당근의 약배양으로부터 직접 및 간접 배형성을 통한 식물체 생산 체계 확립

김미영 · 형남인*

상명대학교 식물식품공학과

Establishment of Plant Production System through Direct and Indirect Embryogenesis from Anther Culture of Carrot

Miyoung Kim, and Nam-In Hyung*

Department of Plant and Food Sciences, Sangmyung University, Cheonan 330-720, Korea

Abstract : We tried to develop the protocol for embryogenesis and plant regeneration from anther culture of carrot (*Daucus carota* L.) genotype 'S&P2342'. Anthers were cultured on MS medium with B5 vitamins containing different combinations of 2,4-D and NAA for 18 weeks in the dark. The best induction of callus and embryo was obtained in the medium containing 0.1 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L NAA, on which 22.0% callus and 2.0% embryo were induced. When primary embryos induced directly from anther culture were transferred to the regeneration medium, secondary embryos were initiated from primary embryos after 4 weeks of culture and 62.5% converted into plantlets after 8 weeks of culture. The plantlets with true leaves were obtained after 12 weeks of culture. When the calli derived from anther culture were transferred to the regeneration medium, 38.8% of the calli produced primary embryos and plantlets after 8 weeks of culture. The plantlets with 2 or more leaves cultured on the regeneration under the different light intensity for the growth of in vitro plantlets. The plantlets cultured at $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ showed the highest growth rate. For the acclimatization, the in vitro plantlets with 4 or more leaves cultivated under the different light intensity and temperature, respectively. The survival rate and growth of plantlets was best at 15°C and $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, respectively. The plants were successfully acclimatized and had a normal phenotype. The anther culture system could be used to prepare the doubled haploid lines as an appropriate breeding material for F_1 hybrid breeding program.

Keywords : Carrot, Anther culture, Embryo, Callus, Plant regeneration

서 언

당근(*Daucus carota* L.)은 생식용 및 가공용으로 세계적으로 재배되고 있는 중요 채소이다(Stein & Nothnagel 1995). 당근은 대개 2년생으로 개화를 위해 춘화처리가 필요한데, 첫 해에는 잎과 줄기가 로제트형으로 자라면서 뿌리가 비대하고 춘화처리 이후 장일조건에서 추대된다(Alessandro & Galmarini 2007).

당근의 육종은 1960년 이전까지는 방임수분 방법으로 이루어졌으나, 1960년 이후부터 옹성불임 계통을 이용한 F_1 잡종 생산에 의해 품종 개발이 주로 이루어지고 있다(Simon

2000, Stein & Nothnagel 1995). 잡종 생산을 위해서는 동형접합성 유지계통 및 화분친 모본계통이 필요한데, 타식성 작물인 당근에서 이형접합적인 잡종 생산은 전통적인 육종법의 자가수정 방법으로 양친계통의 순계를 만드는데 7-10년 장기간이 소요된다(Kiszcak et al. 2011). 당근은 강한 자식약세 때문에 내혼계를 만들기 매우 어려우며 내혼계를 만들기 위해서는 자가수분 각각의 세대를 번갈아 방임수분 하여 3-6세대까지 진전해야만 가능하다(Wehner 1999). 이와 같은 문제점들은 약배양 또는 소포자배양으로부터 동정생식 또는 소포자 배형성을 통한 반수체 또는 배가반수체 식물체를 재생시킴으로써 극복할 수가 있다. 동정생식은 이형접합성인 양친에서 다양한 동형접합성을 갖는 자손 계통을 단기간 내에 수월하게 육성할 수 있어, F_1 잡종 종자 생산에 매우 유용한 핵심 기술로써 활용되고 있다(Luitel et al. 2012, Maraschin et al. 2005, Wang et al. 2000).

*Corresponding author (E-mail: nihyung@smu.ac.kr, Tel: +82-41-550-5293, Fax: +82-41-550-5296)

(Received on October 7, 2014. Revised on October 21, 2014.
Accepted on October 22, 2014.)

당근의 약배양을 통한 식물체 재생은 직접 배형성(Gorecka et al. 2005, Yoo 2010) 또는 캘러스 단계를 거치는 간접 배형성(Cho et al. 2003, Kim 2009)의 경로를 통하여 이루어지는데, 유전형에 따라 배형성 경로(Anderson et al. 1990) 및 배형성 효율에 차이를 나타낸다고 보고되었다. 직접 배형성에서는 MS배지 또는 B5배지에 2,4-D를 필수적으로 포함시키고 NAA (Gorecka et al. 2005) 또는 IAA (Yoo 2010) 등의 auxin을 추가적으로 첨가하여 배형성을 유도한 후, 생장조절제 무첨가 배지에서 식물체를 획득하였다. 약배양으로부터의 간접 배형성에서는 B5배지에 2,4-D와 함께 auxin으로 NAA (Anderson et al. 1990) 또는 cytokinin으로 BA를 첨가한 배지에서 캘러스를 유도한 후 생장조절제 무첨가 배지(Anderson et al. 1990, Cho et al. 2003) 또는 NAA와 BA 첨가 MS배지(Kim 2009)에서 식물체 분화에 성공되었다. 한편, 약배양으로부터 2,4-D 단독(Matsubara et al. 1995) 또는 NAA (Anderson et al. 1990)와 kinetin (Hu et al. 1993)을 추가적으로 첨가한 B5배지나 MS배지에서 직접 배형성과 간접 배형성을 동시에 유도하기도 하였다. 그러나 당근의 약배양에 관한 대다수의 연구가 약으로부터 배형성 및 식물체 재생 과정에 국한되어 이루어졌기 때문에 약배양 유래의 건전한 식물체의 생산 및 재배 과정에 대한 정보가 부족한 실정이다. 이로 인하여 식물의 육종 프로그램에서 순수 동형접합성의 식물을 획득하는 방법이 광범위하게 적용되고 있는 다른 작물과 달리 당근에서는 그 기법이 일반적으로 활용되지 못하고 있다(Kielkowska & Adamus 2010).

따라서 본 연구에서는 당근의 약으로부터 직접 또는 간접 배형성 단계, 배로부터 식물체 전환 단계, 그리고 재생 식물체의 기외 활착 및 재배 단계에 적용되는 배지조성, 광도, 온도 등의 적정 조건을 구명하고자 하였으며, 이를 통하여 체계적이고 안정적인 당근 약배양을 통한 식물체 재생 체계를 확립하여 품종 개발에 활용할 수 있는 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

공시재료

본 실험에서는 ‘영농조합법인 씨앗과사람들’로부터 공급받은 유전형 ‘S&P2342’를 공시재료로 사용하여 수행하였다.

당근은 8월 상순에 파종 후 11월 말까지 노지에서 재배하여 수확한 것으로, 비대한 뿌리에 줄기 상부가 3 cm 정도 포

함되도록 절단한 다음 모래가 담긴 화분에 식재하여 저온저장을 실시하였다. 4℃의 저온저장고에 30일간 저장한 후 원예용 상토(뚝섬이, ㈜농우바이오)가 담긴 화분(22.5 × 21.5 cm)에 1개체씩 식재하여 온실에서 3월부터 5월까지 고온장일의 조건으로 추대(Fig. 1a)를 유도하였다. 온실의 온도는 주간온도 20-25℃, 야간 온도 10-12℃로 조절하였으며, 일장은 14-18시간이 되도록 제어하였다.

약으로부터 배형성 및 캘러스 형성

추대 식물체의 화기가 개화하기 이전(Fig. 1b)에 육안으로 관찰하여 소화의 크기가 0.7-1.2 mm에 해당하는 소산형화(Fig. 1c)를 재료로 사용하였다. 약배양에 적합한 소포자의 발달단계인 1핵기 중기에 해당하는 크기의 소화를 포함하는 소산형화를 선별하였다. 소산형화를 70% 에탄올에 3분간 소독 후 멸균수로 3회 세척한 다음, clean bench에서 실험현미경을 이용하여 소화(Fig. 1d)로부터 약을 분리하여(Fig. 1e) 약배양 배지에 치상하였다. 약배양 배지는 MS 염류(Murashige & Skoog 1962), B5 비타민(Gamborg et al. 1968), 글루타민 500 mg/L, 세린 100 mg/L, 자당 100 g/L, 한천 6.5 g/L을 첨가한 배지를 기본 배지로 사용하였으며, 약배양에 적합한 생장조절제 농도를 알아보기 위하여 2,4-D와 NAA를 각각 0.1 mg/L 또는 1.0 mg/L 단독 또는 조합한 6개 처리를 실시하였다.

모든 처리에서 50 ml의 약배양 배지가 담긴 페트리디쉬(100 × 40 mm)에 20개의 약을 치상한 것을 1반복으로 하여, 처리당 5반복하였다. 배지에 치상한 약은 27℃ 암조건에서 배양하였으며 배가 형성될 때까지 새로운 배지로 옮기지 않았다. 배양 6주 이후부터 18주까지 2주마다 배형성 또는 캘러스 형성 여부를 현미경 관찰을 통해 조사하였다.

약배양 유래 배와 캘러스로부터의 식물체 재생

약배양 배지에서 약으로부터 발생한 배 가운데 1 mm 이상 발달한 것을 분리하여 동일 조성의 배지에 옮긴 다음 27℃, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 명배양 조건에서 2주간 배양하였다. 이어서 배를 식물체 재생배지(MS 염류, B5 비타민, 자당 20 g/L, 한천 6.5 g/L)로 옮겨 16/8 광주기, 20℃에서 식물체로의 전환을 유도하였다. 8주마다 동일 조성의 신선한 배지로 계대배양 하였으며 4주마다 2차배의 형성 및 발아, 2차배의 식물체 전환 여부를 조사하였다.

약배양 배지에서 약으로부터 유도된 캘러스는 0.5 cm² 이

상 되었을 때 분리한 다음, 재생배지로 옮겨 배의 형성과 형성된 배로부터 식물체로의 전환을 유도하였다. 재생배지로 옮긴 캘러스는 8주마다 계대배양 하였고 4주마다 1차배의 형성, 2차배의 형성 및 발아, 2차배로부터의 식물체 전환 여부를 조사하였다. 배가 발아하여 자엽과 뿌리가 전개되고 1.0 cm 이상에 달하는 소식물체가 형성되었을 때 식물체로 전환되었다고 판단하였으며 이것을 식물체 재생으로 간주하였다.

약배양 유래 소식물체의 기내 성장

약배양 유래 기내 소식물체의 기내 성장에 적합한 광도를 알아보고자, 광도를 4단계로 구분하여 기내 식물체를 배양하였다. 약배양을 통해 재생된 소식물체를 4주간 배양하여 본엽 2매 이상, 길이 2-4 cm로 성장한 소식물체(Fig. 1p-q)를 재료로 사용하였다. 광도 처리는 성장상을 이용하여 10, 30, 100, 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 4단계로 분류하여 실시하였다.

기내 소식물체는 50 ml의 재생배지가 담긴 페트리디쉬(100 × 40 mm)에 10개체씩 치상한 것을 1반복으로 하여, 처리당 3반복 실시하였다. 성장상에서 16/8 광주기 조건하에 20°C에서 3주 동안 배양하였으며, 3주 후 생존율과 성장상태를 조사하였다. 소식물체의 성장상태는 육안으로 판단하여 매우 양호, 양호, 보통, 미흡, 불량 5단계로 구분하였다.

약배양 유래 소식물체의 기외 활착

약배양 유래 소식물체의 활착에 적합한 온도와 광도조건을 구명하고자, 기외조건에서 소식물체를 온도 및 광도를 달리하여 재배하면서 활착을 유도하였다. 식물재료는 약배양 유래의 소식물체 가운데 본엽 4매 이상, 초장 5 cm 이상인 소식물체(Fig. 1r)를 선별하여 실험에 사용하였다. 소식물체를 배양용기에서 꺼내어 물에 세척한 후 원예용 상토가 담긴 육묘판(72 구 plug tray 3.5 × 3.5 cm)에 이식한 다음 플라스틱 용기(다용도 재배용기 32.5 × 22.5 × 14.0 cm, 아시아종묘) 안에서 활착을 유도하였다. 육묘판 24개의 구(4 × 6개)에 각각 1개씩의 소식물체를 식재하여 1개의 플라스틱 용기 안에 넣은 것을 1개의 처리구로 사용하였다.

활착 기간 중 온도는 광도를 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 로 조절된 3개의 성장상을 이용하여 15, 20, 25°C로 제어하여 3개 처리구를 두었다. 광도처리는 20, 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 3개 처리구로 구분하였고, 기본 온도를 20°C로 하여 실시하였다. 모든 온도 및 광도 처리에서 성장상은 상대습도 70-80%를 유지하였다. 기외 활착 2주 후 활착율과 식물체의 성장상태를

조사하였는데, 기외 식물체의 성장상태는 육안으로 판단하여 매우 양호, 양호, 보통, 미흡, 불량 5단계로 구분하였다.

결과 및 고찰

당근의 약배양으로부터 캘러스 및 배 형성

당근 유전형 'S&P2342'의 소화로부터 약배양 적기에 해당하는 약을 분리한 후 2,4-D와 NAA의 농도를 달리한 6가지 배지에 약을 치상하여 약으로부터 배 형성 및 캘러스 형성에 효율적인 적정 농도를 알아보고자 배양하였다. 배양 6주 후부터 약으로부터 각각 배 또는 캘러스가 발생하였으며(Fig. 1f-g, k-l), 1개의 약에서 배와 캘러스가 동시에 형성되는 경우도 있었다. 배양 18주 후 반응을 조사한 결과, 성장조절제 농도에 따라 약으로부터의 캘러스 형성과 배형성에 상당한 차이를 보여주었다. 약으로부터 배형성은 2,4-D 0.1 mg/L + NAA 1.0 mg/L 처리구에서 가장 양호하였는데, 배 형성을 2.0%, 반응을 나타낸 약 당 3.5개의 배가 형성되었다(Table 1). 다음으로 2,4-D 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L 처리구 및 2,4-D 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 처리구에서 배형성을 모두 2.0%이었으며, 2.3개와 2.5개의 배가 각각 형성되었다. 캘러스 형성율이 높았던 성장조절제 처리는 2,4-D 1.0 mg/L 단독처리 및 2,4-D 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 처리구로 각각 28.0%, 22.0%의 형성율을 나타내었다. 배형성과 캘러스 형성이 동시에 높은 처리구는 2,4-D 1.0 mg/L에 NAA 0.1 mg/L를 조합한 처리구로서 캘러스 형성율이 22.0%, 배 형성율이 2.0%를 나타내었다.

Andersen et al. (1990)은 당근의 약배양에서 식물생장조절제 2,4-D와 NAA를 조합하여 사용하였는데, B5 배지에 2,4-D와 NAA를 각각 0.1 mg/L씩 조합하여 2개의 품종에서 캘러스와 배의 형성율을 합하여 0.8%라고 하였고, Gorecka et al. (2005)은 Andersen et al. (1990)과 동일조성의 배지를 사용하여 0.2-1.3%의 배를 유도하였으나 캘러스 형성에 관여는 언급하지 않았다. 본 실험에서는 2,4-D 1.0 mg/L에 NAA 0.1 mg/L 조합 처리구에서 배형성이 2.0%로서 가장 높으면서도 캘러스 형성율이 20% 이상으로 나타나 유전형 'S&P2342'의 캘러스와 배를 동시에 유도할 수 있는 효율적인 조합임을 알 수 있었다.

약배양 유래 배 및 캘러스로부터의 식물체 재생

당근의 약배양을 통해 유도된 1차배 및 캘러스를 분리하여

(Fig. 1h, m) 식물생장조절제가 포함되지 않은 식물체 재생배지(MS 염류, B5 비타민, 자당 20 g/L, 한천 6.5 g/L)에서 각각 배양하였다. 1차배는 배양 4주 후부터 발아하기 시작하여 자엽과 하배축이 발달하다가 생장이 정지한 다음, 주로 1차배의 자엽과 유근 부위에서 2차배가 발생하였다. 1차배 가운데 62.5%에서 2차배가 발생하였는데, 1개의 1차배로부터 다수의 2차배가 형성되었다(Table 2, Fig. 1n-o). 2차배는 발아과정을 거쳐 자엽과 뿌리가 발달되면서 식물체로 재생되었으며(Fig. 1p), 재생된 식물체는 이로부터 4주 후에 본엽을 육안으로 관찰할 수 있는 소식물체로 발달하였다(Fig. 1q). 1차배를 배양한 지 8주 후에는 81.3%의 1차배에서 2차배가 형성되었

고, 62.5%가 식물체로 전환되었다. Gorecka et al. (2009)는 1개 품종을 사용하여 2차배 형성에 적합한 배지조성을 비교한 실험에서 식물생장조절제를 첨가하지 않은 B5 배지에서 식물체 재생이 4주차에 0%, 8주차에 40%, 12주차에 100%를 나타내었으며 MS배지에서는 4주와 8주 후에 0% 이었다가 12주 후에 식물체가 100% 재생되었다고 보고하였다. 이와 비교해 볼 때 본 연구에서는 약배양 유래 1차배로부터 8주 후 60%를 상회하는 식물체가 재생되어 빠른 반응이 이루어진 것을 알 수 있었다. 당근의 약배양에서 식물체 재생을 위해 식물생장조절제를 첨가하지 않은 MS배지(Hu et al. 1993, Matsubara et al. 1995, Yoo 2010) 또는 B5 배지(Andersen

Fig. 1. Embryogenesis and plant regeneration in anther culture of carrot. *Plant material for anther culture:* (a) A bolted plant, (b) Primary umbel, (c) Umbellets from primary umbel, (d) A bud from umbellet, (e) An anther used in anther culture. *Indirect embryogenesis via callus formation from anther culture:* (f-g) Callus formed from an anther, (h) Callus proliferation, (i) Primary embryos formed from callus, (j) Development of primary embryo with secondary embryos. *Direct embryogenesis and plant regeneration:* (k-n) Primary embryos formation and germination, (o) Secondary embryo formation from the primary embryo, (p-r) Secondary embryo germination and plant regeneration. *Acclimatization and cultivation of regenerated plant:* (s) Acclimatized plant growing in soil, (t) A plant with elongated floral stem internode after vernalization. Bars in a, s and t = 10 cm; b, f, j, k and n-r = 10 mm; c-e, g-i and l-m = 1 mm.

et al. 1990, Cho et al. 1993)가 사용되었는데, 본 연구에서도 약배양 유래 1차배로부터의 식물체 재생에는 식물생장조절제를 첨가하지 않은 기본 배지가 효과적이었다.

약으로부터 형성된 캘러스를 분리하여 식물체 재생배지에

치상하여 간접 배형성 및 식물체 재생을 유도하기 위하여 실험을 수행하였는데, 배양 초기 캘러스가 증식하다가 4주 후 67.3%의 캘러스로부터 1차배가 형성되었고(Table 3, Fig. 1i), 34.7%의 캘러스에서 1차배형성을 거쳐 2차배가 형성되

Table 1. Effects of 2,4-D and NAA on the callus and embryo induction from anther culture in carrot.

2,4-D (mg/L)	NAA (mg/L)	Culture periods											
		6 weeks				12 weeks				18 weeks			
		Callus		Embryo		Callus		Embryo		Callus		Embryo	
		Callus formation (%)	No. of calli/ anther	Embryo formation (%)	No. of embryos/ anther	Callus formation (%)	No. of calli/ anther	Embryo formation (%)	No. of embryos/ anther	Callus formation (%)	No. of calli/ anther	Embryo formation (%)	No. of embryos/ anther
0.1	-	-	-	1.0	1.0	1.0	2.0	1.0	2.0	2.0	1.5	1.0	2.0
0.1	0.1	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	1.0	2.0	1.5	3.0	1.3	2.0	2.5
0.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	5.0	5.0	1.6	2.0	3.5
1.0	-	7.0	1.0	-	-	17.0	1.4	1.0	1.0	28.0	1.5	1.0	1.0
1.0	0.1	5.0	1.2	-	-	14.0	1.9	2.0	1.5	22.0	1.7	2.0	2.5
1.0	1.0	3.0	1.0	-	-	9.0	1.9	-	-	9.0	2.2	-	-

Table 2. Embryo germination and plant conversion from embryos derived from anther culture in carrot.

No. of inoculated primary embryo	No. of primary embryos with secondary embryo	Secondary embryo formation (%)	No. of primary embryos with secondary embryo germinated	Germination of secondary embryo (%)	No. of primary embryos with secondary embryo conversion	Plant conversion from secondary embryo (%)
<i>4 weeks in culture</i>						
16	10	62.5	6	37.5	3	18.8
<i>8 weeks in culture</i>						
	13	81.3	13	81.3	10	62.5

Table 3. Embryo formation and plant conversion from calli derived from anther culture in carrot.

No. of inoculated calli	No. of calli with primary embryos	Primary embryo formation (%)	No. of calli with secondary embryos	Secondary embryo formation (%)	No. of calli with secondary embryos germinated	Germination of secondary embryo (%)	No. of calli with secondary embryos conversion	Plant conversion from secondary embryo (%)
<i>4 weeks in culture</i>								
49	33	67.3	17	34.7	15	30.6	4	8.2
<i>8 weeks in culture</i>								
	46	93.9	25	51.0	23	46.9	19	38.8

었으며, 8.2%에서 2차배가 발아하여 식물체로 발달하였다 (Fig. 1j). 배양 8주 후에는 93.9%의 캘러스로부터 1차배가 형성되었고, 51.1%에서 2차배가 발생하였으며, 38.8%의 캘러스에서 2차배가 발아를 거쳐 식물체로 전환되었다(Table 3). 4주차와 8주차의 재생율은 각각 직접 배로부터의 식물체 재생율에 비해 약 50% 낮게 나타났다.

약으로부터 형성된 직접 배나 캘러스 단계를 거쳐 형성된 간접 배 가운데 일부는 2차 배 형성까지 시간이 상당히 소요되거나 2차배의 형성이 원활하게 이루어지지 못하였으며 식물체 전환이 이루어지지 않았다. Flehinghaus et al. (1991)은 호밀의 약배양에서 가장 큰 문제점을 매우 낮은 재생율이라고 하였는데, 배지조성의 변경이나 약배양 후의 저온처리를 통해 개선하였다고 보고한 바 있으며, 당근의 약배양에서도 배로부터의 식물체 재생 효율을 높이기 위해서는 다양한 배지 조성 및 환경 조건 처리가 필요할 것이라 판단된다.

약배양 유래 재생 식물체의 기내 성장

약배양으로부터 재생된 소식물체의 기내 성장을 유도하여 건전한 기내 묘를 생산하고자 실시한 4단계 광도처리에서 처리 3주 후 소식물체의 생존율과 성장상태는 광도에 따라 상당한 차이를 보여주었다. 모든 처리구에서 생존율은 100%이었지만, 소식물체의 성장상태는 ‘매우 양호’를 5로 나타내었을 때, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 조건하에서 4.5로 가장 양호하였다(Table 4). 식물체들은 기외 활착에도 적합할 정도로 생장이 왕성하였고 처리 전과 비교하였을 때 식물체의 길이는 약 7-8배 신장하였으며, 특히 본엽의 생장이 두드러졌다(Fig. 2). $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 처리구에서는 식물체들이 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 처리구와 비슷하게 신장하였고 본엽이 가장 넓게 전개되어 생장이 가장 왕성해 보였으나, 엽병 부위가 일부 갈변되고 마르는 모습이 관찰되어 높은 광도로 인한 피해가 발생한 것이라 판단되었다. $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 처리구 식물체들은 줄기부분이 약하고 초장은 처리 전에 비해 2-3배 정도 신장에 머물렀다. 10

Fig. 2. Appearances of in vitro grown plantlets cultured under the different light intensity for 3 weeks in carrot.

Table 4. Effects of light intensity on the in vitro growth of plantlets obtained from the anther culture of carrot.

Light intensity ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	Survival rate (%)	Plant growth ^z
10	100	2.8 ± 0.1^y
30	100	3.3 ± 0.1
100	100	4.5 ± 0.1
150	100	4.2 ± 0.3

^zVisual assessment of plant growth: 1, poor; 2, insufficient; 3, average; 4, good; 5, excellent

^yMean $\pm$ SE

$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 처리구에서는 식물체들의 줄기가 도장하였고 엽색이 처리 전 보다 옅어지는 경향을 나타내어 생장이 전체적으로 미흡하였다. 당근에서의 약배양 유래 기내식물체의 생장에 적합한 광도 구명에 대한 연구는 현재까지 보고된 바 없는데, 본 연구의 결과를 볼 때 당근의 약배양 유래 소식물체의 기내 생장을 위해서는 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 광도가 적합할 것으로 판단된다.

약배양 유래 소식물체의 기외 활착

당근의 약배양 유래 식물체의 활착에 대한 보고는 Cho et al. (2003)이 배양토 구성에 따른 활착율을 보고한 것과 Gorecka et al. (2009)이 활착 시 20°C 에서 70%까지 생존하였다는 보고가 있으나, 온도나 광도의 조건을 달리하여 기외 순화의 효율을 높이기 위한 연구는 이루어진 바 없었다. 본 연구에서는 기내 소식물체를 꺼내어 상토에 이식한 다음 효과적인 활착 조건을 알아보고자 온도와 광도를 각각 달리한 조건에서 2주간 활착을 유도하였다. 식물체의 활착율과 식물체의 성장상태를 조사한 결과, 온도 처리와 광도 처리에 따라 활착 효율에 상당한 차이를 보여주었다. 온도처리에서는 15°C 처리구에서 활착율이 79.2%, 성장상태가 3.7로서 가장 양호하였다. 그 다음이 20°C 처리구로 75.0%의 활착률과 3.5의 성장상태를 나타내었으며, 25°C 처리구는 활착율이 75%로 20°C 처리구와

같았지만 성장상태가 3.1로 낮게 나타났다(Table 5). 식물체의 모습을 보았을 때, 15°C 처리구의 식물체는 엽병이 곧고 튼튼하였으며 다수의 식물체가 왕성한 생장을 보여주었으나, 25°C 처리구에서는 엽병이 약해 휘어져 있는 개체가 많았다(Fig. 3).

광도 처리에서는 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 처리구에서 70.8%의 활착율과 3.5의 성장상태를 나타내어 가장 양호한 반응을 나타내었다. $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 처리구는 활착율이 56.3%로 다소 낮았으며, $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 처리구에서는 25.0%로 매우 저조하였다(Table 6). 식물체의 성장상태는 지상부의 생장이 왕성하였던 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 처리구를 제외한 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 이하의 광도처리에서 생장이 전반적으로 저조하였다(Fig. 4). 이로 보아 당근의 기내 식물체의 활착을 위해서는 온도 15°C , 광도 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 로 유지하면 높은 활착율과 왕성한 식물체의 생장을 유도할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

성공적으로 활착된 식물체는 육묘판에서 꺼내어 화분으로 이식한 후 온실로 옮겨 재배하였는데, 약 1주일후에는 외부 환경에 적응하여 정상적으로 성장하는 모습을 보여주었다(Fig. 1s). 온실에서의 재배를 통하여 식물체로부터 근부 생장이 이루어진 후, 저온 처리를 실시하였을 때 정상적으로 추대가 이루어졌다(Fig. 1t).

Fig. 3. Appearances of acclimatized plants cultured on the different temperature for 2 weeks in carrot.

Table 5. Effects of temperature on the acclimatization of plants obtained from the anther culture of carrot.

Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Acclimatization (%)	Plant growth ^z
15	79.2	3.7 ± 0.4^y
20	75.0	3.4 ± 0.4
25	75.0	3.1 ± 0.3

^zVisual assessment of plant growth: 1, poor; 2, insufficient; 3, average; 4, good; 5, excellent

^yMean $\pm$ SE

약배양으로부터 직접 및 간접 배형성을 통한 식물체 재생

적 요

본 연구에서 당근의 약배양으로부터 식물체 재생을 거쳐 재배까지의 과정은 3단계로 구분하여 이루어졌다. 1단계는 약배양을 통한 직접 또는 간접 1차배의 유도단계, 2단계는 1차배로부터의 2차배 유도와 식물체로의 전환단계, 3단계는 재생 식물체의 기외 활착과 재배단계이다. 1단계의 배 유도는 약으로부터 1차배가 형성되는 직접 배형성 경로와 캘러스를 거쳐 배가 형성되는 간접 배형성 경로의 2가지 경로를 통하여 이루어졌다. 2단계의 식물체 전환은 직접 또는 간접 형성된 1차배로부터 2차배의 형성을 거쳐 이루어졌다. 약배양으로부터 배형성 과정을 거쳐 식물체로 전환되기까지는 24-32주가 소요되었다. 3단계의 식물체의 기외 활착과 재배에서는 기내 소식물체의 생장 유도를 거쳐 소식물체의 활착과 식물체의 온실 재배가 이루어졌으며, 이 과정에 10주가 소요되었다. 즉, 약배양을 시작한 다음 약 8-10개월 후에는 식물체를 온실로 옮겨 재배할 수 있었다. 이와 같이 본 연구를 통하여 당근에서의 약배양으로부터 직접 및 간접 배형성을 통한 식물체 재생을 위한 적정 조건을 밝혔고, 재생된 식물체의 활착을 위한 기내 및 기외 식물체의 적정 광도 및 온도 조건을 구명하여 안정적인 식물체 생산을 위한 시스템을 구축하였다. 향후 당근의 F₁ 잡종 생산을 위한 순수 동형접합성 유지계통 및 화분친 모본계통의 획득에 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

당근의 약배양을 통한 효율적 식물체 재생 시스템을 확립하고자 실험을 수행하였다. 당근 유전형 'S&P2342'의 약을 2,4-D와 NAA를 각각 0.1 mg/L 또는 1.0 mg/L 단독 또는 조합 처리한 배지에 치상하여 암조건에서 18주간 배양하였을 때, 2,4-D 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 조합처리에서 캘러스 형성을 22.0%, 배형성을 2.0%로 반응이 가장 좋았다. 약으로부터 직접적으로 유도된 1차배를 분리하여 명조건에서 2주간 배양 후 재생배지로 옮겨 배양하였을 때 배양 4주 후부터 발아하다가 생장이 멈추어진 1차배로부터 다수의 2차배가 형성되기 시작하였다. 배양 8주 후 62.5%가 식물체로 전환되었으며, 12주 후 본엽이 전개된 소식물체로 발달하였다. 또한 약으로부터 유도된 캘러스를 분리하여 재생배지에서 배양하였는데, 8주 후 93.9%의 캘러스로부터 1차배가 형성되었으며, 38.8%에서 1차배로부터 2차배 형성을 거쳐 식물체로 전환되었다. 약배양 유래 소식물체(본엽 2매 이상, 초장 2-4 cm)의 건전한 기내 생장을 유도하기 위해 실시한 광도(10, 30, 100, 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 처리에서 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 이 소식물체의 생장에 가장 효과적이었다. 소식물체의 효율적인 기외 활착을 위하여 본엽 4매 이상, 초장 5 cm 이상의 소식물체를 플러그 트레이에 이식 후 플라스틱 재배용기 안에 넣은 다음 온도

Fig. 4. Appearances of acclimatized plants cultured under the different light intensity for 2 weeks in carrot.

Table 6. Effects of light intensity on the acclimatization of plants obtained from the anther culture of carrot.

Light intensity ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	Acclimatization (%)	Plant growth ^z
20	25.0	2.0 $\pm$ 0.2 ^y
50	56.3	2.9 $\pm$ 0.3
100	70.8	3.5 $\pm$ 0.4

^zVisual assessment of plant growth: 1, poor; 2, insufficient; 3, average; 4, good; 5, excellent

^yMean $\pm$ SE

(15, 20, 25℃)와 광도($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 처리를 각각 2주간에 걸쳐 실시하였는데, 온도 처리에서는 15℃가 기외 활착에 가장 적합하였으며, 광도 처리에서는 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 처리구만 기외 활착이 원활하였다. 결론적으로 당근의 약배양으로부터 직접 배형성 또는 캘러스 단계를 거치는 간접 배형성이 이루어졌으며, 1차배로부터 2차배가 형성된 후 발아를 거쳐 소식 물체가 재생되었으며 이를 성공적으로 활착시켜 정상적인 식물체를 얻을 수 있었다. 본 연구를 통하여 당근에서의 약배양으로부터 직접 및 간접 배형성을 통한 식물체 재생 시스템을 구축하였으며, 향후 당근의 F₁ 잡종 생산을 위한 순수 동형접합성 유지계통 및 화분친 모본계통의 획득에 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 농림수산식품부 생명산업기술개발사업(관리번호 : 112025-4)에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- Alessandro MS, Galmarini CR. 2007. Inheritance of vernalization requirement in carrot. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 132: 525-529.
- Andersen SB, Christiansen I, Farestveit B. 1990. Carrot (*Daucus carota* L.): In vitro production of haploids and field trials. In: Bajaj YPS (ed.), Biotechnology in agriculture and forestry, Vol 12. Haploids in crop improvement I. Springer, Berlin. pp. 393-402.
- Cho MS, Juang UD, Park SG, Park Y. 2003. Regeneration and acclimatization of plants derived from anther cultures in carrot (*Daucus carota* L.). Korean J. Plant Biotechnol. 30: 47-52.
- Flehinghaus T, Deimling S, Geiger HH. 1991. Methodical improvements in rye anther culture. Plant Cell Rep. 10: 397-400.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. Exp. Cell Res. 50: 151-158.
- Gorecka K, Krzyzanowska D, Gorecki R. 2005. The influence of several factors on the efficiency of androgenesis in carrot. J. Appl. Genet. 46: 265-269.
- Gorecka K, Krzyzanowska D, Kiszczak W, Kowalska U. 2009. Plant regeneration from carrot (*Daucus carota* L.) anther culture derived embryos. Acta Physiol. Plant. 31: 1139-1145.
- Hu KL, Matsubara S, Murakami K. 1993. Haploid plant production by anther culture in carrot (*Daucus carota* L.). J. Japan. Soc. Hortic. Sci. 62: 561-565.
- Kielkowska A, Adamus A. 2010. In vitro culture of unfertilized ovules in carrot (*Daucus carota* L.). Plant Cell Tissue Organ Cult. 102: 309-319.
- Kim YS. 2009. Development of carrot F₁ hybrid varieties having high-yield and late-bolting qualities. Ph.D Thesis. Daegu Univ., Korea
- Kiszczak W, Krzyzanowska D, Strycharczuk K, Kowalska U, Wolko B, Gorecka K. 2011. Determination of ploidy and homozygosity of carrot plants obtained from anther cultures. Acta Physiol. Plant. 33: 401-407.
- Luitel BP, Adhikari PB, Shrestha SL, Kang WH. 2012. Morphological characterization of anther derived plants in mini paprika (*Capsicum annuum* L.). Korean J. Breed. Sci. 44: 450-461.
- Maraschin SF, De Priester W, Spalink HP, Wang M. 2005. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. J. Exp. Bot. 56: 1711-1726.
- Matsubara S, Dohya N, Murakami K, Nishio T, Dore C. 1995. Callus formation and regeneration of adventitious embryos from carrot, fennel and mitsuba microspores by anther and isolated microspore cultures. Acta Hortic. 392: 129-137.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Simon PW. 2000. Domestication, historical development, and modern breeding of carrot. In: Janick J (ed.), Plant breeding reviews, Vol. 19. John Wiley & Sons, Inc., Oxford. pp. 157-189.
- Stein M, Nothnagel T. 1995. Some remarks on carrot breeding (*Daucus carota sativus* Hoffm.). Plant Breed. 114: 1-11.
- Wang M, Bergen S, Duijn BV. 2000. Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. Plant Physiol. 124: 523-530.
- Wehner TC. 1999. Heterosis in vegetable crops. In: Coors JG, Pandey S. (eds.), The genetics and exploitation of heterosis in crops. Am. Soc. Agron., Madison, WI. pp. 387-397.
- Yoo KG. 2010. Breeding male sterile lines through anther culture in carrot (*Daucus carota* L.). Ph.D Thesis. Chungbuk National Univ., Korea.