

# 藥培養에 關한 研究

放射線農學研究所

韓 昶 烈

## STUDIES ON THE ANTHOR CULTURE OF CROP PLANTS

Changyawl Harn

Radiation Research Institute in Agriculture

Office of Atomic Energy

Since Guha and Maheshwari's works on the induction of haploid plant from the cultured anther of *Datura innoxia* anther culture has become a big topic among geneticists and breeders. Present paper is the summarized report on the anther culture method based on the author's recent researches.

近來 遺傳, 育種學界에서 큰 話題거리의 하나는 亦是 藥培養일 것이다. 藥培養에 關하여 各國 學者들의 關心이 너무나도 크고, 또한 이 技術이 充分히 開發되었을 때에 育種事業에 가져오는 利得은 實로 革命的인 것이라고도 할 수 있을만큼 크게 比하여 우리나라 學界의 이에 對한 關心은 아직 極히 微微하기에, 最近의 筆者의 研究(Figs.1-8)를 綜合하여 同學의 參考資料에 供코져 한다.

### 半 數 體

農作物의 育種에 있어서 "半數體個體를 마음대로 만들 수만 있다면" 하는 것은 遺傳, 育種學者들의 오랜 念願이었다. 그것은 半數體만 만들어내면 育種에서는 이의 染色體를 倍加시켜 모든 因子에서 Homo가 된 所謂 純粹한 것을 곧 만들어냄으로서, 純系의 固定을 短時日內에 이룰 수 있고, 이런 純系는 F<sub>1</sub> 種子生産의 母本으로 쓸 수가 있다. 半數體는 또한 突然變異育種에서는 貴重한 材料가 되며, 遺傳學에서는 genom 分析을 容易하게 한다는 등 利用價値가 크기 때문이다.

片山·根井<sup>1)</sup>, 田中·中田<sup>2)</sup> 등의 綜說에 依하면 半數體植物은 적어도 高等植物의 42屬 75種 以上에서 出現이 報告되었다고 한다.

人爲的으로 半數體誘起를 試圖한 예는 많다. 種屬間 交配, 特殊한 遺傳子型 花粉을 交配하는 Pollinator法, 遲延授粉에 依한 方法, 核置換으로 異質細胞質의 導入에 依한 方法, 多胚現象의 利用, 花粉에 放射線照射를 하는 것 등 많은 方法이 오랫동안 研究되어 왔지만 玉蜀黍에 Pollinator法을 適用하는 것<sup>3,4)</sup> 以外에는 利用

價値가 없었다. 이것은 半數體誘發率이 極히 낮고, 그것도 또한 요령을 바랄 수 밖에 없는 方法들이기 때문이다.

### 成熟花粉培養

半數性인 成熟花粉을 特殊培地에 培養하면 花粉에 여러 細胞學的 變化가 일어난다든가 또는 Callus가 생긴다든가 하는 現象은 既往에 여러 植物에서 報告된바 있다. 예를들면 *Ginkgo biloba*에서는 精細胞, 多核細胞 등이 出現하고 Callus가 形成되었다든가<sup>5)</sup>, *Torreya nucifera*에서는 Callus가<sup>6)</sup>, *Taxus brevifolia*에서는 花粉의 肥大 및 異常分裂이<sup>7)</sup>, *Brassica oleracea* X *B. alcaograba*의 F<sub>1</sub> 花粉에서의 Callus 形成<sup>8)</sup> 등의 報告가 있지만 이러한 培養에서 半數體가 誘導되었다는 報告는 없다.

### 藥 培 養

그런데 Guha and Maheshwari<sup>9)</sup>는 *Datura innoxia*의 藥을 滅菌後 Nitsch 또는 White의 基本培地에 IAA, Kinetin, CH, YE, CM 등을 適當히 配合한 데에 培養함으로써 半數性的 Embryoid와 半數體幼植物을 獲得하는데 成功하였다. 여기에 刺戟을 받아<sup>11)</sup> 中田·田中<sup>12~14)</sup>는 담배의 藥에서 Embryoid를 通하여 半數體를, 新關·大野<sup>15,16)</sup>는 水稻의 藥에서 半數體 Callus를 誘導하고 이 Callus에서 半數體水稻을 얻는데 成功하였다.

1968年 國際遺傳學會 開催時 이런 事實이 알려지자 各國 學者들은 앞을 다투어 이 分野의 研究에 沒頭하

기 始作하여 現在는 많은 사람들이 여러 農作物을 對象으로하여 研究가 이루어지고 있다.

## 葯 培 養 技 術

葯培養이라 하지만 葯壁細胞나 組織에서 2倍性植物體를 誘起시키는 것이 目的이 아니고 그 안에 있는 成熟花粉의 前驅體인 小孢子(r) 또는 그 前期의 Tetrad 期의 小孢子를 培養하여 半數性 個體를 作出하는 것이 目的인 故로 實은 小孢子培養 또는 未熟花粉培養이라 하는 것이 妥當한 것이다. 그러나 이런 1核期小孢자를 摘出 培養한다는 것은 힘이 드는 故로 培養을 容易하게 하기 爲하여 그러한 小孢子가 들어있는 小孢子囊體 卽 葯을 그대로 培養하는 것이다. 이 時期에 있어서 葯의 葯壁組織은 衰萎되기 始作하기 때문에 葯壁組織 細胞들이 Callus를 形成하는 수는 그렇게 흔하지 않으나 花糸나 葯隔組織이 Callus化하는 수가 흔하니 이런 것은 隨時로 調査 除去하여야지 그렇지 않으면 小孢子 起源의 半數性 Callus나 半數性 Embryoid와 2倍性 Callus가 混在될 憂慮가 있다.

### 1) 培養基調製

基本培地는 White, Nitsch, Murashige and Skoog 其他, 또는 이들의 改良組成을 쓰는데, 各 作物別로 어느것이 가장 適合한가 미리 定하여야 되지만 이런 基本培地間에 큰 差異는 없다. 그것보다 重要한 것은 이 基本培地에 添加하는 生育促進(또는 調整)物質 등의 種類와 量이다. 이런 物質로는 Kinetin, 2,4-D, IAA(또는 NAA), Coconut milk, Yeast extract, 其他 植物汁液 등이 있다. 이런 것들을 適當히 配合했을 때 小孢子가 (1) 잘 分裂하든가, (2) 分裂하여 Embryoid가 생기든가, (3) Callus塊가 생기든가 한다. 또한 Callus에서 植物體를 分化시킬 때는 다시 이런 調整物質들의 組成과 量을 달리하여야 된다. 이것이 作物의 種類, 品種間에 各各 다르니 어떤 作物의 葯培養을 試圖할 때는 여러 濃度의 培地를 만들어서 適合한 것을 定하여야 되므로 努力과 時間이 드는 것은 覺悟해야 된다. pH는 大概 5.6~6.0의 範圍로 常法에 依하여 規正한다. 이게 一部 培養基를 例示하면 表1,2와 같다.

### 2) 材料의 採取

*Datura*의 境遇같이 成熟花粉期가 適期인 것도 있으나 大概는 Tetrad 期, Tetrad에서 곧 分離되어 나온 一核小孢子期가 適合하다. 一年生種子繁殖作物에서는 大概 開花 10~15日前이 滅菌分裂期인 故로 미리 葯을 調査하여 4分子期의 葯을 定해 두면 좋다. 水稻같은 것에서는 出穗 1~3日前의 一核小孢子期가 適合한 것 같지만 水稻에 對해서는 今後 各 期別로 더 調査해서 가장 有效한 時期를 定할 必要가 있다. 一核小孢자의

核이 分裂하여 生殖核과 營養核으로 되는 核分裂期가 適合期가 아닐까 하는 생각도 있지만 今後 더 研究해 보아야겠다.

### 3) 材料의 消毒

消毒은 葯을 直接하는 것이 아니고 어린 花蕾를 消毒하는 것이다. 常法에 依하여 消毒하면 되지만 大概 花蕾를 數秒 Ethyl alcohol에 담겼다가 재빨리 所定의 鹽素性 殺菌水에 옮겨 10分內外 滅菌한다. 作物에 따라 差異는 있지만 花蕾內에 이미 雜菌이 많이 汚染되어 있는 것은 花蕾表面만 消毒해도 所用이 없다. 그렇다고하여 長期間 消毒을 하면 葯이 죽어버린다. 비를 맞지 않은 穗나 花蕾를 使用하는 것도 葯의 汚染을 防止하는 한 方法이다.

### 4) 葯의 接種

材料의 消毒, 培地에 葯을 移植하는 操作 등은 勿論 無菌室에서 한다. 培地는 Erlenmeyer flask나 試驗管에 所定量 注入하여 미리 滅菌해두었던 것을 使用한다. 한 試驗管에 大體로 10個內外의 葯을 移植함이 能率의이고 經濟的이다. 移植이 끝난 것은 22~28°C의 暗黑定溫器에 옮긴다. 培養 2~3日後부터 約10日間 隨時로 調査하여 汚染이 된 試驗管에서 汚染이 안된 葯은 미리 다른 試驗管에 移動시켜 可及의 健全한 葯을 多數 培養하도록 努力함이 좋다. Embryoid, 幼芽 또는 뿌리가 分化하기 始作하면 照明定溫器로 옮긴다.

## 葯培養의 利用

半數體의 遺傳, 育種學的 利用에 對해서는 前記한 바 있지만 葯培養의 見地에서 다시 생각하여 보기로 하자. 自殖性作物의 交雜育種에서 F<sub>1</sub>世代에 葯培養을 適用함으로써 各種 因子型의 花粉의 種類數와 同數의 半數體가 生길 것이고 이것을 倍加함으로써 곧 여러 型의 Homozygous 個體를 作出 할 수 있어서, 純系를 短時日間에 固定함으로써 育種의 世代를 大幅 短縮 시킬 수가 있다. 他殖性作物에서는 F<sub>1</sub>種子生産의 母本을 Homo 狀態로 만들 수 있기 때문에 Uniform한 優良한 F<sub>1</sub>種자를 만들 수 있다. 自殖劣勢作物에서는 純化하기 爲한 反復自殖을 할 必要가 없다. 因子가 Hetero인 營養繁殖作物도 葯培養을 함으로써 Homo 狀態로 만들어 Heterosis에 依한 強勢인 새로운 個體를 만들 수도 있다. 半數體는 因子가 單 Set이기 때문에 突然變異 遺傳, 育種에서는 實로 利用面이 많다. *Datura*나 水稻에서는 半數性 Callus를 繼代培養할 수 있고 또 再分化도 할 수 있다. 萬一 이들의 單細胞培養法이 確立되면, 微生物을 利用하여 오늘날 여러 遺傳의 新知見이 알려진 것을 今後は 高等植物의 單相(n)의 細胞培養系로서 研究할 수도 있을 것이다.

表1.

藥培養用培地

mg/l	Datura		煙 草		水 稻
	Nitsch	Modified White	改良煙草 C	改良 RM-1964	Blaydes
KCl		65	65		65
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O				440	
KNO <sub>3</sub>	125	80	80	1,900	1,000
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	500	300	400		347
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	125	720	180	370	35
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		200	800		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>				4,950	1,000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	125			510	300
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O		16.5	33		
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>		2.5			
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O			27.8	27.8	
Fe-citrate	10				
Na-Fe-EDTA					32
Na <sub>2</sub> EDTA			37.3	37.3	
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	3	7	0.45	22.3	4.4
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5	3	0.6	8.6	1.5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.5	1.5	0.00375	6.2	1.6
KI		0.75	0.03	0.83	0.8
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025	0.001		0.025	
MoO <sub>3</sub>		0.0001			
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.025			0.25	
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025			0.025	
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (註 1.83)	0.0005				
Glycine		300			2
Thiamine · HCl		10	0.4	0.4	0.1
Pyridoxine · HCl		10			0.1
Nicotinic acid		50			0.5
Myo-inositol		100		100	
Sucrose	50,000	20,000	20,000	30,000	30,000
Agar	10,000	10,000	6,000	10,000	10,000
Coconut milk			150(m/l)		
NAA			0.1		
IAA		2		2	
Kinetin		0.05		2~4	
pH		5.6	5.8	5.6	6.0

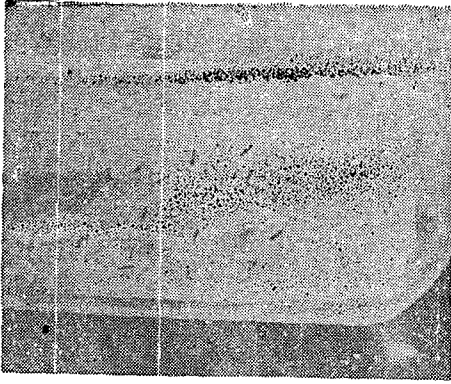


Fig. 1

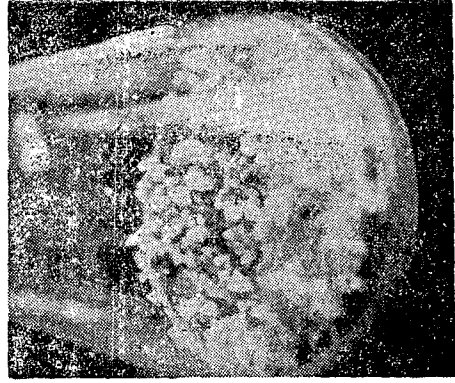


Fig. 2

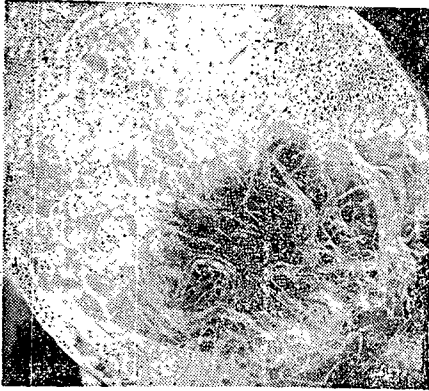


Fig. 3

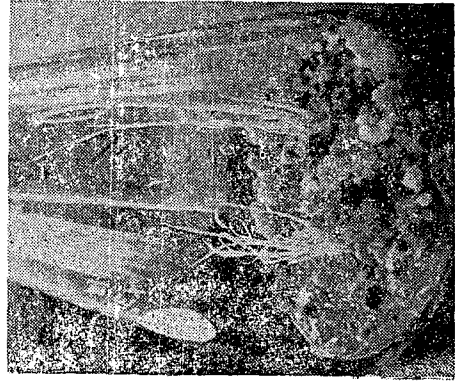


Fig. 4

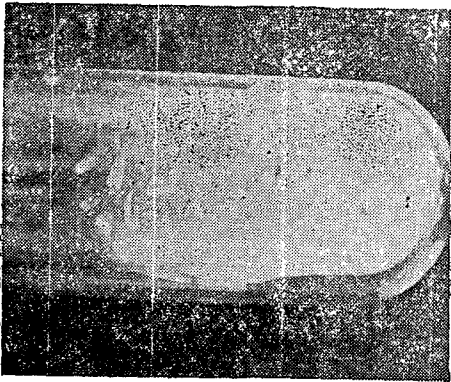


Fig. 5



Fig. 6

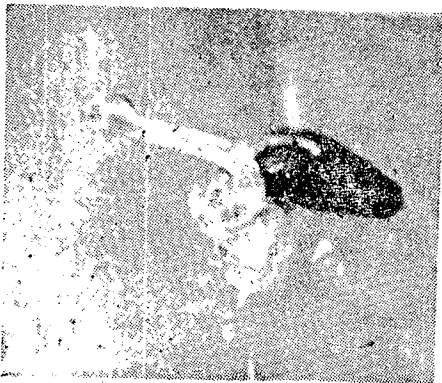


Fig. 7



Fig. 8

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1, callus developing from cultured rice anther; Fig. 2, haploid callus originated from anther; Fig. 3, root differentiation from callus; Fig. 4, haploid rice from callus; Fig. 5, anthers of hot pepper several days after culture; Fig.6, embryoid of hot pepper developing from microspore; Fig. 7, haploid plantlet from cultured anther of tobacco; Fig. 8, growing haploid tobacco.

表 2. 十字花科菜蔬の薬培地

	Callus 用	分 化 用
Kinetin	$10^{-6} \sim 10^{-5}$ M.	$10^{-6}$ M.
2, 4-D	$10^{-5}$ M.	$10^{-6}$ M.
YE	2,000 ppm	2,000ppm
基礎培地	White or Nitsch	White or Nitsch

参 考 文 献

1) 片山義勇・根井正利 1964. 植物の半数性に関する研究. 宮崎大學農學部育種學研究室報告2號: 1-78.  
 2) 田中正雄・中田和男 1963. 半数體の育成法について. 育種學最近の進歩 第9集: 23-32.  
 3) CHASE, S. S. 1949. Monoploid frequencies in a commercial double cross hybrid maize, and in its component single cross hybrids and inbred lines. *Genetics* 34:328-332.  
 4) COE, E. H. 1959. A line of maize with high haploid frequencies. *Amer. Nat.* 93:381-382.  
 5) TULECKE, W. 1957. The pollen of *Ginkgo biloba*: in vitro culture and tissue formation. *Amer. Jour. Bot.* 44:602-608.  
 6) \_\_\_\_\_, and N. SEHGAL 1963. Cell proliferation from pollen of *Torreya nucifera*. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 22:153-163.  
 7) TULECKE, W. 1959. The pollen cultures of C. D. La Rue: A tissue from the pollen of *Taxus*. *Bull. Torrey Bot. Club* 86:283-289.  
 8) 龜谷壽昭 1967. 花粉からのカルス形成(豫報) 育

雜 17 別刷 2:107.  
 9) GUHA, S. and S. C. MAHESHWARI 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204:497.  
 10) \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. *Nature* 212:97-98.  
 11) 村上寛一 1967. 約培養で半数體をてくるつ農業および園藝 42:971-972.  
 12) 中田和男・田中正雄 1968. 薬の組織培養による花粉からタバコ幼植物の分化. 遺傳雜 43:65-71.  
 13) \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ 1968. 花粉の組織培養によるタバコ半数體の育成. 農業および園藝 43:685-687.  
 14) \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ 1968. 薬培養によつて得られたタバコの種類と半数體の染色体数倍加處理について. 遺傳雜 44:47-54.  
 15) NIIZEKI, H. and K. Oono 1968. Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proc. Japan Acad.* 44:554-557.  
 16) 新關宏夫・大野清春 1968. 薬培養によるイネ半数體の育成. 農業技術 23:327-328.