

자당과 붕산이 구기자 화분 발아에 미치는 영향

김수동* · 민병훈** · 윤화모** · 이옥란***†

*충남농업기술원 청양구기자시험장, **배재대학교 생명환경디자인학부, ***전남대학교 식물생명공학부

Effect of Sucrose and Boric Acid on *In Vitro* Pollen Germination of Boxthorn (*Lycium chinense* M.)

Su Dong Kim*, Byung Hoon Min**, Wha Mo Yoon** and Ok Ran Lee***†

*Chungnam Agricultural Research and Extension Services, Yesan 340-861, Korea.

**Division of Horticulture and Environmental Design, Pai Chai University, Daejeon 302-735, Korea.

***Department of Plant Biotechnology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea.

ABSTRACT : This study was carried out to investigate the effect of sucrose, boric acid, and calcium nitrate in optimum pH and relative humidity on pollen germination and pollen tube growth of boxthorn (*Lycium chinense* M.). Medium containing 100 mg/L of H₃BO₃ showed maximum pollen germination and pollen tube elongation, 64.8% and 920 μm. Additionally supplied calcium nitrate to the medium lowered pollen germination rate and pollen tube elongation. Here we report the optimum conditions for the pollen germination and pollen tube development was observed at 10% sucrose, 1.0% agar, pH 6.0, and 100% relative humidity.

Key Words : Boxthorn, Pollen Germination, Pollen Tube

서 언

급변하는 기후변화는 작물의 생육시기와 생육특성에 영향을 주면서 작물의 생산성에 대체적으로 부정적인 영향을 초래한다 (Shin *et al.*, 2000). 이에 경제적으로 고부가가치를 창출할 수 있는 주요 약용작물을 기반으로 기후변화 대응 기술개발이 절실하게 요구된다고 할 수 있다. 구기자나무 (*Lycium chinense* M.)는 가지과에 속하는 다년생 낙엽관목으로 키는 1-2.5 m 내외이고 잎은 장가지에 호생하거나 단가지에 총생한다. 꽃은 액생이고 복총상화서 (複總狀花序)로 한개 혹은 여러 개가 뭉쳐 피며 양성화이고 암술은 1개이고 수술은 5개이며 꽃밥은 2실로 이루어져 있다. 이 구기자나무는 한국을 비롯한 아시아 전역에 분포하며, 한방에서 열매를 채취하여 햇빛에 말려 해열제 또는 강장제로 이용하는 의학적으로 가치를 인정받은 약용식물이라 할 수 있다 (Park *et al.*, 2005).

구기자나무는 주로 노지재배를 많이 하였으나, 탄저병과 같

은 병충해나 강우 직후 열과에 의한 품질저하와 같은 문제점이 제기되어 비가림하우스 재배가 확대되는 추세이다. 비가림하우스 재배는 품질 향상, 생산 안정, 병해충 발생의 경감 특히 탄저병 예방효과가 높아 고품질 구기자를 생산 할 수 있어 그 재배면적이 증가되고 있으나 여름철에는 비가림하우스 내 고온에 의한 결실장해가 나타나는 문제점이 있다 (Choi *et al.*, 1996). 이러한 결실장해는 고온에 의하여 화분의 활력이 저하되었거나, 화분관 신장이 이루어지지 않아 수정률이 낮아지는 것으로 추정되므로 이에 대한 자세한 연구가 요청된다 하겠다.

그 중에서 붕소 (B)는 pectin 생합성에 관련된 원소로 화분관 신장에 관여하며 (Stanley and Loewus, 1964), 자당 대사 과정에서 자당의 과도한 중합방지에 대한 보호 효과를 주며 자당의 흡수를 돕는다는 보고도 있다 (Scott, 1960). 구기자나무의 화분에 관한 연구는 스웨덴을 중심으로 한 유럽에서부터 행해져 왔고, 그 본격적인 연구는 1960년대 이후에 이루어졌다. 우리나라에서는 1960년대 후반에 Kwack (1965)에 의해 화분

†Corresponding author: (Phone) +82-62-530-2054 (E-mail) mpizlee@jun.ac.kr

Received 2013 August 20 / 1st Revised 2013 September 2 / 2nd Revised 2013 September 9 / 3th Revised September 11 / Accepted 2013 Revised September 12

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

발아 생리에 대한 연구가 시작되었다. Brewbaker와 Kwack (1963)은 화분발아와 화분관 신장은 자당과 붕산만으로 가능하다고 하였고, Glenk 등 (1969)은 많은 종류의 화분이 화분발아와 화분관 신장에 있어서 칼슘을 필요로 하지는 않는다고 하였는데 이는 화분내에는 칼슘이 많이 존재하기 때문일 것이라고 하였다. 반면, Rihova 등(1996)은 칼슘 이온이 화분발아와 화분관 신장을 억제한다고 하였다. 근래에는 많은 식물의 화분발아 생리에 대한 연구가 육종학적 이용 측면에서 이루어지고 있으나 구기자의 화분발아 생리에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없다. 따라서 본 실험은 구기나나무의 육종과 생식·생리 연구를 위한 기초 자료를 제공하고자 자당과 붕산의 효과를 중심으로 칼슘에 의한 화분관 신장의 억제적 역할을 설명하고, 적절한 산도와 습도의 조건을 제공하고자 한다.

재료 및 방법

1. 식물재료 및 배양조건

실험에 사용된 재료는 청양재래종으로 비가림하우스 시설을 이용하여 재배하였으며, 기내 배양을 위한 화분은 당일 오전에 신선한 상태의 개화된 꽃에서 채취하여 조사하였다. 적절한 화분발아 조건을 찾기 위하여 당은 무처리구와 sucrose, glucose, fructose를 각각 5, 10, 15, 20, 25, 30%로 처리하였으며, agar 농도는 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0%로 처리하여 조사하였다.

2. H₃BO₃, CaCl₂ 첨가에 따른 화분발아율 조사

H₃BO₃과 CaCl₂의 화분발아와 화분관 신장을 위한 적정농도를 구명하기 위해서 H₃BO₃ 0, 50, 100, 200 mg/L와 CaCl₂ 0, 100, 200, 300 mg/L를 복합처리 하였고, 가장 우수한 배양조건으로 판명된 sucrose 10%와 agar 1%를 기본으로 사용하였다. 각각의 배지 50 μ l를 slide glass에 떨어뜨려 응고시킨 후 붓을 이용하여 화분을 배지에 고르게 치상하였다. 상대습도를 100%로 유지하기 위하여 90 mm petri dish에 filter paper 2매씩을 깔고 증류수로 충분히 적신 후 parafilm으로 밀봉하여 처리별 완전임의 배치법 3반복으로 치상하였다. 화분은 25°C에서 6시간 배양한 후 광학현미경 하에서 100배율로 검경하였다. 발아율은 화분관이 화분립 직경 이상으로 신장한 것을 발아된 것으로 간주하여 조사하였고, 화분관 길이는 micrometer로 측정하였으며, 3 반복 검경하여 평균치로 계산하였다.

3. pH 및 상대습도에 따른 화분발아율 조사

상대습도는 각각 100, 98, 92.5, 78.5, 62.5%로 처리하였는데, 상대습도 100%를 유지하기 위해서는 pertri dish에 직경 90 mm filter paper 2매를 깔고 증류수로 충분히 적신 후 parafilm으로 밀봉하였다. 이때 상대습도를 98%로 유지하기 위해 포화된 K₂Cr₂O₇용액을 1~2 mm 두께로 petri dish에 나누

어 넣고 용액이 완전히 식은 후 parafilm으로 밀봉하였다 (Winston and Bates, 1960). 상대습도 92.5%는 KNO₃를 이용하였고, 상대습도 78%는 NH₄Cl, 68.5%는 NH₄NO₃를 이용하여 유지시켰으며 25°C incubator에 3일간 넣은 후 이용하였다. 화분배양은 25°C에서 6시간 배양 후 조사하였다.

4. 배양시간에 따른 화분발아율과 화분관 신장

배양시간에 따른 화분발아율과 화분관 신장을 보기 위해 배지는 H₃BO₃ 100 mg/L, sucrose 10%, agar 1%를 첨가하여 배양 후 2, 4, 6, 8, 10시간 간격으로 화분발아율과 화분관 신장을 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 당종류 및 농도, agar 농도에 따른 화분배양조건 규명

일반적으로 H₃BO₃이 첨가되지 않은 배지에선 화분발아율이 극히 저조한 사례가 문헌으로 보고되어 왔다 (Brewbaker and Majumder, 1961). 이러한 사실은 본 연구 Table 3에서도 다시금 확인된 사항으로 최적의 화분배양조건 규명을 위해 기본적으로 H₃BO₃ 100 mg/L가 첨가된 배지를 사용하여 당 종류 및 농도 검증을 위한 실험을 수행하였다. 탄소원이 첨가되지 않은 무처리구에서는 화분발아율과 화분관 신장이 극히 낮았으나 sucrose, glucose, fructose가 첨가된 배지에서는 비교적 양호하였다 (Table 1). 화분발아율은 Table 1에서 선택한 sucrose 10%가 가장 양호한 조건임이 다시 증명되었으며, 10%와 15% 첨가 시 각각 66.8%, 61.5%의 높은 발아율을 보였으며, glucose는 5%, 10% 첨가 시 각각 21.6%, 16.8%의 발아율을 보였으며, 20%이상에서는 화분이 발아하지 않았다. Fructose를 첨가한 배지에서는 유의차가 없었다. Fructose를 첨가한 배지의 경우 대부분 sucrose나 glucose의 경우에 비해

Table 1. Pollen germination rate and pollen tube length of boxthorn on medium containing 100 mg/L of H₃BO₃ and different concentration of sucrose, glucose, and fructose.

| Carbohydrate concentration (%) | Pollen germination (%) [†] | | | Pollen tube length (μ m) [†] | | |
|--------------------------------|-------------------------------------|---------|----------|--------------------------------------------|---------|----------|
| | Sucrose | Glucose | Fructose | Sucrose | Glucose | Fructose |
| 0 | 1.1c | 1.1c | 1.1ns | 60d | 60b* | 60ns |
| 5 | 20.2b | 21.6a | 5.8 | 358c | 83b | 78 |
| 10 | 66.8a | 16.8a | 8.9 | 924a | 102a | 87 |
| 15 | 61.5a | 10.0b | 6.1 | 535b | 67b | 69 |
| 20 | 25.0b | 0 | 3.9 | 383b | 0 | 62 |
| 25 | 17.2b | 0 | 0 | 46d | 0 | 0 |
| 30 | 13.2bc | 0 | 0 | 33d | 0 | 0 |

[†]Measurements were made 6 hours after culture.

*Means within a column followed by the same letter are not significantly different based on the DMRT test ($p < 0.05$).

Table 2. Pollen germination rate and pollen tube length of boxthorn at different agar concentration.

| Agar concentration (%) | Pollen germination [†] (%) | Pollen tube length [†] (μ m) |
|------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------|
| 0 | 54.3b | 609bc* |
| 0.5 | 47.2cd | 528cd |
| 1.0 | 65.3a | 886a |
| 1.5 | 49.3bc | 742ab |
| 2.0 | 43.7d | 460d |

[†]Measurements were made 6 hours after culture.

*Means within a column followed by the same letter are not significantly different based on the DMRT test ($p < 0.05$).

Table 3. Pollen germination rate and pollen tube length of boxthorn on medium containing 10% of sucrose and 1% of agar with H₃BO₃ and CaCl₂ · 2H₂O.

| H ₃ BO ₃ (mg/L) | CaCl ₂ ·2H ₂ O (mg/L) | Pollen germination (%) [†] | Pollen tube length (μ m) [†] |
|---------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------|
| 0 | 0 | 15.7 | 66 |
| | 100 | 25.5 | 52 |
| | 200 | 17.0 | 32 |
| | 300 | 4.9 | 23 |
| 50 | 0 | 46.7 | 136 |
| | 100 | 31.3 | 100 |
| | 200 | 26.8 | 59 |
| | 300 | 7.4 | 23 |
| 100 | 0 | 64.8 | 920 |
| | 100 | 61.6 | 864 |
| | 200 | 57.6 | 505 |
| | 300 | 44.8 | 412 |
| 200 | 0 | 62.1 | 858 |
| | 100 | 60.1 | 817 |
| | 200 | 50.2 | 650 |
| | 300 | 45.3 | 375 |
| F test significance | | | |
| Boron | | ** | ** |
| Calcium | | ** | ** |
| Boron × Calcium | | * | * |
| LSD at 5% | | | |
| Boron | | 5.52 | 26.52 |
| Calcium | | 5.52 | 26.52 |

[†]Measurements were made 6 hours after culture.

*, **, Significance at $p \leq 0.005, 0.001$.

화분관 신장에 억제적인 역할을 보인다는 보고가 있다 (Okusaka and Hiratsuka, 2009). 위 결과는 sucrose가 화분의 삼투압을 조절하여 화분발아 및 화분관 신장에 효과가 있는 것으로 판단되었는데, Sullivan과 Ross (1979), Chaing (1974)은 화분 발아 시 탄소원으로 sucrose가 가장 좋았다고 보고한 바 있다. Sucrose 무첨가 배지에서 화분발아와 화분관 신장이 크게 억제되었는데 이는 당의 양이 너무 낮아 성장에 필요한 에너지가 부족하였거나, sucrose의 양이 너무 많아지면 삼투압

이 너무 높아져서 나타나는 생리장애인 것으로 생각된다.

Agar 농도에 따른 화분발아율과 화분관 신장을 조사한 결과는 Table 2에서와 같이, 화분발아율과 화분관 신장은 배지의 agar 농도에 따라 유의차를 나타내었다. Agar 무첨가 배지에서는 화분발아율은 54.3%이었고, 화분관 신장은 609 μ m로 액체배지에서도 발아와 화분관 신장은 잘 이루어졌다. 하지만, agar 1.0% 농도에서 화분발아율은 65.3%로 가장 양호하였으며 화분관 신장도 1.0% 농도에서 886 μ m로 가장 좋았다. 그러나 agar 1.5% 이상의 농도에서는 화분발아율과 화분관 신장은 낮아지는 경향을 보였다.

2. H₃BO₃와 CaCl₂ 농도에 따른 화분발아와 화분관 신장

서로 다른 H₃BO₃과 CaCl₂ 농도가 화분발아 및 화분관 신장에 미치는 영향을 조사하고자 최적의 당류 및 농도로 확인된 sucrose 10%와 agar 1%가 첨가된 배지에서 화분발아와 화분관 신장을 조사한 결과는 Table 3과 같다. H₃BO₃와 CaCl₂를 무첨가시 화분발아율은 15.7%이었고, 화분관 길이는 66 μ m이었으나 H₃BO₃ 100 mg/L 단독 처리했을 경우에는 화분발아율이 64.8%로 크게 높아졌고, 화분관의 길이도 920 μ m로 14배가 신장되었다. 그러나 H₃BO₃의 농도가 200 mg/L로 높아짐에 따라 화분발아율과 화분관의 길이는 각각 62.1%, 858 μ m로 낮아지는 경향을 나타내었다. 이는 기존에 붕산이 화분발아와, 화분관 신장에 있어서 중요한 요인이며 주로 대부분의 종에서 100 ppm의 농도가 적절하다는 보고 내용과 유사하다고 할 수 있다 (Brewbaker and Majumder, 1961).

또한 CaCl₂의 농도가 어느 조건의 H₃BO₃이 첨가된 배지 조건하에서는 각각 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L로 처리하였을 때 처리 농도가 높을수록 화분발아율이 낮아지는 경향을 나타내었고, 화분관 길이도 짧아지는 경향을 보였는데 이는 Glenk 등 (1969)과 Rihova 등 (1996)이 보고한바와 유사하게 칼슘의 양이 화분발아율 향상에는 부정적인 영향을 미치는 것을 보여준다. 하지만 H₃BO₃이 존재 하지 않는 배지에선 CaCl₂의 양이 100-200 mg/L 었을 때 다소 화분 발아가 증가 되는 경향을 보였다.

3. pH, 상대습도, 온도에 따른 화분발아와 화분관 신장

pH는 5.0 ~ 6.5의 범위에서 화분발아율과 화분관 신장이 양호하였으나 그 중 pH 6.0에서 화분발아율이 65.5%로 가장 높게 나타났고, 화분관 신장도 pH 6.0에서 927 μ m로 가장 양호하였다. pH 7.0이상에서는 발아율이 저조하였고 pH 8.0에서는 화분발아율은 9.7%로 낮았으며, 화분관 신장도 203 μ m로 저조하였다(Fig. 1). pH 6.0에서 화분발아와 화분관 신장이 양호하였는데 이는 pH가 약산성과 6.0을 중심으로 한 범위에서 잘 된다고 하였던 Shivanna와 Johri (1985), Chrysothemis (1995)의 보고와도 일치하였다.

자당과 붕산이 구기자 화분 발아에 미치는 영향

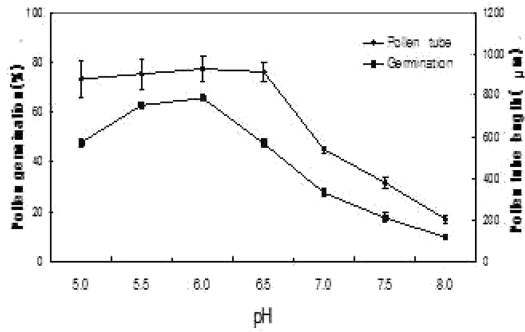


Fig. 1. Pollen germination rate and pollen tube length of boxthorn on medium containing sucrose (10%), H₃BO₃ (100 mg/L) and agar (1%) at various pH conditions. Vertical bars indicate standard errors.

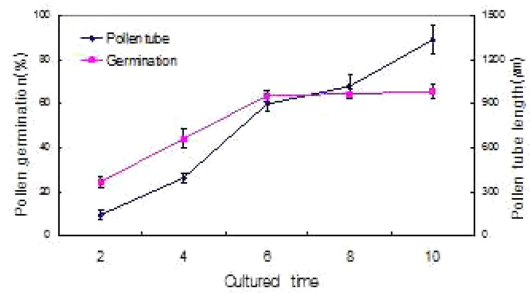


Fig. 3. Pollen germination and pollen tube elongation of boxthorn as influenced by different cultured time on medium containing 10% of sucrose, 100 mg/L of H₃BO₃ and 1% of agar at pH 6.0. Vertical bars indicate standard errors.

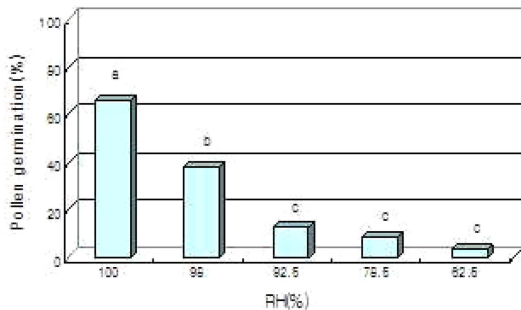


Fig. 2. Influence of the relative humidity (RH) on pollen germination of boxthorn on medium containing 10% of sucrose, 100 mg/L of H₃BO₃ and 1% of agar at pH 6.0. Means within a column followed by the same letter are not significantly different based on the DMRT test ($p < 0.05$).

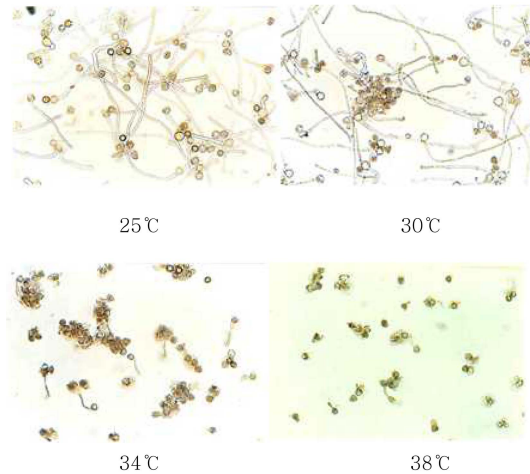


Fig. 4. High temperature treatment with 10% of sucrose, 100 mg/L of H₃BO₃ and 1% of agar at pH 6.0 on pollen germination and pollen tube elongation of boxthorn.

상대습도에 따른 화분발아율은 Fig. 2와 같이 상대습도 100% 처리 시 화분발아율은 65.9%로 가장 높았고, 98% 처리는 38.2%, 92.5% 처리는 12.7%로 급격히 낮아졌으며 62.5%에서는 3.4%로 발아율이 극히 저조하였다.

배양 시간별 화분발아율은 Fig. 3에서와 같다. 배양 2시간 후 24.6% 이었으며, 배양 4시간은 44.2%이었고, 6시간 배양은 63.7%로 배양 6시간까지 발아율은 증가하였으나, 8시간 배양 시 발아율은 64.6%, 10시간 배양 65.8%로 화분발아는 대체로 배양 6시간 이내에 이루어졌다. 그러나 화분관 신장은 배양 10시간에서도 계속 신장하였다. 또한 화분관은 온도가 25°C까지는 양호하게 신장하지만, 30°C부터 영향을 받기 시작하여 4°C씩 올라갈 때 급격히 감소하는 경향을 볼 수 있었다 (Fig. 4). 이 결과는 최근 문제가 되고 있는 지구 온난화의 문제를 고려할 때 쉽게 노출 될 수 있는 30°C 이상 고온장해를 받았을 때 구기자 생산량이 심각하게 영향을 받게 됨을 예측할 수 있다. 위의 연구결과는 바탕으로 추후 30°C 이상의 고온에서도 잘 견디는 품종 육성의 연구나, 초기 고온장해에 노출될 상황에

온도가 급격히 올라가는 것을 방지할 수 있는 하우스 재배 조건을 구축하는 연구가 진행되어야 할 것이다.

LITERATURE CITED

Brewbaker JL and Kwack BH. (1963). The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. American Journal of Botany. 50:859-865.
 Brewbaker JL and Majumder SK. (1961). Cultural studies of the pollen population effect and self-incompatibility inhibition. American Journal of Botany. 48:457-464.
 Chiang MS. (1974). Cabbage pollen germination and longevity. Euphytica 23:579-584.
 Choi BJ, Han SH, Han KS, Ju JI, Lee BC and Moon CS. (1996). Effects of the rain shelter and insect net on growth and yield of *Lycium chinense* Miller. Korean Journal of Medicinal Crop

- Science. 4:58-63.
- Glenk HO, Blaschke G and Barocha KH.** (1969). Investigations on variability of pollen tube growth in diploid and tetraploid plants of sugar beet. 1. Conditions for germination of beta pollen *in vitro*. Theoretical and Applied Genetics. 9:197-209.
- Kwack BH.** (1965). The effect of calcium on pollen germination. Processing of the American Society for Horticultural Science. 86:818-823.
- Okusaka K and Hiratsuka S.** (2009). Fructose inhibits pear pollen germination on agar medium without loss of viability. Scientia Horticulturae. 122:51-55.
- Park BH, Cho HS and Park SY.** (2005). A study on the antioxidative effect and quality characteristics of cookies made with *Lycii fructus* powder. Korean Journal of Food and Cookery Science. 21:94-102.
- Rihova L, Hrabetova E and Tupy J.** (1996). Optimization of conditions for *in vitro* pollen germination and tube growth in potatoes. International Journal of Plant Science. 157:561-566.
- Scott EG.** (1960). Effect of supra-optimal boron levels on respiration and carbohydrate metabolism of *Helianthus annuus*. Plant Physiology. 34:653 ~ 661.
- Shivanna KR and Johri BM.** (1985). The angiosperm pollen structure and function. Wiley Eastern Limited. New Delhi, India. p.118-162.
- Shin JC, Lee CG, Yoon YH and Kang YS.** (2000). Impact of climate variability and change on crop productivity. Korean Journal of Crop Science. p.12-27.
- Stanley RG and Loewus FA.** (1964). Boron and myo-inositol in pollen pectin biosynthesis. In Linskens HF. (Ed.). Pollen physiology and fertilization. North-Holland Publishing. Amsterdam, Netherland. p.128-139.
- Sullivan CY and Ross WM.** (1979). Selecting for drought and heat resistance in grain sorghum. In Mussel H and Staples RC. (eds.). Stress physiology in crop plants. Wiley Interscience Publication. New York, USA. p.263-281
- Winston PW and Bates DH.** (1960). Saturated solutions for the control of humidity in biological research. Ecology. 41:232-237.