

벼 藥培養에서 誘起된 植物體의 倍數性

孫再根* · 李壽寬* · 吳秉根* · 朴來敬**

Variation in Ploidy Level of Rice Plants Derived from Anther Culture

Jae Keun Sohn*, Su Kwan Lee*, Byong Geun Oh* and Rae Kyong Park**

ABSTRACT

Variation in ploidy level of regenerated plants from rice anthers and effective diploidization methods of haploid plants were studied to obtain basic information in rice breeding through anther culture. In a total of 574 plants derived from anther culture using 14F₁ hybrids as materials, there were 49.7% haploids, 48.6% diploids and 1.7% polyploids, respectively. The frequency of haploids in Japonica/Indica crosses was 60.6%, and that of Japonica/Japonica crosses was 43.0% in average. Inclusion of 2,4-D or NAA as phytohormone may increase the frequency of haploids, but kinetin may increase the frequency of diploids. The rate of auto-diploidization by tiller separation of haploid plants showed 8.2% in average. The rate of diploidization by leaf-sheath injection of colchicine showed 18.8% in average. Morphological characters of haploids plants showed that 64.6% in culm length, 63.4% in panicle length, 68% in flag leaf length, and 74.4% in flag leaf width compared to diploid plants. These apparent morphological differences will contribute to identify the ploidy of plants derived from rice anther culture.

緒 言

水稻에서 藥培養은 1968年 Niizeki와 Oono¹³⁾가 藥을 培養하여 花粉으로부터 半數體植物을 얻는데 成功한 以後 벼 品種改良에 있어서 育種年限의 短縮 및 特殊形質 早期改善의 效率인 方法으로 認定되어 이 分野에 對한 活潑한 研究가 進行되어 왔다. 그러나 오늘날 까지 適定 培養時期 究明²⁰⁾, 分化率이 높은 遺傳子源探索¹⁾, 培地改善^{5, 18)} 低溫處理와 같은 生理的 前處理等^{7, 9)}을 通하여 Callus 誘起 및 植物體分化率이 前보다는 向上되고 있으나 藥培養에 依한 水稻 品種改良을 爲해서는 아직도 植物體分化率이 極히 낮은 實情이며 또한 藥培養에서 誘起된 半數體植物의 染色體倍加 方法도 그 效率面에서 높지 못하다.

벼 藥培養에서 誘起된 植物體의 倍數性에 關해서 Nishi와 Mitsuoka¹⁷⁾는 n에서 5n 까지 얻어 진다고 하였고 Nitsch¹⁹⁾는 麗床 當時 藥의 發達段階에 따라 倍數性이 달라진다고 하였으며, Hu等⁹⁾은 培地에 添加된 Phytohormone의 種類에 따라서도 差異가 있다고 하였다. Niizeki¹⁶⁾는 多倍體가 藥壁組織에서 由來될 可能性을 示唆하였으나 韓⁸⁾은 Callus의 發生學的인 측면에서 그 可能性을 否定하였다. 일단 誘起된 半數體는 品種改良을 爲해서는 直接 利用할 수 없으므로 分化된 半數體 植物의 效率인 染色體倍加는 半數體를 利用한 新品種育種에서 必須의인 條件이라 하겠는데 일찌기 Jensen¹⁰⁾은 半數體植物의 染色體倍加를 爲한 여러가지 方法을 提示하였으나 벼의 경우 組織에 있어서의 特異性 때문에 一般의으로 實施되고 있는 方法은 Colchicine을 잎집에 注射接種하는 方法과 Callus 狀態에서 處理

* 嶺南作物試驗場(Yeongnam Crop Experiment Station, Milyang, 605, Korea).

** 作物試驗場(Crop Experiment Station, Suweon, 170, Korea) <1984. 8. 2. 接受>

하는 방법이 있으나 前者는 빠른 시간에 2배체를 얻을 수 있는 반면 그 효율이 낮은 것이 短點이고 後者는 효율은 50% 정도로 높으나 시간이 오래 걸린다는 短點이 있다. 半數體를 2배體化 시키는 다른 방법으로서 Niizeki¹⁵⁾는水稻에 있어서는 化學的인 處理를 하지 않더라도 半數體를 分株하여 自然的으로 2배體를 얻을 수 있다고 하였으나 그 효율에 대해서는 아직 正確히 밝혀진 바가 없다.

本研究는 藥培養系統 育成過程에서 分化된 植物體의 類型別 倍數性을 檢討하고 半數體와 2배體間의 型態的인 差異點과 半數體의 染色體倍加에 있어서 分株에 의한 방법과 Colchicine에 의한 化學的 處理의 效果를 究明하여 藥培養을 통한 벼 育種의 基礎資料를 얻고자 實施하였다.

材料 및 方法

供試材料는 交配組合이 相異한 16組合의 F₁ 個體였으며 1983年 夏季圃場에서 生育한 植物體의 藥을 葉耳間長 5~10cm의 片을 採取하여 顯微鏡下에서 一核後期에 該當하는 發育段皆임을 確認한 뒤 到 Callus 誘起培地에 置床하였다. Callus 誘起培地로서는 N6 基本培地에 NAA 2.0mg/ℓ와 Kinetin 1.0mg/ℓ를 添加하여 使用하였고 Callus가 誘起된 때까지 暗狀態로 維持하였다. 誘起된 Callus는 生育이 旺盛할 때 N6 基本培地에 IAA 0.2mg/ℓ와 Kinetin 1.0mg/ℓ이 添加된 植物體分化培地에 移植하여 2,000 Lux의 照明을 1日 12時間 處理하였으며 培養過程은 26±1℃가 維持되는 恒溫恒濕室에서 實施하였다.

分化植物體의 倍數性은 根의 끝부분을 2cm 程度 잘라내어 0.002 Mol 8-Oxyquinolin에 20~25℃에서 2.0~2.5時間 浸漬시킨後, 0.075 Mol KCl에서 20分間 洗滌하고 根端을 1mm 切取하여 Pecti-

nase와 Cellulase를 6%씩 混合處理한 뒤 Aceto-Carmine 染色法에 依해 染色體를 觀察하였다.

效果的인 染色體倍加試驗을 위해서는 最高分蘗期에 該當하는 半數體植物의 葉子를 分株하여 0.1% Colchicine 溶液을 浸漬주사점중법(Leaf-sheath injection method)에 依하여 分裂組織인 基部로부터 1.5~2.0cm 部位에 處理하였으며 分株에 依한 自然倍加率과 比較하였다. 半數體植物(n)과 2배體植物(2n)의 形態의 差異는 稈長, 片삭길이, 上葉길이, 止葉幅을 調査하였다.

結果 및 考察

日本型品種에 統一型品種이 交配된 遠緣交雜 F₁ 個體의 藥으로부터 分化한 植物體의 倍數性은 組合에 따라 相異하였는데 半數體는 29.4%~68.4%, 2배體는 29.5%~70.6%, 多倍體는 0~2.1%였으나 供試된 4組合의 藥培養에서 由來된 216 植物體는 半數體가 60.6%, 2배體가 38.4%, 多倍體는 0.9%로 나타나 遠緣交雜의 경우 半數體가 2배體보다 많이 分化하는 것으로 나타났다(Table 1).

한편 日本型品種間에 交配된 近緣交雜 F₁의 藥으로부터 分化된 植物體의 倍數性도 組合에 따라 相異하여 半數體는 0~80%, 2배體는 20~95.2% 多倍體는 0~7.0%로 나타났으며 10組合 358 分化植物體는 半數體가 43%, 2배體가 54.8%, 多倍體는 2.2%로 나타나 近緣交雜의 경우는 半數體보다 2배體의 分化比率이 높게 나타났다(Table 2).

藥培養으로 부터 分化된 植物體의 倍數性에 관하여 Chen and Lin²⁾은 5品種의 日本型 벼 品種을 藥培養하여 分化된 165 植物體의 倍數性은 半數體가 61 個體, 2배體가 81 個體, 그리고 4배體가 23 個體였다고 하였으며, 印度型 벼 品種은 植物體를 얻을 수 없을 만큼 分化率이 낮았다고 하였다. Nishi and Mitsuoka¹⁷⁾, Niizeki and Oono¹⁴⁾는 벼 藥

Table 1. Ploidy level of anther cultured plants derived from Japonica/Indica F₁ hybrids in rice

Material	No. of plants derived from anther						
	Total	Haploid	%	Diploid	%	Polyploid	%
Iri345/Milyang42//Hamaashai/3/ Fujihikari//Iri345*2/YR1805-87-5-1	34	10	29.4	24	70.6	0	0
Inabawase*2/YR2511-92-1	9	4	44.4	5	55.6	0	0
SR4095-53-1-2*2/Milyang53	78	52	66.7	26	33.3	0	0
SR4095-53-1-2*2/Gayabyeo	95	65	68.4	28	29.5	2	2.1
Total	216	131	60.6	83	38.4	2	0.9

Table 2. Ploidy level of anther cultured plants derived from Japonica/Indica F₁ hybrids in rice

Material	No. of plants derived from anther						
	Total	Haploid	%	Diploid	%	Polyploid	%
Fukuhikari/SR3054-55-1-2-4	21	0	0	20	95.2	1	4.8
Fukuhikari/Wasetoramochi	15	6	40.0	8	53.3	1	6.7
Fukuhikari/Ishiokamochi 15	41	14	34.1	27	65.9	0	0
Milyang 64/SR3049-58-1-5-2	17	13	76.5	4	23.5	0	0
Milyang 64/Torige 34	82	33	40.2	47	57.3	2	2.5
Milyang 64/Aichi 44	10	8	80.0	2	20.0	0	0
Iri 355/Shin 2	31	16	51.6	15	48.4	0	0
Iri 355/Cheolweon 32	21	2	9.5	19	90.5	0	0
Iri 355/Kochihikari	57	33	57.9	20	35.1	4	7.0
Iri 355/Akinishiki	26	6	23.1	20	76.9	0	0
Total	358	154	43.0	196	54.8	8	2.2

培囊을 통해서 分化되는 植物體의 倍數性은 半數體에서 5 倍體까지 多様な 倍數性을 보였다고 하였으나 分化植物體가 너무 적어서 倍數性的 分布를 뒷받침 할 수는 없었다. Chu⁶⁾는 벼 藥培養에서 倍數性이 多様な 植物體가 얻어지나 大部分이 半數體이거나 2 倍體라고 하였으며 이와 같은 現象은 藥培養에서 自發적으로 染色體가 倍加되어 생기는 것이지 藥의 體細胞組織에서 誘導되는 것이 아니라고 報告하였다. McComb¹²⁾은 細胞學的 變異의 範圍, 倍數性的 變異에 미치는 變因, 半數體와 倍數體的 起源 등을 細胞學的 觀察로 研究한 結果, 倍數性的 多様性은 花粉核의 分裂樣相에 起因한다고 하였다.

Chen³⁾은 4 가지 벼 品種과 3 組合의 F₁ 個體를 材料로 藥培養한 結果, 半數體에서 8 倍體까지 多様な 倍數性과 異數性을 報告하였다. Chen and Li⁴⁾는 82 組合 및 品種을 材料로 藥培養한 結果 얻어진 2,087 植物體의 倍數性은 半數體가 36.5%, 2 倍

體가 57.9%, 多倍體가 6.9%였다고 報告하여 本試驗의 結果에서와 같이 多様な 倍數性的 出現樣相에 있어서는 一致하는 傾向이나 交配組合에 따른 倍數性的 差異는 多少 相異한데 이는 供試材料가 相異한데서 비롯된 것이라 생각한다.

N6 基本培地에 添加된 Phytohormone 에 따른 分化植物體의 倍數性的 差異는 Table 3 에서와 같이 2,4-D, NAA 와 같은 Auxin 類가 添加된 培地에서는 半數體的 出現이 많았으나 Auxin 類와 함께 Kinetin 과 같은 Cytokinin 類가 添加된 培地에서는 2 倍體的 出現이 增加하는 傾向이었다. Phytohormone 의 添加가 多倍體的 出現을 增加시킨다는 報告^{9,12)}가 있으나 이에 對한 研究은 앞으로 더욱 깊이 있게 遂行되어 져야 할것으로 생각된다(Table 3).

벼 藥培養에 있어서 分化된 植物體中 Callus 狀態에서 自然的으로 染色體가 倍加되어 2 倍體가 出現하는 比率은 앞에서와 같이 日本型에서 54.8%, 統

Table 3. Effect of concentration and combinations of phytohormones on the ploidy of anther cultured plants

Concentrations of hormones added (mg/l)	No. of plants tested ^{a/}	Haploid		Diploid		Polyploid	
		No.	%	No.	%	No.	%
2,4 - D2	275	156	56.7	118	42.9	1	0.4
NAA 1	17	12	70.6	5	29.4	0	0
NAA 2, K1	213	92	43.2	120	56.3	1	0.5
NAA 2, K2	69	19	27.5	44	63.8	6	8.7
NAA 1, K2	12	0	0	12	100.0	0	0

a/: Plants induced from anther culture.

Table 4. Diploidization of haploid rice plants by tiller separation

Material	Haploid No.	No. of tillers by separation	No. of diploid plants	%
Ou 247/Inabawase	1	32	2	6.3
	2	24	0	0
	3	24	0	0
	4	8	1	12.5
	5	8	0	0
	6	8	2	25.0
	7	32	3	9.4
Yeongpungbyeo/BG 2	1	32	5	15.6
	2	24	0	0
	3	16	1	6.3
	4	48	7	14.6
Total	11	256	21	8.2

一型의 경우 38.4%로 나타나고 있으나 나머지 50%에 가까운 植物體는 品種改良에 直接的으로 利用될 수 없는 半數體植物이다. 分化된 半數體植物의 效率的인 染色體倍加를 위해서 2組合에서 誘起된 11個體의 半數體의 分蘖莖을 分株하여 自然倍加되는 比率를 본 바 Table 4에서와 같이 個體에 따라 相異하여 0~25.0%의 變異를 보였으며 256分蘖莖에서 21個體의 2倍體가 나타나 平均 8.2%의 染色體自然倍加率을 보였다(Table 4).

한편 0.1%의 Colchicine 溶液을 浸漬 注射接種하여 染色體倍加率을 본바 Table 5에서와 같이 個體에 따라 相異하여 0~33.3%의 變異를 보였으며 128分蘖莖에서 24個體의 2倍體가 나타나 平均 18.8%의 染色體倍加率을 보였는데 Lin¹¹⁾은 3가지 品種으로부터 由來된 60個體의 半數體植物

에 4가지 水準의 Colchicine 溶液을 浸漬注射接種法에 依하여 處理한 結果 27個體가 2倍體種子를 形成하였다고 報告하였다.

一般的으로 藥培養에서 分化된 2倍體는 形態的인 面에서 栽培品種과 비슷하나 半數體는 稈長이 짧고 稈의 크기가 작고 穗長이 짧으며 分蘖數가 많고 不稔으로 나타나며 多倍體는 줄기가 굵고 단단하며 잎이 길고 넓으며 흔히 까락이 있고 不稔이 甚한 樣相을 觀察할 수 있었으며 實用的인 區別을 위해서 形態的인 差異를 調査한 바 Table 6에서와 같이 2倍體에 比하여 半數體는 稈長에 있어서 64.6%, 穗長에서는 63.4%, 止葉長에 있어서는 68%, 止葉幅에서는 74.4%로 작았다. 이러한 形態的인 差異만으로도 藥培養系統育成 過程에서 分化된 植物體의 倍數性을 實用的으로 쉽게 判別할 수 있으리라 생각된

Table 5. Diploidization of haploid rice plants by colchicine treatment

Material	Haploid No.	No. of tillers treated by colchicine	No. of diploid plants	%
Ou 247/Inabawase	1	16	4	25.0
	2	12	0	0
	3	12	1	8.3
	4	4	0	0
	5	4	0	0
	6	4	1	25.0
	7	16	5	31.3
Yeongpungbyeo/BG 2	1	16	3	18.8
	2	12	2	16.7
	3	8	0	0
	4	24	8	33.3
Total	11	128	24	18.8

Table 6. Difference in morphological characters between diploid and haploid plants derived from anthers

Material	Plant No.	Haploid a/				Diploid			
		CmL (cm)	PnL (cm)	FLL (cm)	FLW (cm)	CmL (cm)	PnL (cm)	FLL (cm)	FLW (cm)
Ou 247/Inabawase	1	49.1	14.2	26.8	9.8	80.4	22.6	42.2	12.0
	2	46.6	11.4	21.6	8.1	64.2	18.6	30.2	12.0
	3	43.1	13.3	25.8	8.5	69.8	22.4	33.4	12.0
	4	48.6	13.3	24.8	9.3	74.8	24.4	40.0	11.6
Yeongpungbyeo/BG 2	1	56.6	13.6	20.0	7.5	82.8	21.6	25.8	9.4
	2	33.0	15.4	16.9	9.7	55.4	19.6	21.4	13.5
	3	61.2	14.8	19.0	7.8	96.4	22.2	34.2	11.2

a/ : CmL : Culm length, PnL : Panicle length, FLL : Flag leaf length, FLW : Flag leaf width.

다.

摘 要

벼 藥培養을 통하여 分化된 植物體의 倍數性分布와 半數體植物體의 效果의인 染色體倍加試驗을 實施하여 얻어진 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 15 組合의 F₁을 材料로 하여 藥培養한 結果 얻어진 574 植物體의 倍數性分布는 半數體가 49.7%, 2 倍體는 48.6%, 多倍體는 1.7%로 나타났다.

2. 統一型組合(Japonica/Indica)에서는 半數體(60.6%)가 많은 傾向이었고, 日本型組合(Japonica/Japonica)에서는 2 倍體(54.8%)가 많은 傾向이었다.

3. 2, 4-D, NAA 가 添加된 培地에서는 半數體가, Kinetin 이 添加된 培地에서는 2 倍體가 많은 傾向이었다.

4. 半數體의 分蘖基 分株에 依한 染色體自然倍加率は 個體에 따라 0~25%로 나타났고 平均 8.2%였다.

5. Colchicine 0.1% 溶液의 浸漬注射接種法에 依한 染色體倍加率は 0~33.3%의 變異를 보였으며 平均 18.8%로 나타났다.

6. 藥培養에서 由來된 植物體의 倍數성에 따른 形態의인 差異는 半數體가 2 倍體에 比하여 稈長이 64.6%, 穗長이 63.4%, 止葉長은 68%, 止葉幅은 74.4%로 뚜렷한 差異를 나타내었다.

引 用 文 獻

1. Chaleff, R. S. 1980. Tissue culture in rice improvement: an overview. Innovative ap-

proaches to rice breeding. Selected papers from the 1979 international rice research conference. IRRI: 81-91.

2. Chen, C. C. and M. H. Lin. 1976. Induction of rice plantlets from anther culture. Bot. Bull. Acad. Sin. 17:18-24.

3. Chen, C. C. 1982. Toward utilization of anther culture in rice breeding. Plant Breeding. Agricultural Association of China and Regional Society of SABRAO.: 81-87.

4. Chen Y. and L. T. Li. 1978. Investigation and utilization of pollen-derived haploid plants in rice and wheat. Proceedings of symposium on plant tissue culture. Science press, Beijing: 199-211.

5. Chu, C. C. 1978. The N₆ medium and its applications to anther culture of cereal crops. Proceedings of symposium on plant tissue culture. Science press, Beijing: 43-50.

6. _____ . 1982. Anther culture of rice and its significance in distant hybridization. Rice tissue culture planning conference. IRRI: 47-53.

7. Genovesi, A. D., and C. W. Magill. 1979. Improved rate of callus and green plant production from rice anther culture following cold shock. Crop Sci 19: 662-664.

8. 韓昶烈. 1969. 벼의 藥培養에 關한 研究. 韓育誌 1(1): 1-11.

9. Hu, C., S. C. Huang, C. P. Ho, H. C. Liang, C. C. Huang and L. P. Peng. 1978. On the inductive conditions of rice pollen plantlets in anther culture. Proceedings of symposium on plant

- tissue culture. Science press. Beijing: 87-95.
10. Jensen, C. J. 1974. Chromosome doubling techniques in haploids. Haploids in higher plants. Advances and Potential. Univ. Guelph, Guelph, Canada: 153-190.
 11. Lin, M. H. 1979. Diploidization of haploid rice plants by colchicine treatment. Jour. Agric. Res. China. 28(1): 45-49.
 12. McComb, J. A. 1978. Variation in ploidy levels of plants derived from anther culture. Proceedings of symposium on plant tissue culture. Science press. Beijing: 167-180.
 13. Niizeki, H. and K. Oono. 1968. Induction of haploid rice plant from anther culture. Proc. Japan. Acad. 44: 554-557.
 14. _____, _____. 1971. Rice plants obtained by anther culture. Colloq. Int. C. N. R. S. 193: 251-257.
 15. _____. 1977. 水稻 药培养法. 韩日共同研究事業管理所: 1-26.
 16. _____. 1980. 药·花粉培养. 植物細胞組織培养. 理工學社. 217-272.
 17. Nishi, T. and S. Mitsuoka. 1969. Occurrence of various ploidy plants from anther and ovary culture of rice plant. Jap. J. Genet. 44: 341-346.
 18. _____, Y. Yamada and E. Takahashi. 1973. The role of auxins in differentiation of rice tissue culture in vitro. Bot. Mag. (Tokyo) 86: 183-188.
 19. Nitsch, C. 1977. Culture of isolated microspores. Applied and fundamental aspects of plants cell, tissue, and organ culture. Springer-verlag: 268-278.
 20. Zapata, F. J., G. S. Khush, J. P. Crill, M. H. Heu, R. O. Romero, L. B. Torrizo and M. Alejar. 1983. Rice anther culture at IRRI. Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. IRRI: 27-46.