	70.12 ± 17.75
	P74	1515	671	44.29 ± 22.54	17.95 ± 13.27
	P75	114	4	3.50 ± 3.28	74.56 ± 10.07
Hybrid	P51	365	4	1.09 ± 4.82	61.91 ± 16.46
	P56	312	5	1.60 ± 3.86	67.94 ± 11.66
	P57	420	27	6.42 ± 7.33	80.95 ± 10.72
	P58	110	5	4.54 ± 5.23	10.00 ± 11.19
	P59	343	21	6.12 ± 6.85	39.94 ± 35.30
	P60	156	3	1.92 ± 3.72	91.02 ± 7.09
	P62	288	44	15.27 ± 11.21	86.80 ± 11.94
	P63	216	10	4.62 ± 4.34	82.87 ± 11.96
	P64	396	45	11.36 ± 12.26	75.75 ± 7.35
	P66	144	53	36.80 ± 36.61	69.44 ± 14.74
	P76	750	116	15.46 ± 15.15	78.13 ± 18.46
	P77	35	14	40.00 ± 0	51.42 ± 0
	P78	27	6	22.22 ± 0	51.85 ± 0
	P79	72	42	58.33 ± 47.13	54.16 ± 19.09
	P80	108	11	10.18 ± 40.61	40.74 ± 31.12
	P285	66	6	9.09 ± 0.77	50.00 ± 5.14
	P314	216	65	30.09 ± 13.87	48.61 ± 27.75
P316	446	45	10.08 ± 7.92	68.16 ± 11.20	

<sup>a</sup>Anthers were precultured for eight days on Dumas medium supplemented with 0.1 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L kinetin at 38°C in the dark.

<sup>b</sup>±Standard deviation.

<sup>c</sup>Data were collected after eight weeks of culture.

## 약배양

소독된 화퇴에서 scalpel로 약을 꺼내어 화사를 제거한 후 기본적으로 Dumas de Valux 등(1981)의 방법에 따라 0.1 mg/L kinetin, 0.1 mg/L 2,4-D가 첨가된 Dumas 배지(Dumas de Vaulx et al., 1981)를 25 mL씩 분주한 플라스틱 페트리디쉬(87×15 mm)에 36개씩 치상하여 5-44 반복으로 수행하였다(Table 1). 이를 38°C에서 8일간 암처리한 후 25°C에서 배양하였다. 8주 경과 후 계통별로 배발생 빈도를 조사하였다. 배발생 빈도는 치상한 약에서 체세포배가 생성된 약의 수로 계산하였다. 발생된 체세포배를 MS(Murashige and Skoog, 1962) 기본배지로 옮겨 식물체를 유도하였다.

## 염색체 조사

약으로부터 재분화된 P73, P74, P62 계통의 개체 각각 1, 3, 1개씩을 온실에서 순화한 후 근단을 채취하여 1-bromonaphthalene 포화수용액에 4시간 침지 후 acetic acid:ethanol (1:3) 용액으로 고정하여 4°C에서 보관하였다. 고정된 근단은 60°C의 1 N HCl에서 1분간 연화시킨 후 증류수로 세척하여 acetocarmine 용액으로 염색하였다. 염색된 근단의 염색체는 압착법(Choi and Bang, 1990)을 이용하여 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

배양 5일후부터 약의 표면이 담황색을 나타내었고 (Figure 1A), 배양 20일경에는 팽대하면서 봉합선이 벌어지고 일부 약에서는 약강내부, 약벽, 화사의 절단면 등에서 캘러스가 발생하였다. 배양 40여일이 경과되면서 봉합선이 벌어진 약의 내부로부터 백색의 구형, 심장형, 어뢰형 등의 배가 관찰되었다(Figure 1B, C). 순계보다 F<sub>1</sub> 잡종의 배발생이 10일 이상 늦었으며 일부 순계(P74)는 배양 25일이 경과하면서 봉합선 안쪽에서 비교적 일찍 배가 출현하였다. 파열된 봉합선 안쪽에서 발생하는 배는 캘러스 단계를 거치지 않고 직접 유도되는 것으로 보여진다. 또한 캘러스와 배의 90% 이상이 배양 40일 이내에 약 외부로 나왔으며 형성된 배의 수는 약 1개당 1~15개였다. 전체적으로 10~91%의 약에서 회고 단단한 캘러스가 형성되었으나(Table 1), 계대배양을 계속하여도 캘러스로부터 배를 형성하는 경우는 없었다. 유도된 배는 MS 기본배지에서 95% 이상 식물체로 재분화되었다(Figure 1D).

P79의 약에서 배발생 빈도가 58.3%로 가장 높았는데 이는 Dumas de Vaulx 등(1981)이 고추에서 가장 높은 빈도로 발표한 약 30%보다 월등히 높을 뿐 아니라 이제까지 발표된 약배양에서 식물의 종류에 관계없이 가장 높은 빈도에 속한다고 할 수 있다. 그러나 23계통 중 4계통은 2% 이하였으며 순계와 F<sub>1</sub> 잡종간의 뚜렷한 배발생 빈도의 차이는 관찰되지 않았다(Table 1). 본 연구에서 약의 평균 배발생 빈도는 15.8%로서 이제까지 국내에서 발표된 것에 비하여 대단히 높은 수치를 보였다. 이와 같이 배발생 빈도가 계통간에 큰 차이를 보이는 것은 배양조건의 개선으로 극복되지 않는 유전적 요인이 빈도를 결정함을 시사한다.

예비실험에서 착색이 절반 이상 진행된 약은 치상 후에도 캘러스 형성 및 배발생이 관찰되지 않았다. 따라서 약의 발달단계가 배발생에 직접적인 영향을 주는 것으로 생각된다. 또한 화사를 제거한 약에서 제거하지 않은 것보다 배발생 빈도가 높았으며 제거하지 않은 화사로 인해 캘러스 형성이 왕성하였다(테이터 미세시). 또한 공시재료로 사용된 식물체는 재배기간 중 일체의 농약사용을 금하였는데 경험적으로 농약과 접촉한 식물체에서 채취한 약의 배발생 빈도는 현저히 저하되었다(자료 미세시).

한편 P73과 P74 개체의 염색체 수는 모두  $2n=2x=24$ (Figure 1E)로, P62의 염색체 수는  $2n=x=12$ (Figure 1F)로 각각 확인되었다. P73과 P74는 자가배수에 의한 이배체로 추측되며 P62는 정상적인 반수체로 보여진다.

본 연구에서는 23계통의 다양한 순계와 잡종 고추의 약을 Dumas de Vaulx 등(1981)의 방법으로 배양하여 높은 빈도의 재분화 식물체를 얻었다. 따라서 제시된 조건은 국내 고

추의 약배양에 일반적으로 적용될 수 있으리라고 판단된다.

## 적 요

여러 계통의 고추(*Capsicum annuum* L.)의 약을 이용하여 식물체 재분화 조건을 확립하였다. 꽃받침 위로 꽃잎이 2 mm 올라온 미성숙 화퇴에서 상부로부터 절반 이하로 착색된 약을 채취하여 0.1 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L kinetin이 첨가된 Dumas 고체배지에 치상하였다. 배양 4주후부터 배가 발생하였으며, 8주후의 배발생 빈도는 최고 58.3%였다. 배는 MS 기본배지로 옮겨주었을 때 95% 이상이 발아하여 식물체로 재분화되었다.

시사 - 본 논문은 과학기술처 특정과제(HS1560)의 연구결과이다. 원고에 대하여 세심한 논평과 수정을 가해준 박상수, 이형순, 김재훈 박사에게 감사한다.

## 인용문헌

- Agrawal S, Chandra N, Dothari SL (1989) Plant regeneration in tissue cultures of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Tissue Organ Culture* 16:47-55
- Choi HW, Bang JW (1990) Cytogenetic studies of *Scilla scilloides* complex from Korea. I. Distribution of genomes and composition and frequencies of B chromosome. *Korean J Bot* 33:237-242
- Diaz I, Moreno R, Power JB (1988) Plant regeneration from protoplast of *Capsicum annuum*. *Plant Cell Rep* 7:210-212
- Dumas de Vaulx R, Chambonnet D, Pochard E (1981) Culture in vitro d' anthers de piment (*Capsicum annuum* L.). *Agronomie* 1:859-864
- Gunay AL, Rao PS (1978) In vitro plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper *Capsicum*. *Plant Sci Lett* 11:365-372
- Harini I, Lakshmi Sita G (1993) Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science* 89:107-112
- Ham C, Kim MZ, Choi KT, Lee YI (1975) Studies on the anther culture of *Capsicum annuum* L. *Korean J Plant Tissue Culture* 3:1-7
- Jeong WJ, Min SR, Ahn MY, Liu JR, Park YJ, Cho KW (1996) Somatic embryogenesis of pepper. *Korean J Plant Tissue Culture* 23:223-226
- Jeong WJ, Min SR, Liu JR, Park YJ, Cho KW (1994) Somatic embryogenesis of hot pepper. *Korean J Plant Tissue Culture* 21:299-302
- Jo JY, Choi EY, Choi DS, Lee KW (1996) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryo culture in pepper (*Capsicum annuum* L.). *J Plant Biol* 39:127-135
- Kim MZ, Kim YR (1984) Basic studies on induction of microspore-originated calluses or embryos in the anther culture of *Capsicum annuum* L. *Korean J Plant Tissue Culture* 11:75-112

- Kim YS, Lee BK** (1995) Pollen culture in *Paeonia albiflora*. Korean J Plant Tissue Culture 22:13-17
- Lee SJ, Kim BD, Paek KH** (1993) In vitro plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from cotyledon explant of hot pepper (*Capsicum annuum* cv Golden Tower). Korean J Plant Tissue Culture 20:289-294
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15:473-497
- Novak FJ** (1974) Induction of haploid callus in anther cultures of *Capsicum* sp. Z.Pflanzenzüchtg 72:46-54
- Ochoa-Alejo N, Moreno I** (1990) Cultivar differences in shoot-forming capacity of hypocotyl tissues of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) culture in vitro. Scientia Horti 42:21-28
- Phillips GC, Hubstenberger JF** (1985) Organogenesis in pepper tissue cultures. Plant Cell Tissue Organ Culture 4:261-269
- Wang YC, Sun C, Wang C, Chien N** (1973) The induction of the pollen plantlets of *Triticale* and *Capsicum annuum* from anther culture. Scientia Sinica 16:147-151

(1998년 6월 10일 접수)