

작약의 약 및 소포자 배양에서 Phenylacetic Acid (PAA)가 배형성에 미치는 영향

권용삼 · 신영애 · 손재근*
경북대학교 농과대학 농학과

Effect of Phenylacetic Acid (PAA) on Embryo Formation in Anther and Microspore Culture of *Paeonia lactiflora*

KWON, Yong-Sham · SHIN, Young-Ae · SOHN, Jae-Keun

Department of Agronomy, College of Agriculture, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

ABSTRACT The objective of this study was to determine the effects of phenylacetic acid (PAA) on embryo production in anther and microspore culture of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.). The anthers of herbaceous peony were cultured on MS medium with 0 to 100 mg/L PAA according to two-step culture method. The ruptured anthers were transferred onto embryo formation medium without growth regulators. The MS medium with 2 mg/L PAA was effective in enhancing of direct embryogenesis and producing of normal embryo with two cotyledons from the cultured anthers. However, the increase of PAA concentration more than 5 mg/L PAA inhibited the embryo formation and promoted to callus formation from the anthers. The PAA affects significantly on the division of microspore and embryo formation in shed pollen culture and the best result was obtained from a medium supplement with 2 mg/L PAA. The preculture of anther for 10 days on solid medium with 2 mg/L PAA was effective for embryo formation from shed microspore of herbaceous peony.

Key words : Embryo production, herbaceous peony, phenylacetic acid, shed pollen culture

서 론

목단속에 속하는 다년생 초본식물인 작약 (*Paeonia lactiflora* Pall.)은 그 뿌리가 한약제로 널리 사용되어 왔고 꽃은 관상용으로 이용가치가 높은 작물이다. 작약은 4~6년을 주기로 영양체의 분리재배를 통하여 증식하며, 노지 상태에서 월동이 가능하기 때문에 따로 저장시설이 필요하지는 않지만 노두 부분만을 번식재료로 이용하므로 3~5배 정도의 증식체를 확보하기 위해서는 최소한 3년 이상의 재배기간이 필요하며, 모주가 바이러스병에 감염되었을 때 큰 피해를 입게 될 우려도 있다. 교배 육종의 경우 종자의 파종에서 개화까지의 기간이 3~4년 정도 소요되고 자연상태에서 종자발아에

소요되는 기간 또한 5~6개월로 긴 편이다.

조직배양 기술 중 약 및 소포자 배양은 자식성 작물의 경우 초기에 homozygous한 계통을 얻을 수 있어 육종연한을 크게 단축시킬 수 있으며, 타식성 작물은 양친을 초기에 homo화시킴으로서 잡종 1세대의 종자생산이 용이해지며, 특히 반수체는 열성형질의 출현빈도가 높아 유용열성인자를 쉽게 이용할 수 있는 등의 장점이 있다. 작약의 약배양은 1970년대 중반에 기내배양된 약내 소포자의 발달과정 (Harn and Choi 1976), 약의 저온처리 효과 (Lee 1982) 등에 대한 연구가 시작되었으며, 약배양에 의한 반수체 생산분야는 배지 내에 첨가되는 질소원과 탄소원의 종류와 적정 농도 (Kwon and Sohn 1996), 생장조절제의 조성 (Sohn and Kim 1993), 배의 형태에 따른 유식물 분화 (Sohn et al. 1995) 등에 대한 연구가 수행되면서 약배양 효율은 과거보다 개선되고 있는 실정이다. 소포자 배양의 경우도 배양에 적합한 몇 가지 요인

*Corresponding author Tel 053-950-5711 Fax 053-958-6880
E-mail jhsohn@bh.knu.ac.kr

이 구멍된 바 있으나 (Kim and Sohn 1996), 배양효율은 아직도 약배양에 비해 크게 저조한 실정이다.

작약의 소포자로부터 형성된 배는 배지조성에 따라 그 형태가 다양하며, 배지에 첨가되는 성장조절제의 농도가 높을 경우 기형배의 발생빈도가 높을 뿐만 아니라 배의 발아율도 현저히 낮아져 전체 분화식물체 중에서 정상 식물체의 획득 빈도가 상대적으로 낮은 것이 반수체 육종의 실용화에 큰 문제점으로 지적되고 있다 (Sohn et al. 1995). 따라서 작약의 약 및 소포자배양에서 배지 내에 첨가되는 성장조절제의 종류나 농도를 달리하여 정상배의 획득빈도를 높이는 방안이 확립되어져야만 반수체를 이용한 육종효율 또한 향상될 수 있을 것이다.

Auxin의 일종인 phenylacetic acid (PAA)는 IAA보다 장기간 저장해도 분해되거나 파괴되지 않고, 증기압평균에서도 다른 성장조절제보다 안정한 것으로 알려져 있다 (Bregitzer et al. 1995). 밀의 약배양과 보리의 소포자배양에서 PAA를 첨가하면 식물체 재분화율이 향상되고 백색체의 출현률도 줄었다는 보고 (Ziauddin et al. 1992)가 있는 이후 카네이션 (Jethwani and Kothari 1996), 고추 (Husain et al. 1999) 등의 조직배양에서도 PAA의 효과가 높은 것으로 보고된 바 있다.

따라서 본 연구에서는 작약의 약 및 소포자배양 효율을 향상시키기 위하여 배지 내에 첨가되는 PAA의 농도별 배형성 정도와 배의 형태적 변이 등에 대한 실험을 수행하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

본 실험에는 경상북도 농업기술원에서 수집·보존해오고 있는 국내재배 품종인 '의성작약' (*Paeonia lactiflora* Pall. cv. Euisongjakyak)을 공시품종으로 이용하였다. 2001년 5월에 포장에서 채취한 공시품종의 화퇴로부터 약을 절취하여 화분발육 단계를 현미경으로 검경한 다음 1핵성 소포자를 갖는 화퇴의 외관적 특징을 관찰하여 직경이 15~20 mm인 화퇴를 화경이 15~20 cm 정도 부착되게 절취하였다. 절취된 화퇴는 증류수가 든 비이커에 꽃아 외부를 비닐로 밀봉한 다음 5°C에 10일간 암상태에서 저온처리하였다. 저온 처리한 화퇴로부터 약을 절취하기 전에 70% 에탄올로 표면살균하고 증류수로 2~3회 세척한 다음 꽃잎을 제거하고 화퇴당 50개의 약을 채취하여 약 및 소포자에 이용하였다. 본 실험에서 약 및 소포자는 26±1°C로 유지되는 항온실에서 암상태로 배양하였다.

약배양 배지 내에 첨가되는 PAA의 효과를 구명하고자, 저온처리된 약을 0, 2, 5, 10, 100 mg/L PAA와 40 g/L sucrose, 2 g/L gelrite가 첨가된 MS 배지 (Murashige and Skoog 1962)에 배양하였다. 약배양 40일 후에 약벽이 열개

된 약을 sucrose와 gelrite 농도는 약배양 배지와 동일하고 성장조절제가 첨가되지 않은 MS 배지에 이식하여 배양 40일 후에 PAA의 농도에 따른 배형성 정도와 배의 형태적 특징을 비교하였다.

소포자 배양에는 약을 40 g/L sucrose와 PAA가 각각 0, 2, 5, 10 mg/L 첨가된 MS 액체배지를 이용하였다. 100 mL 플라스크에 배지를 20 mL 씩 분주하고 저온 처리된 약을 20 개씩 배양한 다음, 26°C 항온 진탕배양기 (120 rpm)에서 배양하였다. 배양된 약으로부터 누출된 소포자 (shed microspore)의 밀도와 분열률은 약배양 40일 후에 혈구계산기 (hemacytometer)를 이용하여 조사하였으며, 배양 60일 후에 약을 제거한 다음 호르몬이 첨가되지 않은 MS 배지에 소포자를 배양하고 30일 후에 PAA의 농도별로 형성된 배의 수를 조사하였다.

고체배지에서 약의 전배양 기간이 shed microspore 배양에 미치는 영향을 조사하기 위하여 5°C에 10일간 저온 처리된 약을 2 mg/L의 PAA가 첨가된 MS 고체배지에 0, 5, 10, 15 일간 전배양한 다음, PAA (2 mg/L)가 첨가된 MS액체배지에 60일간 배양하여 전배양 기간에 따른 소포자의 분열 정도와 형성된 배의 수를 조사하였다.

약 및 소포자 배양에서 획득된 배는 0.3 mg/L의 GA3가 첨가된 MS 배지에서 20일 동안 전배양하여 발아시킨 후 4°C에 8주 동안 저온 처리한 다음 26±1°C, 1일 16시간 명상태 (2500 Lux)로 유지되는 항온실에 배양하여 정상 식물체로 발육시켰다.

결과 및 고찰

약배양

작약의 약을 0, 2, 5, 10, 100 mg/L의 PAA가 각각 첨가된 MS 배지에 40일간 배양하고, 열개된 약을 성장조절제가 첨가되지 않은 배지에 이식한 후 PAA의 농도에 따른 배형성률을 조사한 바 (Table 1), PAA가 첨가되지 않은 배지에서는 소포자로부터 직접 배를 형성한 약의 비율이 26.2% 였으나, 2 mg/L의 PAA가 첨가된 배지에서는 64.6%의 가장 높은 배형성률을 나타내었다. PAA의 농도가 5 mg/L 이상 증가하였을 때 배형성률은 크게 감소하고 캘러스 형성률이 증가하는 양상을 나타내었다. 특히 약배양 배지에 고농도 (100 mg/L)의 PAA가 첨가될 경우 배형성률은 10%로 현저히 낮아지고, 배형성 배지에 이식된 약으로부터 직접 배발생보다는 캘러스가 형성되는 약의 수가 많은 경향이였다.

조직배양에 있어서 PAA의 첨가 효과가 여러 식물에서 보고되고 있는데, Jethwani와 Kothari (1996)는 카네이션의 잎 조직으로부터 캘러스의 유기와 식물체 재분화에, Husain 등 (1999)은 고추의 자엽조직배양에서 식물체 재분화에 각각

Table 1. Effect of PAA concentrations on embryo formation in anther culture of *Paeonia lactiflora*.

PAA (mg/L)	No. of anthers cultured	% of anthers forming callus	% of anthers forming embryos	% of recollusing anthers
0	380	0.0	26.2	0.0
2	400	2.7	64.6	0.0
5	300	3.7	35.7	0.0
10	400	7.8	23.6	0.0
100	400	12.3	10.0	11.8

* Anther culture : MS + 0 ~ 100 mg/L PAA + 40 g/L sucrose + 2 g/L gelrite.
 * Embryo formation : MS + 40 g/L sucrose + 2 g/L gelrite.

PAA가 효과적이었다고 하였다. 한편, Ziauddin 등 (1992)은 밀의 약배양에서 PAA를 첨가하면 식물체 분화율이 향상된다고 하였는데, 작약의 약을 배양한 본 연구에서도 낮은 농도 (2 mg/L)의 PAA는 배형성률을 크게 향상시키는 것으로 나타나 PAA의 효과면에서 Ziauddin 등 (1992)의 보고와 일치하는 경향이었다. 한편, 작약의 약을 PAA가 첨가된 배지에 1단계 배양할 경우 약으로부터 직접 발생하는 배형성률은 감소하고 캘러스 형성률이 증가할 것으로 추정되었다. 따라서 PAA가 첨가된 배지에 40일간 배양한 다음 열개된 약을 생장조절제가 첨가되지 않은 배지에 이식하는 2단계 배양법을 이용할 경우 배형성률이 크게 향상되어 작약의 경우 2단계 약 배양법이 적합한 것으로 분석되었다.

작약의 약배양에서 PAA의 농도를 달리한 배지에서 형성된 소포자 유래의 배의 형태적 특성을 비교한 바 (Table 2, Figure 1), 2개의 자엽을 갖는 정상배 (Figure 1A)의 발생비율은 2 mg/L의 PAA가 첨가된 배에서 70% 이상 높게 나타났고, 생장조절제가 첨가되지 않았거나 5 mg/L의 PAA가 첨가된 배지에서도 60% 이상의 비교적 높은 정상배 발생률을 나타내었다. 그러나 PAA의 농도가 10 mg/L 이상 높아질수록 정상배의 발생비율은 현저히 줄어들고 상대적으로 자엽의 수가 3개 (Figure 1B)이거나 뿔 모양 (Figure 1C)과 같은 비정상 배의 출현 빈도가 높게 나타났다.

기내배양된 식물조직으로부터 형성되는 체세포배의 형태에는 배지 내에 첨가되는 식물생장조절제의 종류와 농도가 가

장 크게 관여하는 것으로 알려져 있다 (Burns and Wetzstein 1997). Sohn 등 (1995)은 작약의 약배양에서 생장조절제가 첨가되지 않거나 2,4-D와 활성탄이 첨가된 배지에서 직접 배형성 과정을 거쳐 형성된 배가 캘러스로부터 형성된 배에서 보다 정상배의 발생비율이 높게 나타나, 2,4-D가 비정상적인

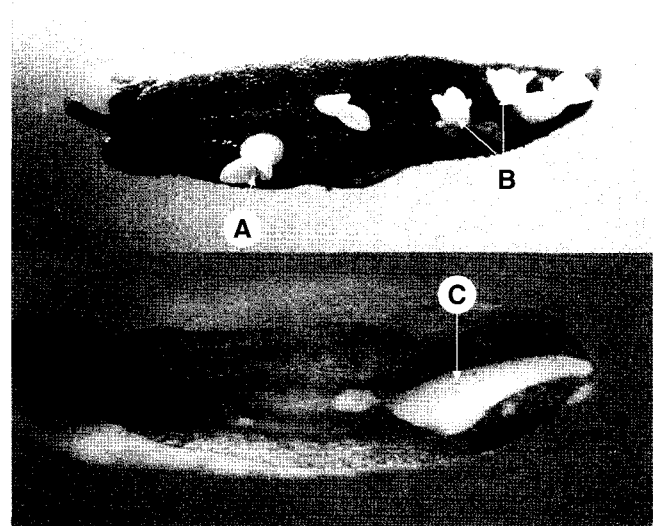


Figure 1. Morphological variation of embryos formed anthers of *Paeonia lactiflora*; A, Normal embryo (embryo with two cotyledons); B, Abnormal embryos with three cotyledons; C, Horn-shape embryo.

Table 2. Morphological variation of embryos formed on medium with different PAA concentrations in anther culture of *Paeonia lactiflora*.

PAA (mg/L)	No. of total embryos	% of cotyledonary variation ^{a, b}					
		one	two	three	four	bowling pin	horn type
0	100	10.0	67.0	13.0	5.0	1.0	5.0
2	123	9.8	71.5	7.3	5.7	2.4	3.3
5	97	10.3	61.9	14.4	4.1	5.1	4.1
10	87	14.9	40.2	17.2	9.2	6.9	11.5
100	40	20.0	30.0	17.5	7.5	10.0	15.0

^a 'One', 'two', 'three', and 'four' indicate cotyledon number.

^b 'Bowling pin', and 'horn type' mean type of pollen-derived embryos.

Table 3. Effect of PAA concentrations on embryo formation in shed microspore culture of *Paeonia lactiflora*.

PAA (mg/L)	Density ($\times 10^4$ /mL)	Division frequency of microspore (%)	No. of embryos /20 anthers
0	2.3	32.7	17
2	4.7	55.4	27
5	1.5	22.1	16
10	0.5	7.1	4

* Medium : MS + 0 ~ 10 mg/L PAA + 40 g/L sucrose.

Table 4. Effect of preculture duration on embryo formation in shed microspore culture of *Paeonia lactiflora*.

Pretreatment (days)	Density ($\times 10^4$ /mL)	Division frequency of microspore (%)	No. of embryos /20 anthers
0	5.6	42.7	15
5	8.7	53.4	31
10	8.9	62.1	36
15	5.5	32.1	8

* Preculture : MS + 2 mg/L PAA + 40 g/L sucrose + 2 g/L gelrite.

배의 발달에 중요한 영향을 미친다고 하였으며, Choi 등 (1997)은 인삼의 자엽배양에서 호르몬이 첨가되지 않은 배지에서보다 auxin계인 TIBA (2,3,5-triiodobenzoic acid)의 농도가 높아질수록 정상배의 발생비율은 줄어들고 여러 개의 자엽을 갖거나 항아리 모양을 가진 배의 출현빈도가 높아진다고 하였다. 본 연구에서도 PAA의 농도가 높아질수록 정상배보다는 비정상배의 발생비율이 높게 나타나 생장조절제가 비정상배의 발생에 크게 영향을 미친다고 한 Sohn 등 (1995)과 Choi 등 (1997)의 연구 결과를 확인할 수 있었다. 그러나 2 mg/L의 PAA가 첨가된 배지에서는 생장조절제가 첨가되지 않은 배지에서보다 정상배의 발생비율이 높게 나타났는데 이러한 연구결과에 대해서는 앞으로 깊이 있는 연구가 있어야 될 것으로 사료된다.

소포자 배양

작약의 소포자 배양에서 배지 내에 첨가되는 PAA의 농도가 소포자의 분열과 배형성에 미치는 영향을 조사한 바 (Table 3), 생장조절제가 첨가되지 않은 배지에서보다 2 mg/L의 PAA가 첨가될 경우 약으로부터 누출된 소포자의 밀도가 1 mL당 4.7×10^4 개로 가장 많았고, 분열된 소포자의 수와 형성된 배의 수도 가장 많았다. 그러나 PAA의 농도가 5 mg/L 이상 증가될수록 소포자의 밀도와 분열률 및 배형성 정도는 크게 감소하는 경향을 나타내었다.

PAA를 배지 내에 첨가하여 소포자 배양 효율을 향상시킨 예는 보리에서 보고되고 있는데, Ziauddin 등 (1992)은 1 ~ 10 mg/L의 PAA가 보리 소포자 유래의 배형성 효율을 향상

시킬 수 있었다고 하였으며, Li와 Devaux (2001)는 소포자배양 효율이 아주 낮은 보리 품종의 소포자와 지방을 co-cultivation 하여 PAA가 함유된 배지에 배양했을 때 배형성과 식물체 재분화율이 크게 향상됨을 보고하였다. 작약의 소포자배양에서도 2 mg/L의 PAA가 첨가된 배지에서 배의 획득효율이 높게 나타나 PAA의 효과면에서 Ziauddin 등 (1992)과 Li와 Devaux (2001)의 연구결과와 일치하는 경향을 나타내었다.

5°C에 10일간 저온처리된 작약의 약을 2 mg/L의 PAA가 첨가된 MS고체배지에 0~15일간 배양하고, 각각의 전배양된 약을 2 mg/L의 PAA가 첨가된 MS액체배지에 진탕배양하면서 약의 전배양 기간이 소포자로부터 배발생에 미치는 영향을 조사한 바 (Table 4), 전배양되지 않은 약에 비해 5~10일간 PAA가 함유된 배지에서 전배양된 약에서 누출된 소포자의 밀도와 분열된 소포자수 및 형성된 배의 수가 다른 처리구에서 보다 높은 경향을 나타내었다. 그러나 약의 전배양 기간이 15일 이상 되면 소포자의 분열률과 배형성 정도는 크게 감소하는 경향이였다.

식물의 소포자 배양 효율을 향상시키기 위하여 초기에는 약을 저온이나 고온에 일정기간 전처리 하여 소포자를 분리 배양 방법이 이용되어 왔으나 최근에는 고농도의 탄소원이 함유된 배지에 일정기간 전배양한 약을 소포자 배양에 이용한 예가 많다. Raina와 Irfan (1998)은 벼의 소포자 배양에서 소포자를 mannitol이나 maltose가 첨가된 배지에 일정기간 전배양해야만 캘러스를 유지시킬 수 있었다고 하였으며, Li와 Devaux (2001)는 보리에서 0.3 M의 mannitol과 10 mM CaCl_2 가 함유된 배지에서 전배양된 약을 소포자 배양에 이용

하였을 때 분열되는 소포자의 비율도 높고 100약당 형성되는 배의 획득 효율도 높았다고 하였다. 본 연구에서 작약의 경우도 40 g/L의 sucrose와 2 mg/L의 PAA가 첨가된 배지에서 10일 동안 전배양된 약에서 소포자 배양효율이 높게 나타나 약의 전배양 효과면에서 벼와 보리의 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다.

약으로부터 누출된 소포자를 배양하면서 소포자의 발달과정을 조사한 바 (Figure 2), 배양 5일 후에 소포자 (Figure 2A)가 누출되기 시작하여 배양 20일 후에는 소포자가 분열되어 2~3 세포성 (Figure 2B,C)에서 세포괴 (Figure 2D,E)로 발달하였다. 이들 세포괴는 점차 분열하여 배양 60일 후에 구상형 (Figure 2F), 심장형 (Figure 2G) 또는 어뢰형 (Figure 2H-a)을 거쳐 자엽출현기의 배 (Figure 2H-b)를 형성하였다. 액체배지에서 형성된 자엽출현기의 배를 0.3 mg/L의 GA₃가 첨가된 MS배지에서 3주 동안 발아시킨 다음 4°C에 8주 동안 저온처리한 후 26±1°C 명상태로 유지되는 항온실에 배양하였을 때 정상식물체 (Figure 2I)를 획득할 수 있었다.

적 요

작약의 약 및 소포자 배양 효율을 향상시키기 위하여 배지 내에 첨가되는 PAA의 농도별 배형성 정도와 배의 형태적 변이 등에 대한 실험을 수행하여 얻어진 결과를 요약하면 다음

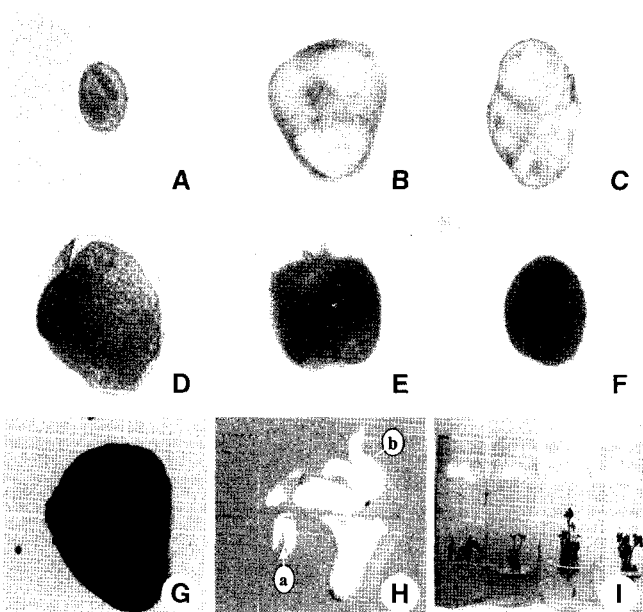


Figure 2. Plantlet development from shed pollen culture of *Paeonia lactiflora*. A-E, Initiation of embryogenesis from microspore; F-H, Developmental stage of embryo; F, Globular stage embryo; G, Heart stage; H, Torpedo (a) and cotyledonary (b) stage embryos. I: Plantlets developed from pollen embryos.

과 같다. 작약의 약배양에서 배지 내에 첨가되는 PAA의 농도에 따라 소포자 유래의 배형성률은 다르게 나타났는데 2 mg/L의 PAA가 첨가된 배지에서 배형성률이 가장 높게 나타났으며, PAA의 농도가 증가됨에 따라 배형성률은 낮아진 반면 캘러스 형성률은 증가하는 경향을 나타내었다. 소포자에서 유래된 배의 형태는 PAA의 농도에 따라 큰 변이를 나타내었는데 2개의 자엽을 가진 정상배의 출현빈도는 2 mg/L의 PAA가 첨가된 배지에서 가장 높게 나타났으며 PAA의 농도가 그 이상으로 증가하면 오히려 비정상배의 출현빈도가 높아지는 경향이였다. 작약의 소포자 배양에서도 2 mg/L의 PAA 첨가 배지에서 10일간 전배양된 약을 PAA (2 mg/L)를 함유한 MS액체 배지에 배양했을 때 누출된 소포자 (shed microspore)의 수도 많았고 분열률도 높았으며, 이들 소포자로부터 형성된 배의 수도 가장 많았다.

인용문헌

Bregitzer P, Campbell RD, Wu Y (1995) Plant regeneration from barley callus : Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and phenylacetic acid. *Plant Cell Tiss Org Cult* 43:229-235

Burns JA, Wetzstein HY (1997) Development and characterization of embryogenic suspension cultures of pecan. *Plant Cell Tiss Org Cult* 48:93-102

Choi YE, Kim HS, Soh WY, Yang DC (1997) Developmental and structural aspects of somatic embryos formed on medium containing 2,3,5-triodobenzoic acid. *Plant Cell Rep* 16:738-744

Han CY, Choi KT (1976) Studies on the anther culture of cultivated *Paeonia albiflora*. *Korean J Plant Tiss Cult* 4:9-13

Husain S, Jain A, Kothari SL (1999) Phenylacetic acid improves bud elongation and in vitro plant regeneration efficiency in *Capsicum annuum* L. *Plant Cell Rep* 19:64-68

Jethwani V, Kothari SL (1996) Phenylacetic acid induced organogenesis in cultured leaf segments of *Dianthus chinensis*. *Plant Cell Rep* 15:869-872

Kim NY, Sohn JK (1996) Plant regeneration from microspore culture of *Paeonia lactiflora* Pall. *Korean J Breed* 28:415-419

Kwon YS, Sohn JK (1996) Effect of carbon and nitrogen sources on embryo formation in anther culture of *Paeonia lactiflora* Pall. *Korean J Plant Tiss Cult* 23:147-150

Lee MS (1982) Effect of low temperature treatment to floral bud on the anther culture of *Paeonia*. *Korean J Plant Tiss Cult* 9:1-6

Li P, Devaux P (2001) Enhancement of microspore culture efficiency of recalcitrant barley genotypes. *Plant Cell Rep* 20:475-481

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497

Raina SK, Irfan ST (1998) High-frequency embryogenesis and plantlet regeneration from isolated microspores of indica rice.

Plant Cell Rep 17:957-962

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 Tiss Cult 20:255-259

Sohn JK, Kwon YS, Kim KM (1995) Effect of embryo morphology

on plant development in anther culture of *Paeonia lactiflora* Pall. Korean J Plant Tiss Cult 22:165-168

Ziauddin Z, Marsolais A, Simon E, Kasha KJ (1992) Improved plant regeneration from wheat and barley microspore culture using phenylacetic acid (PAA). Plant Cell Rep 11:489-498

(접수일자 2002년 8월 6일)