

당귀 배양 세포자의 Flow Cytometric 특성

박충현*·성낙술*·유홍섭*·피터폴스**

Characterization of Cultured *Angelica gigas* Microspores by Flow Cytometry

Chung Heon Park*, Nak Sul Seong*, Hong Seob Yu* and K. Peter Pauls**

ABSTRACT : To characterize active cells during microspore culture of *Angelica gigas*, flow cytometric and epifluorescent techniques were applied. The knowledge obtained from these types of studies will give us insight into early stage in plant development and may lead to the application of microspore-derived from haploid plants for breeding in recalcitrant species. Viability of cultured microspore differed depending on the developmental stages. Frequencies of active cells from tetrad, uni-nucleate, bi-nucleate and matured pollen were 12.8, 49.3, 42.3 and 31.7%, respectively. Alive microspores have luminescent the green fluorescence stained with FDA and blue fluorescence stained with DAPI.

Key words : Microspore culture, *Angelica gigas*, Flow Cytometry

緒 言

산형과 (Umbelliferae) 에 속하는 당귀 (*Angelica gigas*) 는 다년생 초본 식물로 뿌리에 decursin, coumarin 등의 성분을 함유하고 있고, 진통, 진정 및 항균작용이 있어 한방의 중요 생약재로 널리 사용되고 있다.

한약 수요 증가에 따라 1996년 당귀의 국내 재배 면적은 1,624ha에 이르렀으며 3,749M/T 정도를 생산하였다.

우리나라에서의 당귀는 참당귀 (*Angelica gigas*) 의 뿌리를 기원으로 하고 있으나 중국에서는 당귀 (*Angelica sinensis*) 를 그리고 일본은 일당귀

(*Angelica acutiloba*) 를 재배하고 있다.

재배 당귀는 8월경 꽃대가 출현하여 개화결실하는데 한 번 추대되면 뿌리가 목질화되고 왜소화되어 수량 감소 및 품질 저하의 주요인으로 작용하고 있다. 교잡 육종법에 소요되는 품종 육성 기간과 노력을 절감하기 위해 근래 세포자배양, 화분배양 및 약배양 기술이 이용되고 있다. 벼, 유채, 보리 등 많은 작물에서는 세포자 배양법이 가장 간편하며 반수체 유기율이 높을뿐 아니라 특정 우수형질을 조기에 고정하는 육종기술로 실용화되고 있다.^{1,6,10}

세포자 배양은 세포자가 생식세포와 영양세포로 분화되지 않고 첫 분열이 균등하게 정상 분열하는 상태로 전환되어 캘러스 단계를 거치지 않고 직접 배로 발달되며, 거의 모두 반수체가 되기 때문에

* 농촌진흥청 작물시험장 (National Crop Experiment Station, R. D. A. Suwon, 441 - 100, Korea)

** 캐나다 겔프대학교 (Dept. of Crop Science, University of Guelph, Guelph, ontario N1G2W1, Canada)

< '97. 6. 18 접수 >

이용면에서 유리하다고 평가된다.^{2,3,5,8)}

당귀의 내추대성 우량품종 육성에도 선발계통으로부터 약배양이나 소포자배양을 통한 반수체 식물의 획득이 필요하다. 최근 Pauls 등¹¹⁾이 유체의 소포자 배양에서 배상체 유래의 반수성 식물체를 90% 이상 얻었다는 보고가 있어^{11,12,13)} 당귀에서도 반수성 식물체 획득의 효율 향상을 위한 기술의 일환으로 소포자 배양법이 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

종양세포 식별과 태아의 성감별 등의 의학용 장비로 이용되어온 Flow Cytometry는 최근 식물 연구에도 광범위하게 적용되고 있으며, 배양소포자의 성장과 활력 측정, 세포 주기와 핵 DNA 함량 분석, 2차 대사산물의 추적 정도 측정 및 원형질 융합체의 판별과 특성 조사 등의 연구에 광범위하게 이용되고 있다.^{4,11)}

본 연구에서는 당귀 반수체 육성의 기초 자료를 얻고자 소포자 배양시 소포자 발육시기에 따른 소

포자 활력과 특성을 Flow Cytometry를 이용하여 조사해 보고자 하였다.

재료 및 방법

실험에 사용한 공시 재료는 작물시험장 약용작물 시험포장에 재배되고 있는 당귀 (*Angelica gigas*)의 화퇴를 1995년 4월 10일경부터 5월 20일까지 채취하여 사용하였다.

소포자의 발육 단계별 배양 반응을 검토하고자 화퇴의 크기와 색깔을 구분하여 1% iron acetocarmine으로 염색 검경하여 4분자기, 1핵성 소포자기 및 2핵성 소포자기 그리고 성숙 화분으로 구분하여 치상하였다. (그림 1)

실험은 캐나다 겔프대학교 농과대학 분자생물학 연구실의 표준실험법⁴⁾에 의하여 수행하였으며, 방법은 다음과 같다.

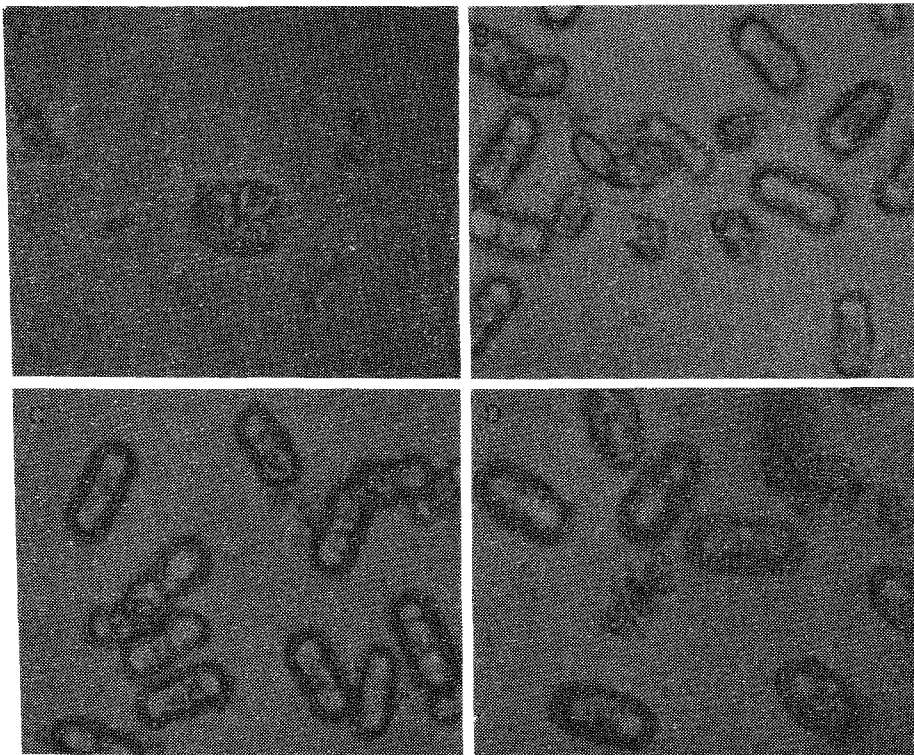


Fig. 1. Developmental stage of *A. gigas* microspore.

(a) tetrad (b) uni-nucleate (c) bi-nucleate (d) matured

당귀 화뢰의 표면소독은 5.6% sodium hypochlorite액에 10분간 침적, 소독한 후 멸균수로 3회 세척하여 사용하였고, 소포자의 분리는 화뢰를 소형 믹서에서 20초간 마쇄한 후 이중 나이론 필터(Nytex 63 μ m 상층, 44 μ m 하층)에 여과하였다. 소포자의 수세는 B5 세척배지로 900rpm에 5분씩 4회씩 하였고, 배양 밀도는 haemocytometer를 이용하여 NLN배지에 80,000 microspores/ml씩 조정하여 30 $^{\circ}$ C의 암실에서 20rpm으로 저속 진탕배양하였다.

Flow Cytometry (Coulter製)를 이용한 배양 소포자의 특성 조사는 배양 후 48시간 간격으로 시료를 채취하고 FDA에 5분간 형광염색하여 대조구와 함께 소포자의 활력을 비교하였다.

결과 및 고찰

당귀 소포자 배양에서 치상 적기의 소포자 발달

단계를 구명하고자 약의 발육 단계를 4분자기, 1핵성 소포자기, 2핵성 소포자기 및 성숙 화분의 4단계로 분류 (Fig. 1) 하여 치상하고 소포자의 활력을 측정 한 결과는 표 1과 같다.

배양 소포자의 활력은 발달 단계에 따라 차이를 보였는데 4분자기의 소포자에서 가장 낮아 배양 4일 후 12.8%, 20일경에는 7.4%의 활력을 보였다.

Table 1. Change of cultured microspore viability according to the developmental stage in *A. gigas*.

Developmental stage (days)	Microspore viability (%)					
	0	1	4	6	8	20
Tetrad	27.9	11.3	12.8	12.6	11.7	7.4
Uni-nucleate microspore	35.6	46.2	49.3	50.1	53.9	37.7
Bi-nucleate microspore	22.0	33.3	42.3	45.8	49.3	51.4
Matured pollen	16.1	18.1	31.7	45.3	57.5	32.2

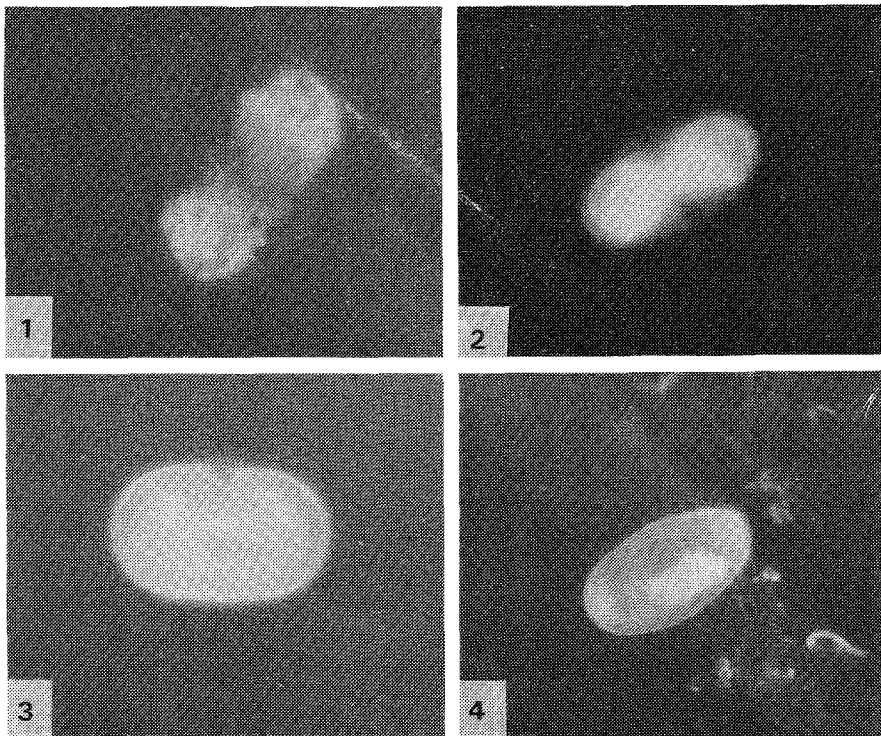


Fig. 2. Four days cultured microspore of *A. gigas* (400 \times) : large (1) and small (2) alive microspore stained with FDA (green color), large (3) and small (4) alive microspore stained with DAPI (blue color)

배양기간 중 소포자의 활력은 배양 8일째까지는 1핵성 소포자기에서 53.9%로 높은 반면 배양 20일 경에는 2핵성 소포자기 생존율이 51.4%로 가장 높게 나타났다. 동일배지에서 배양 20일이 되면서 소포자의 활력이 크게 감소하는 경향을 보였는데 이는 배양중에 계대배양과 배지개선이 필요한 것으로 생각되었다.

그림 2는 배양 4일후의 당귀 소포자를 채취하여 형광 현미경으로 관찰한 사진이다. 살아 활력이 있는 소포자는 FDA로 염색할 경우 크기가 크거나 작거나 모두 녹색 형광을 발하고 있으며(그림 2-1, 2), DAPI로 처리하였을 때는 청색의 형광을 띠고 있다(그림 2-3, 4). 그러나 활력이 없는 소포자는 전혀 형광을 띠지 않아 구분이 가능함을 알 수 있다.

그림 3은 배양 후 약 2주일경의 소포자의 모습으로 소수의 소포자는 분열을 거쳐 비대 성장하고 있음을 알 수 있으나, 대부분 크기의 변화를 보이지 않고 있었다. 그림 4는 당귀 소포자의 발육시기에 따른 Flow cytometry의 chromatogram으로 4분자기와 1핵성 초기의 소포자는 좀 치우친 구형이며 이와는 대조적으로 성숙화분의 경우 대칭인 오투

기 모습의 장타원형의 구조를 띠며(Fig 1) chromatogram의 차이를 보여주고 있다.

그림 5는 당귀 배양 소포자를 대조구와 함께 FDA로 염색하여 Flow cytometry에 주입하였을 때의 chromatogram으로 대조구인 경우 PMT과 PMT2에 전혀 나타나지 않지만 이와 대조적으로 FDA에 염색한 경우는 PMT1에 활력을 띤 소포자의 수와 PMT2에 대한 %가 peak B에 나타남을 보

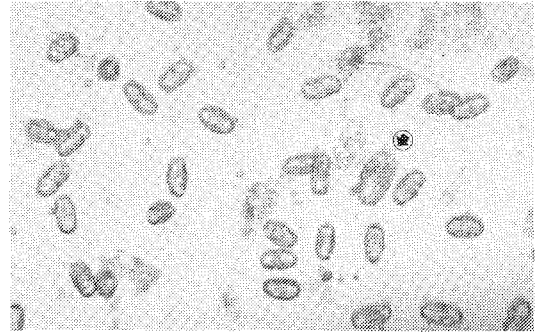


Fig. 3. Fourteen days cultured microspore of *A. gigas* (480 \times).

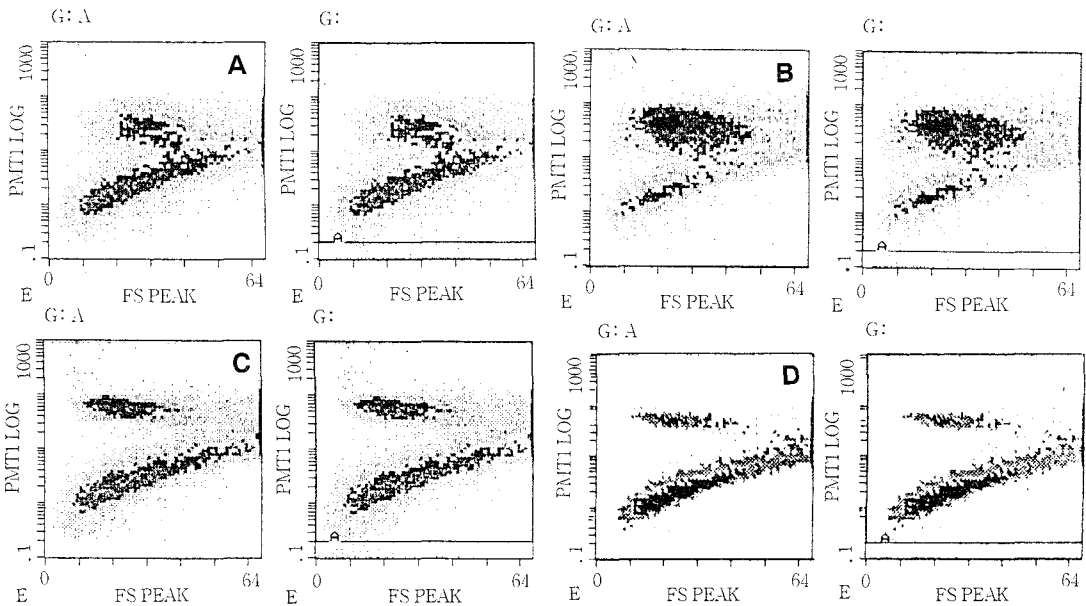


Fig. 4. Flow cytometric chromatogram of cultured microspore according to the development stage *A. gigas* tetrad.

(B) uni-nucleate, (C) bi-nucleate (D) matured pollen.

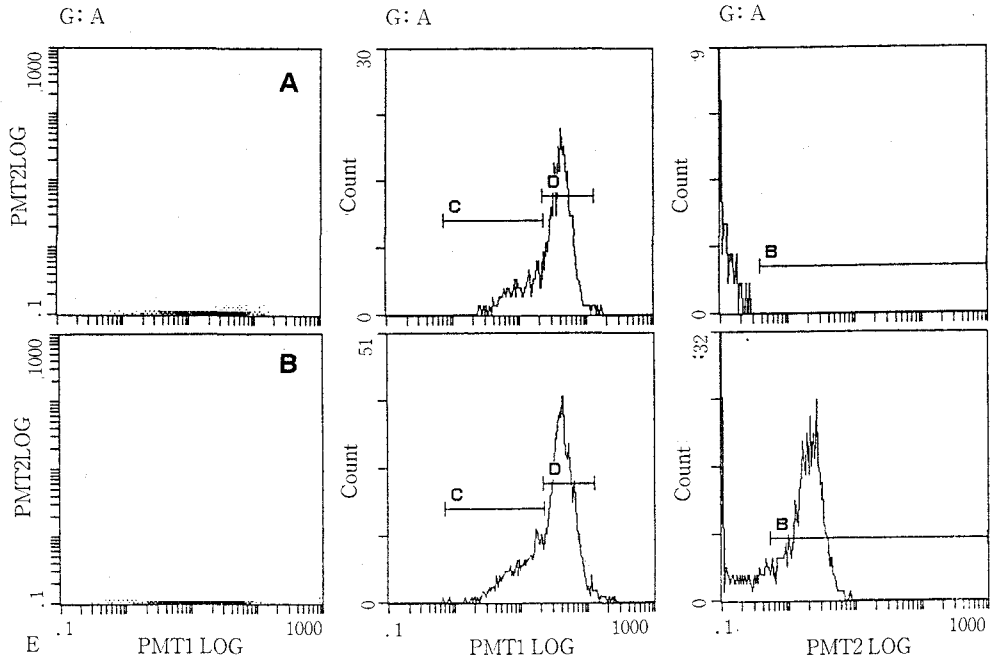


Fig. 5. Flow cytometric chromatogram of unstained (A) and FDA stained (B) cultured microspores of *A. gigas*.

여주고 있다.

처음으로 시도한 당귀 소포자 배양에서 microcolony와 캘러스 형성 식물체 분화 등의 결과는 얻지 못하였으나 Flow cytometry에 의해 배양 중의 생존소포자 비율을 판정할 수 있어, 유채와 보리, 밀 등의 작물과 같은 좋은 반응을 얻기 위해서는 지금까지의 결과를 토대로 계속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

적 요

당귀 반수체 육성의 기초자료를 얻고자 배양 소포자의 활력과 특성을 Flow cytometry로 관찰한 바 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 소포자 활력은 발육 시기에 따라 차이를 보여 배양 4일경에 4분자기 12.8%, 1핵성소포자기 49.3%, 2핵성소포자기 42.3% 및 성숙화분은 56.4%였다. 그리고 배양 20일 경에는 소포자의 활력이 감소하여 배양중 배지개선과 계대배양이 요구됨을 알 수 있었다.

2. 발육 시기에 따라 소포자 구조 peak가 다르게

조사되어 4분자기는 원형을 보이다가 1~2핵성 소포자부터 성숙화분은 장타원형의 발달하는 특성을 띠었다.

3. 배양 소포자 중 살아서 생존한 소포자는 FDA 염색에 녹색 형광을 DAPI 염색에 청색형광을 발하여 활력이 있음을 알 수 있었다.

인 용 문 헌

1. Bajaj Y. P., Fumanowa S., and Olszowska M. 1988. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants In YPS Bajaj ed, Biotechnology in Agriculture and Forestry 4. Springer-Verlag, Berlin pp.60-103.
2. Bang JK, Lee JI, Kott LS. 1991. Embryogenesis and plant regeneration in rapeseed micropore culture. Korean J. Breed. 23(3) : 257-262.
3. Bang JK, Lee JI, Kott LS. 1991. Effect of developmental stages of micropores on

- embryogenesis in Rapeseed. Korean J. Breed. 23(4) : 315 - 320.
4. Coventry J, Kott L Beversdort WD. 1988. Manual for microspore culture technique for Brassica napus. Technical Bulletin OAC Publication 0489, University of Guelph. pp 35.
 5. Fuchs K, Pauls KP. 1992. Flow cytometric characterization of microspore development in Brassica napus. Can. J. Bot. 70 : 802 - 809.
 6. Harn C. 1985. Anther culture and pollen dimorphism. Korean J. Plant Tissue Culture 12 : 1 - 34.
 7. Keller WA, Armstrong KC. 1983. Production of Brassica napus haploids through anther and microspore culture. International Rapeseed Conference. pp239 - 245.
 8. Keller WA, Rajhathy T, and Lacapra J. 1975. In vitro production of plants from pollen in Brassica campestris Can. J. Genet Cytol. 17 : 655 - 666.
 9. Lee ST, Yu HS, Park CG and Yeon KB. 1993. Effect of crown diameter and nitrogen topdressing on growth and yield of Angelica gigas NAKAI. Korean J. Medicinal Crop Sci. 1(2) : 97 - 103.
 10. Lee SY 1988. Effect of pollen dimorphism and growth environment of donor plant on anther culture in rice. Ph D. Thesis of Graduate School WonKwang University. pp 98.
 11. Pauls KP, Deynze AV, Deslauriers C, Powell A, Siebel J, Cloutier S, Lo KH, Fuchs K, Fu CY 1994. Microspore culture in Brassica napus a method for haploid production and a model system for studying embryogenesis in plants. Current Topics in Mol. Genet. (Life Sci. Adv.) 2 : 35 - 51.
 12. Siebel J and Pauls KP 1989. A comparison of anther and microspore culture as a breeding tool in Brassica napus. Theor. Appl. Genet. 78 : 473 - 479.
 13. Siebel J and Pauls KP 1989. Inheritance patterns of erucic acid content in populations of Brassica napus microspore-derived spontaneous diploids. Theor. Appl. Genet. 77 : 489 - 494.
 14. Yu HS, Lee ST, Chang YH, Kim KS and Kim YG 1996. Germination and seedling growth characteristics of seeds with different bolting years in Angelica gigas NAKAI. Korean J. Medicinal Crop Sci. 4(3) : 193 - 198.
 15. Yu HS, Chang YH, Lee ST, Kim YG 1996. Relation between bolting rate and yield in Angelica gigas NAKAI. Korean J. Medicinal Crop Sci. 4(1) : 47 - 51.
 16. Yu HS, Kang BH, Chang YH, Kim CG, Kim YG and Lee ST. 1995. Seedling growth pattern and growth characteristics in different seedling amount in Angelica gigas NAKAI. Korean J. Medicinal Crop Sci. 3(2) : 84 - 90.
 17. Yu HS, Kang BH, Im DJ, Kim CG, Kim YG, Lee ST and Chang YH 1995. Effects of temperature, light, GA3 and storage method on germination of Angelica gigas NAKAI. Korean J. Medicinal Crop Sci. 3(1) : 30 - 34.