

카네이션 약배양에 있어서 저온전처리, 암처리 및 Ficoll처리가 켈러스 형성 및 기관분화에 미치는 영향

이수영* · 김재영 · 김태일 · 고재영 · 김기선¹

원예연구소, ¹서울대학교 원예학과

Influences of Cold Pretreatment, Dark Condition, and Ficoll on the Callus Formation and Organ Differentiation in Anther Culture of Carnation

Lee, Su-Young* · Kim, Jae-Yeong · Kim, Tae-Il · Ko, Jae-Young · Kim, Ki Sun¹

National Horticultural Research Institute, RDA, Suwon 441-310, Korea

¹Dept. of Horticulture, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

*corresponding author

ABSTRACT These studies were carried out to investigate the effects of cold pretreatment, dark condition, and Ficoll on the callus formation and organ differentiation in anther culture of carnation for the purpose of settling the techniques of anther culture of 'Rony' carnation. Diameter of flower buds containing anthers with microspores before or after unincleated stage was between 4 and 6 mm. A high percentage of callus formation and responding anthers were achieved by low temperature pretreatment at 4°C for 7 days. Callus formation was promoted under dark condition. Roots were differentiated from calli formed under darkness. Ficoll didn't promote callus formation but promoted differentiation of shoots and roots.

Additional key words: flower buds, microspores, pollen

서 언

카네이션은 세계 3대 절화에 속하며 우리나라 '97년도 절화재배면적은 173.2ha이고, 생산액은 248억원으로서 시장성·기호성·영리성이 높은 주요 화훼작물이다. 카네이션은 교잡육종이나 돌연변이 육종에 의해 품종 육성이 이루어지고 있으며 최근 선진 외국의 경우 유전자 변이의 한계성에 따르는 유전자원의 고갈에 대비하여 약배양, 원형질체 배양 및 생명공학을 이용한 유전변이의 확대 및 육성 기술이 개발되고 있다.

약배양은 동질화된 호모성 개체의 생산을 용이하게 하며 자식성 작물에서는 육종년한을 크게 단축시킬 수 있고 타식성 작물에서는 단시일 내에 F₁ 품종 생산에 이용될 호모화된 양친을 만들 수 있어 육종의 한 수단으로 이용되고 있다(Suh와 Park, 1994).

화훼작물 중에는 라넨쿨러스(Meynet와 Duclos, 1990), 해바라기(Gurel 등, 1991), 나리(Han 등, 1997), 작약(Lee 등 1992), 튜베로즈(Gi와 Tray, 1989), 시클라멘(Ishizaka와 Uematsu, 1993) 등에서 약배양에 의한 유식물체 획득이나 약배양의 효율을 증진하기 위해 genotypes(Thengane 등, 1994), 배양배지 및 암처리(Arzate-Fernandez 등, 1997), 저온전처리(Arzate-Fernandez 등, 1997; Lee 등, 1992), 생장조절제처리(Lee 등, 1992; Raducanu 등, 1994) 등에 관해 연구된 바 있다. 카네이션의 경우 Multy와 Kumar(1976)와 Villalobos(1981)가 약배양하여 유식물체를 획득하긴

하였지만 소포자 유래의 것이 아니라 체세포조직 유래의 유식물체를 획득하였다는 보고 외에는 연구 보고된 바가 없다. 이에 본 연구는 카네이션의 약배양 기술을 확립하고자 저온전처리, 암처리, Ficoll처리가 약배양에 미치는 효과를 조사하기 위해 수행하였다.

재료 및 방법

공시재료로는 꽃가루가 충분하고 일경다화성으로 적색의 꽃을 피우는 'Rony' 품종을 사용하였다. 예비시험 결과 10일간의 저온전처리가 효과적임을 확인한 후 효과적인 저온전처리기간을 확립하고자 발육단계상 1행기 소포자 전후의 화분이 있는 약을 가지는 'Rony'의 대략적인 화피 크기가 4~6mm인 화피를 채취하여 4°C에서 1~9일까지 전처리하였다. 저온전처리가 끝난 화피안의 약은 sucrose 30g/L, bacto- agar

8g/L을 첨가하여 pH 5.8로 조정하고, 2,4-D 1mg/L 및 Kinetin 0.75mg/L를 첨가한 B₅배지에 배양하였다. Ficoll처리는 B₅액체배지와 B₅고체배지에 0.3g/L 농도로 하였으며, 암처리는 배양직 후부터 계속 처리하였다. 배양조건은 온도 25°C, 일장 16시간, 광도 2,000 Lux로 하였다. 배양후 켈러스 형성과 기관분화에 대한 조사는 배양 1달 후부터 계속 실시하였다.

결과 및 고찰

화피크기별 약내 화분의 대략적인 발육단계를 조사하여, 약배양에 적합한 화피크기를 정하기 위해 카네이션의 화피 크기별 화분발육단계를 현미경으로 관찰하여(800배) 조사한 결과, 약내 화분의 발육단계가 일반적으로 약배양에 가장 적합하다고 알려져 있는 1행기 소포자 전후 화분발육단계의 약이 있는 화피의 직경은 4~6mm이었음을 알 수 있었다(Fig. 1). Arzate-Fernandez 등(1997)은 나팔나리의 약배양시 약배양에 적합한 화피의 크기를 정하여 보고한 바 있는데 그들은 화분발육단계가 초기 및 중기 1행기 소포자인 화분을 포함하고 있는 화피의 길이는 30~46mm라고 하였다. 화피의 직경이 4~6mm의 약을 0.5mm 단위로 세분하여 10일과 15일 저온처리 후 배양해 보았으나 4~6mm내에서는 켈러스 형성이나 배양 후 약의 움직임에 큰 차이는 없었다.

카네이션의 약배양에 가장 효과적인 저온전처리의 기간을 확립하고자 1~9일까지 2일 간격으로 전처리한 후 배양한 결과 1일, 3일, 5일 처리 후 배양한 약에서 전혀 켈러스 형성은 되지 않았으나, 7일과 9일 처리한 후 배양한 약에서 각각 19.0, 2.8% 형성되었다. 또한 7일 처리 이후에 배양한 약의 경우는 켈러스가 형성되지 않았더라도 부풀거나 또는 갈라지거나 하는 등 반응이 있었고, 9일 처리 후 배양한 약에서도 켈러스를 형성하지 않은 약의 모두는 부풀든지 또는 갈라지는 등의 반응을 나타내었다. 9일 저온전처리에서도 7일 저온전처리에서처럼 배양한 약에서 켈러스가 형성되고 녹식물체가 발생하였으나(Fig. 2), 켈러스 형성율이 7일 저온전처리 보다 낮으며 부풀든지 또는 갈라지는 등 배양 후 약의 반응으로 볼 때 카네이션의 약배양에 가장 효과적인 저온전처리 기간은 7일이었다(Table 1). 마늘의 경우 5°C에서 1~2일간



Fig. 1. Uni-nucleate stage of microspores in 'Rony' carnation at flower bud size 4-6mm (×800).

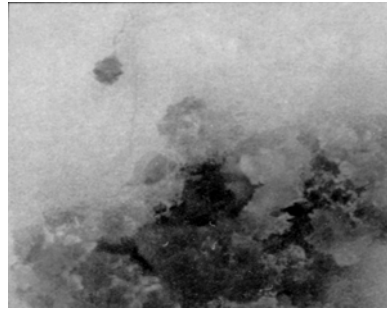


Fig. 2. A shoot differentiated through callus formed from 'Rony' carnation anther cultured after cold pretreatment for 7 days.

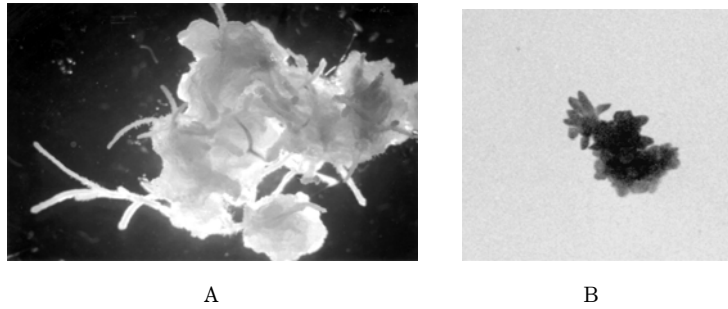


Fig. 3. A shoot and roots differentiated through callus formed from 'Rony' carnation anther cultured in the medium including 0.3g/L of Ficoll. A: Roots; B: A shoot.

(Suh와 Park, 1994), 작약의 경우 배양전 약을 5℃에서 10일 저온전처리한 후 0.2mg NAA + 0.5mg BA + 0.4mg thidiazuron이 첨가된 MS배지에 배양하였을 때 캘러스가 가장 잘 유도되었고, 배발생은 0.2mg NA + 0.0002mg thidiazuron이 첨가된 MS배지에 배양하였을 때 효과적이었다고(Lee 등, 1992) 보고된 바 있다.

카네이션의 약배양시 암배양의 효과를 조사하기 카네이션의 약을 배양한 후 암처리를 한 결과 명배양한 대조구의 경우 캘러스 형성율이 4.7%에 비해 암배양한 경우 44.6%로 10배 정도 높았다. 또한 명배양의 경우 형성된 캘러스에서 뿌리나 신초가 분화되지 않았으나 암배양한 경우 형성된 캘러스에서 신초의 분화는 없었으나 뿌리가 분화되었다(Table 2, Fig. 3). 그러나 분화된 뿌리에서 신초가 분화되지는 않았다. 이는 Wisemann 등(1996)은 장미속의 몇 종을 약배양시 저온전처리 후 28℃에서 암배양한 결과 반수체 기원의 캘러스를 형성하는 데 효과적이라는 보고와 일치하였고, Jaramillo와 Summers(1991)도 토마토의 약배양시 암배양기간이 길어짐에 따라 캘러스의 수가 증가되었고 직경이 길어졌다는 보고한 바 있다.

Ficoll은 액체배양시 배양한 약이 바닥으로 가라앉는 것을 방지하여 배양체의 발생 효율을 증가시킬 목적으로 사용하며(Cistue 등, 1994), Kao 등(1991)은 보리의 약배양시 Ficoll처리가 녹식물체의 유도에 필수적이라고 한 바 있다. 이에 Ficoll이 카네이션의 약배양에 효과가 있는지를 조사하기 위해 액체와 고체배양에 Ficoll을 처리한 결과 캘러스 형성율에 있어서 대조구 6.4%이고, 처리구 4.4%로 캘러스 형성에는 별

효과가 없었다. 그러나 고체배양 처리에서 동일 식물체에서 동시에 분화된 것은 아니지만 신초와 뿌리가 분화된 것으로 볼 때 Ficoll이 카네이

션의 약배양시 형성된 캘러스에서 뿌리나 신초를 분화시키는데에는 다소 효과가 있는 것으로 생각된다(Table 3, Fig. 4).

약배양은 인위적으로 소포자가 배우체로 발달하는 것을 억제하고 조포체로 유도함으로써 반수체를 생산하는 방법으로 배양전에 약에 저온전처리, 암처리, 생장조절제처리 등의 스트레스를 가함으로써 소포자가 배우체가 아닌 조포체로의 전환을 유도할 수 있다. 본 실험의 결과 카네이션의 경우 저온전처리, 암처리 및 Ficoll 처리시 캘러스형성이나 기관분화에 대한 효과는 저온전처리와 암처리에서 캘러스 형성율이 각각 대조구에 비해 월등히 높았으므로 저온전처리후 암처리를 병행하면 훨씬 효과적일 것으로 생각하는 바이다. Arzate-Fernandez 등(1997)도 나팔나리의 약배양시 저온전처리후 암처리했을 경우 반수체 기원의 캘러스 형성율을 높였다는 보고가 있다.

최근 상업적으로 유통되는 카네이션의 품종들은 영양번식 작물의 육성방식으로 개량되어 왔기 때문에 유전적으로 매우 복잡하여 이질테로이며 배수체, 이수체가 많아 교배후 종자를 얻기가 힘들다. 또한 형질과 연관한 유전연구가 많이 이루어지지 않고 있어 카네이션의 약배양 기술에 의한 반수체의 육성과 분자생물학 기술을 접목하면 카네이션 형질의 유전연구와 품종 육성을 위한 기반구축을 하는 데 도움이 되리라 생각한다.

Table 1. Effects of cold pretreatment on callus formation from 'Rony' carnation anther cultured at B₅ medium.

Days of pretreatment	No. of anthers cultured	No. of Calli from anthers	Calli formation from anthers (%)	No. of anthers swollen or split after culturing	Anthers swollen or split after culturing (%)
1	17	0	0	0	0
3	29	0	0	10	34
5	10	0	0	5	50
7	37	7	19.0	30	81.1
9	36	1	2.8	34	94.4
Total	129	8	6.2	79	61.2

Table 2. Effects of dark condition on callus formation from 'Rony' carnation anther cultured at B₅ medium and organ differentiation from Calli.

Treatment	No. of anthers cultured	No. of Calli from anthers	Calli formation from anthers (%)	No. of Calli differentiating shoot	Calli differentiating shoot (%)	No. of Calli differentiating root	Calli differentiating root (%)
Control	426	20	4.7	0	0	0	0
Dark	258	115	44.6	0	0	2	1.7

Table 3. Effects of Ficoll on callus formation from 'Rony' carnation anther cultured at B₅ medium and organ differentiation from Calli.

Treatment	No. of anthers cultured	No. of Calli from anthers	Calli formation from anthers (%)	No. of Calli differentiating shoot	Calli differentiating shoot (%)	No. of Calli differentiating root	Calli differentiating root (%)
Control	299	19	6.4	0	0	0	0
Ficoll	183	8	4.4	2	25.0	1	12.5

초 록

카네이션의 약배양 기술을 확립하고자 저온 전처리, 암처리, Ficoll처리가 약배양에 미치는 효과를 조사하였다. 약배양에 적합한 화분의 발육단계인 1핵기 소포자 전후 화분의 약을 가지는 카네이션 화퇴의 직경은 4~6mm이었다. 카네이션 약배양 후 캘러스 형성과 배양 후 약의 반응에 가장 효과적인 저온전처리 기간은 7일이었다. 명배양하는 것보다 암배양하는 것이 캘러스 형성과, 형성된 캘러스로부터 root 분화에 효과적이었다. Ficoll처리는 캘러스 형성에 큰 효과는 없었지만, 형성된 캘러스로부터 신초와 root가 분화되었다.

추가 주요어 : 꽃봉오리, 소포자, 화분

인용문헌

- Arzate-Fernandez, A. M., T. Nakazaki, H. Yamagata, and T. Tanisaka. 1997. Production of doubled-haploid plants from *Lilium longiflorum* T. anther culture. *Pla. Sci. Lim.* 123:179-187.
- Cistúe, L., A. Ramos, M. Castillo, and I. Romangosa. 1994. Production of large number of doubled haploid plants from barley anthers pretreated with high concentrations of mannitol. *Plant Cell Reports* 13:709-712.
- Gi, H. S. and H. S. Tray. 1989. Anther culture and somaclonal variation of tuberose. *J. Agr. Res. China* 38: 346-352.
- Gurel, A., K. Nichterlein, and W. Friedt. 1991. Shoot regeneration from anther culture of sunflower and some interspecific hybrids as affected by genotypes and culture procedure. *Plant Breeding* 106:68-76.
- Han, D. S. , Y. Niimi, M. Nakano, and D. S. Han. 1997. Regeneration of haploid plants from anther cultures of asiatic hybrid lily 'Connecticut King'. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 47:153-158.
- Ishizaka, H. and J. Uematsu. 1993. Production of plants from pollen in *Cyclamen persicum* M. through anther culture. *Japanese J. Breeding* 43:207-218.
- Jaramillo, J. and W. L. Summers. 1991. Dark-light treatments influence induction of tomato anther culture. *Hortscience* 26:915-916.
- Kao, K. N., M. Saleem, S. Abrams, M. Pedras, D. Horn, and C. Mallard. 1991. Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods. *Plants Cell Reports* 9:595-601.
- Lee, B. K., J. A. Ko, and Y. S. Kim. 1992. Studies on the thidiazuron treatment of anther culture in *Paeonia albiflora*. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 33:384-395.
- Maynet, J. and A. Duclos. 1990. The in vitro culture of persian buttercup. II. Production of plants by anther culture in vitro. *Agronomie* 10:213-218.
- Multy, Y. S. and V. Kumar. 1976. In vivo production of plantlets from the anthers of *Dianthus caryophyllus* L. *Acta. Bot. Indica.* 4:172-173.
- Raducanu, F., G. Soare, and I. Moraru. 1994. The influence of growing regulators on anther culture in sunflower. *Roma. Agr. Rea.* 2:41-43.
- Suh, S. K. and H. G. Park. 1994. Effects of temperature pretreatment, growth regulators and antibiotic treatments on anther cultures of various cultivars of garlic. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 35:337-344.
- Thengane, S. R., M. S. Joshi, Khuspe, S. S., and A. F. Mascarenhas. 1994. Anther culture in *Helianthus annuus* L., influence of genotype and culture conditions on embryo induction and plant regeneration. *Plant cell reports* 13:222-226.
- Villalobos, V. 1981. Floral differentiation in carnation(*Dianthus caryophyllus* L.) from anthers cultivated in vitro. *Phyton, Argentina* 41:71-75.
- Wissemann, V., C. Mollers, and F. H. Hellwig 1996. Microspore and anther culture in genus *rosa*, investigations and current status. *Angewandte-Botanik* 70: 218-220.