

벼 藥培養에서 培地組成이 Callus 및 植物體分化에 미치는 影響

孫再根* · 吳秉根* · 李壽寬*

Effects of Media and its Components on Callus Induction and Plant Differentiation in Rice Anther Culture

Jae Keun Sohn,* Byong Geun Oh,* and Soo Kwan Lee*

ABSTRACT

Effects of media and its components on callus induction and plant regeneration were studied to increase the cultural efficiency in rice anther culture.

The N₆ basic medium gave better results in callus induction than those of MS or Miller. The medium used for callus induction affects the plant regeneration. The frequency of plant regeneration from callus grown on Miller basic medium was lower than those of N₆ or MS. Most of calli derived from anthers, above 90%, were induced from 20 days to 40 days after anther inoculation. The cultural efficiency of modified N₆ basic medium which was composed of 31.5mM KNO₃ and 1.75mM(NH₄)₂SO₄ as nitrogen sources was higher than those of N₆ basic medium. Combination of NAA and Kinetin showed better results than that of 2,4-D only in cultural efficiency. Effect of DL-alanine on callus induction in Indica variety, IR40, showed better response in the anthers pretreated for 6 days at 12°C.

緒 言

벼의 藥培養技術은 新品種育成年限의 短縮, 有用劣性形質의 選拔效率增大等 여러가지 長點이 있는데도 이 技術이 아직도 新品種育成을 위한 效率의인 手段이 되지 못하고 있는 理由는 植物體分化率이 低調하여 有用個體의 出現頻度가 낮은데 있다고 하겠다. Chen,²⁾ Cornejo-martin · Primo-millo⁵⁾ 등은 花粉을 藥으로부터 分離培養하여 植物體를 誘起시켰다고 하나 그 分化率이 극히 低調하여 一般의으로 벼의 경우는 藥을 培養하여 花粉으로부터 callus를 誘起시키고 誘起된 callus에서 植物體를 再分化시키는 두 段階를 거쳐야 한다. callus와 植物體分化에

影響을 미치는 要因으로는 材料의 genotype, 花粉의 發達段階, 培地의 組成, 低溫處理等 여러가지 要因이 包含되는데, 基本培地 및 生長調整劑의 影響에 대한 研究는 植物組織培養이 始作된 以後 계속적으로 遂行되어 오고 있는 分野로서 벼 藥培養의 基本培地는 初期에 MS,⁹⁾ Miller⁸⁾ 培地를 주로 使用하였으나 現在는 培地內의 窒素水準을 變形한 N6⁴⁾ 培地가 널리 쓰이고 있다. 그러나 N6培地에서도 品種間의 callus 誘起 및 植物體分化率의 差異가 크며, 특히 Indica型 品種의 器管分化率은 Japonica型 品種에 比하여 아주 낮은 狀態이므로 새로운 培地開發에 대한 研究는 계속적으로 要求되고 있다.

여러가지 植物 種들은 hormone 依存的인 群과 獨立인 群으로 分類될 수 있으나 組織培養 過程에서

* 嶺南作物試驗場(Yeongnam Crop Exeriment Station, RDA, Milyang, 605, Korea) <1985. 7. 1 接受>

中間生成物이 callus 인 경우는 大部分이 hormone 依存的인 群에 屬하므로 此 藥培養의 경우도 callus 誘起段階에 있어서 exogenous hormone 의 供給은 必須的인 것으로 알려져 있으며, callus 誘起에 많이 사용되는 hormone 은 Auxin 類로서 2,4-D와 NAA가 單獨 혹은 Cytokinin 類와 混用으로 쓰여지고 있는데 最近에 MCPA 가 2,4-D 보다 効能이 좋다는 報告³⁾도 있다. Callus로부터 植物體를 分化시키는 데는 Cytokinin 을 單用하거나 낮은 濃度の Auxin 類를 均衡있게 混用하는 것이 重要하며¹²⁾ Cytokinin 類로는 주로 Kinetin 과 Benzil Adenine 이 많이 사용되고 있고 Auxin 이나 Cytokinin 類 외에 ABA의 處理效果에 대한 報告⁶⁾도 있다.

本 研究은 此 藥培養에 있어서 callus 誘起와 植物體分化에 대한 基本培地와 生長調整劑 및 其他 添加物質에 의한 處理效果를 究明하여 藥培養의 效率增大를 위한 基礎資料를 얻고자 實施하였다.

材料 및 方法

本 試驗은 嶺南作物試驗場 벼 育種 圃場에서 栽培된 洛東벼의 4 品種과 密陽 64 號/Torigei 34 組合 F1의 藥을 供試하여 採藥時期는 1 核期이 花粉을 包含하고 있는 藥을 外觀으로 識別하여 대체로 藥의 生長이 穎花全長의 1/3~1/2 程度되고 穎의 색깔이 軟綠色인 것을 置床하였다. 試驗管은 callus 誘起用으로는 2×12cm, 植物體分化用으로는 2×18cm 되는 것을 사용하였고, 培養液은 試驗管當 10ml 씩 넣고 두경의 알루미늄포일로 試驗管入口를 封하여 120℃에서 20분간 滅菌한 뒤 斜面培地로 만들어 사용하였다. 培養條件은 callus 誘起는 暗狀態에서 植物體分化는 1日 12時間씩 2,500Lux 로 照明하였으며 培養溫度는 26℃±1℃로 維持되는 恒溫器에서 培養하였다. 基本培地 比較試驗에는 MS, Miller, N₆ 固體培地를 사용하였고 培地 1ℓ當 Sucrose

50g, Agar 10g, NAA 2mg + Kinetin 1mg을 添加하였으며 pH는 5.8로 調節하여 callus 誘起程度와 置床後 日字別 callus 誘起率을 調査하였다. 植物體分化에 대한 基本培地의 影響은 供試品種인 洛東벼의 藥을 MS, Miller, N₆ 固體培地에 置床하여 誘起된 callus 를 生體重 30mg 程度로 자라게 한 뒤, IAA 0.2mg/ℓ + Kinetin 1mg/ℓ가 添加된 3 種類의 培地에 各各 移植시켜 綠色體의 分化程度를 培地別로 比較하였다. callus 誘起에 대한 基本培地內의 窒素源과 그 含量에 대한 試驗은 培地內 全窒素含量을 490mg/ℓ로 固定시키고 N₆ 培地를 基準으로 (NH₄)₂SO₄의 水準을 1/2, 2倍로 各各 變化시키고 加減된 量은 KNO₃로 調節하여 總窒素含量이 一定하도록 하였고, 植物體分化率은 위와 같이 處理된 基本培地內에 IAA 0.2mg/ℓ + Kinetin 1mg/ℓ를 添加한 培地를 使用하여 生體重 30mg 程度되는 callus 를 移植시켜 培地別로 植物體分化率을 調査하였다. 生長調整劑別 處理效果는 N₆ 基本培地에 callus 誘起用으로는 2,4-D 2mg/ℓ, NAA 1mg/ℓ + Kinetin 2mg/ℓ로 處理하였으며, 植物體分化用으로는 IAA 0.2mg/ℓ + Kinetin 1mg/ℓ로 固定하여 callus 로부터 分化된 植物體數를 置床된 藥數에 대한 百分率로 表示하였다. DL-Alanine 이 callus 誘起에 미치는 影響은 培地 1ℓ當 DL-Alanine 을 0, 2, 4, 10, 100mg 씩 加하여 低溫處理된 藥과 無處理된 藥을 나누어 各各 置床시킨 뒤 callus 誘起程度를 調査하였다.

結果 및 考察

Callus 誘起程度를 基本培地別로 比較하면(表 1) 供試品種에 關係없이 N₆ 培地를 使用하였을 때, 가장 分化率이 높았으며 Miller, MS 培地 順이었다. N₆ 基本培地는 洛東벼, Inabawase 와 같은 Japonica 型 벼에 있어서는 각각 34.3%, 10.0%로 分化率이 높

Table 1. Effect of media on callus induction from anther.

Cultivars	Percent of callus induction		
	MS medium	Miller medium	N ₆ medium
Nagdongbyeo	9.3 (28/300) ¹⁾	24.0 (72/300)	34.3 (103/300)
Inabawase	0.4 (2/470)	6.6 (31/470)	10.0 (39/390)
IR 40	0.3 (2/740)	0.3 (2/720)	0.6 (4/720)
Total	1.6 (32/1990)	5.5 (105/1910)	7.8 (146/1870)

¹⁾ Number of calli induced/Number of anthers inoculated.

Table 2. Effect of media on the days required for callus induction after anther inoculation.

Media	No. of anthers inoculated	Total	No. of calli induced on days after anther inoculation		
			21-30	31-40	41-50
		(%)	(%)	(%)	(%)
MS	300	28 (100)	3 (10.7)	2 (78.6)	3 (10.7)
Miller	300	72 (100)	17 (23.6)	51 (70.8)	4 (5.6)
N ₆	300	103 (100)	40 (38.8)	59 (57.3)	4 (3.9)

* Material ; Nagdongbyeo.

았지만, IR 40 과 같은 Indica 型 벼에서는 다른 培地 와 마찬가지로 低調한 分化率을 나타내었다. Oono¹²⁾ 는 N₆ 培地는 Japonica 型 벼의 葯培養에 適合하며 Indica/Japonica hybrid 를 葯培養할 경우 誘起된 植物體는 주로 Japonica 型의 形質이 發現된다고 하여 培養中 Media의 選抜效果가 microspore에서 일어날 수 있다는 可能性을 提示하였다. 葯을 置床한 後 callus 誘起時期는 表 2에서, 基本培地의 種類에 關係없이 20~40日 사이에 全體의 90% 以上이 誘起되었으며 50日 以後에는 거의 發生하지 않았다. 따라서 大量으로 葯培養을 遂行할 경우, 葯置床後 50日 程度되면 試驗管을 整理하는 것이 能率의 이라 생각된다. 楊等¹⁴⁾은 벼 葯培養에 있어 callus 發生은 葯置床後 20~40日 사이에 가장 높아 全體의 87~91%가 誘起되었다고 報告하였다.

서로 다른 基本培地에서 誘起된 callus 를 基本培地別로 移植하여 培地間의 植物體分化程度를 比較하면 表 3에서와 같이 植物體分化培地보다는 callus 誘起培地의 條件이 더 크게 作用하여 N₆ 나 MS 培地에서 誘起된 callus 를 植物體分化培地에 移植하였을 때는 分化培地의 種類에 關係없이 分化가 잘 되었으나 Miller 培地에서 誘起된 callus 는 植物體分

化가 低調하였다. Nitsch¹¹⁾는 callus로부터 植物體 分化에 있어서 培地에 의한 Carry over effect가 認定된다고 하였는데, 이러한 結果로부터 植物體 再分化는 分化培地의 影響도 重要하지만 callus 誘起에 使用된 培地의 影響을 더욱 크게 받는 것으로 推定된다.

N₆ 基本培地內의 窒素源의 含量을 달리하였을 때, callus 誘起程度는 表 4에서와 같이 供試品種의 類型에 關係없이 窒酸態窒素인 KNO₃와 암모늄態窒素인 (NH₄)₂SO₄의 含量이 各各 31.5 mM, 1.75 mM일 때 가장 誘起率이 높았으며, (NH₄)₂SO₄의 含量을 7 mM로 높이고 KNO₃의 含量을 21 mM로 낮추었을 때는 callus 誘起程度가 낮아졌는데 특히 Indica 型인 IR 40과 Indica/Japonica 交雜型인 伽椰벼에서는 전혀 callus가 誘起되지 않았으며, 높은 濃度의 암모늄態窒素에서는 培地에 置床한 葯이 오래지 않아 browning 되는 傾向이 심하였다. 表 5에서 보면 callus로부터 植物體分化에 있어서도 비슷한 傾向을 보여, (NH₄)₂SO₄를 1.75 mM로 줄이고 KNO₃의 含量을 31.5 mM로 하였을 때 20.2%의 綠色體分化率을 나타내었지만, (NH₄)₂SO₄의 濃度를 7.0 mM로 높이고 KNO₃의 濃度를 21.0 mM로

Table 3. Effect of media on plant differentiation of pollen callus.

Media ¹⁾		Calli tested	No. of plants			
I	II		Green	(%)	Albino	(%)
M. S	M. S	35	7	(20.0)	1	(2.9)
M. S	Miller	35	7	(20.0)	1	(2.9)
M. S	N ₆	35	5	(14.3)	0	(0)
Miller	M. S	21	1	(4.8)	0	(0)
Miller	Miller	24	0	(0)	1	(4.2)
Miller	N ₆	24	0	(0)	1	(4.2)
N ₆	M. S	40	3	(7.5)	1	(2.5)
N ₆	Miller	50	5	(10.0)	2	(4.0)
N ₆	N ₆	52	11	(21.2)	4	(7.7)

¹⁾ Medium I : Callus induction medium.
 Medium II : Plant differentiation medium.
 Material : Nagdongbyeo.

Table 4. Effect of nitrogen sources on the frequency of pollen callus induction in rice.

Nitrogen sources (mM)		Frequency of callus induction		
		Taipei 309	Gayabyeo	IR 40
KNO ₃	31.5	15.7 (81/516) ¹⁾	0.7 (4/600)	0.9 (5/540)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.75			
KNO ₃	21.0	10.2 (50/492)	0 (0/600)	0 (0/540)
(NH ₄) ₂ SO ₄	7.0			
KNO ₃ ²⁾	28.0	13.5 (73/540)	0.7 (4/580)	0.7 (4/540)
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.5			

¹⁾ (No. of calli induced/No. of anthers inoculated)×100.

²⁾ Nitrogen sources (mM) in N₆ medium.

Table 5. Effect of nitrogen sources on the frequency of plant differentiation of pollen callus.

Nitrogen sources (mM)		Calli tested	No. of plants differentiated	
			Green (%)	Albino (%)
KNO ₃	31.5	94	19 (20.2)	8 (8.5)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.75			
KNO ₃	21.0	61	7 (11.5)	6 (9.8)
(NH ₄) ₂ SO ₄	7.0			
KNO ₃ ¹⁾	28.0	76	12 (15.8)	8 (10.5)
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.5			

¹⁾ Nitrogen sources (mM) in N₆ medium.

* Material : Taipei 309.

Table 6. Effect of plant growth regulators on the callus induction and plant differentiation.

Concentration of growth regulators added (mg/ℓ)		No. of anthers inoculated	Callus		Green plant		Albino	
			No.	%	No.	%	No.	%
2,4-D	2	460	48	10.4	11	2.4	6	1.3
NAA 2, Kinetin	1	430	59	13.7	29	6.7	8	1.9
NAA 1, Kinetin	2	360	38	10.6	14	3.9	4	1.1

* Material : Milyang 64/Torigei 34 F₁.

Basic medium : N₆.

낮게調節하였을 때는 11.5%의 낮은 분화율을 나타내었는데 Huang 등⁷⁾은 callus誘起에 있어 窒素源을單獨으로處理하는 것 보다는 混用하였을 때 효과가 크다고 하였으며 암모늄態窒素의 過用은 callus誘起를 低下시킨다고 報告하였다.

生長調整劑別 callus誘起率과 植物體分化率을 表 6에서 보면 N₆基本培地에 2,4-D 2mg/ℓ와 NAA 2mg/ℓ+Kinetin 1mg/ℓ의 效果를 比較하였을 때, callus誘起程度는 各各 10.4%, 13.7%로 비슷한 傾向이었으나 植物體分化에 있어서는 2,4-D 單獨處理된 培地에서 誘起된 callus는 2.4% NAA와 kinetin이 混用된 培地에서 誘起된 callus는 6.7%의 植物體分化率을 나타내었다. Callus誘起培

地에 添加된 植物生長調整劑의 影響은 callus誘起뿐 아니라 植物體分化에까지 影響을 미친다고 믿어지며 2,4-D와 같이 殘留效果가 큰 Auxin類를 單獨으로處理하는 것 보다는 NAA와 같은 Auxin類에 Cytokinin類인 Kinetin을 混用處理하는 것이 植物體分化에 有利한 方向으로 Carry over effect가 나타난다고 생각된다. 孫等¹³⁾은 藥을 低溫處理하여 置床하였을 때, 2,4-D 單獨處理보다는 NAA와 Kinetin을 混用하였을 때 低溫處理의 效果가 더욱 크게 나타난다고 하였고, Chaleff와 Stolarz¹⁾는 callus誘起에 있어 2,4-D보다는 NAA에 Kinetin을 混用하는 것이 效果的이라 하였으나 Niizeki와 Oono¹⁰⁾는 2,4-D 2mg/ℓ 處理가 藥培養에 있

Table 7. Effect of DL-Alanine concentration on callus induction from anther.

Concentration of DL-Alanine (mg/ℓ)	Inabawase			IR 40		
	Anthers inoculated No.	Callus induced		Anthers inoculated No.	Callus induced	
		No.	%		No.	%
0	480	32	6.7	560	4	0.7
2	460	61	13.3	540	1	0.2
4	460	33	7.2	560	3	0.5
10	480	28	5.8	560	0	0
100	480	21	4.4	560	1	0.2

Table 8. Effect of DL-Alanine on callus induction from anther pretreated for 6 days at 12C.

Concentration of DL-Alanine (mg/ℓ)	Cold treatment ¹⁾			Control		
	No. of anthers inoculated	No. of calli induced	%	No. of anthers inoculated	No. of calli induced	%
0	228	5	2.1	560	4	0.7
2	255	12	4.7	540	1	0.2
4	270	7	2.6	560	3	0.5
10	270	12	4.4	560	0	0
100	195	3	1.5	560	1	0.2

¹⁾ Cold treatment for 6 days at 12C.

* Material : IR 40.

어 callus 誘起에 効果의이라 하였으며, Huang 등⁷⁾ 은 2,4-D와 NAA 그리고 Kinetin을 混用하는 것이 效率이 높다고 報告하는 등 서로 相異한 結果를 얻었는데 이는 供試材料에도 原因이 있겠지만 그의 예도 基本培地, 試料의 生育條件, 前處理 등 여러 要素가 複合的으로 作用한 結果라고 생각된다.

벼 藥培養에 있어서 藥壁細胞의 役割은 興味있는 分野로서 Chen²⁾은 藥壁細胞가 花粉이 發達하는 동안 培地로부터 養分의 通路로서 어떠한 生長調整物質을 供給하여 花粉이 callus로 發達하도록 돕고 있으며, 花粉은 藥壁細胞에 튜브와 같은 物質로 連結되어 있어 藥壁細胞 가까이 位置한 花粉이 multicell로 發達하는 比率이 크다고 하여 callus 誘起에 대한 藥壁細胞의 重要性을 強調하였으며, 藥壁細胞의 構成物質을 벼 類型別로 分析하여 Japonica型은 Indica型보다 Amino 酸의 一種인 DL-Alanine 含量이 높으므로, Indica型 벼를 藥培養할 경우 培地內에 DL-Alanine을 添加하면 callus 誘起率이 높아진다고 報告하였다. 그러나 表 7에서 보면 DL-Alanine 含量을 各各 달리 處理하였을 때 Indica型 品種인 IR 40에서는 callus 誘起에 있어서 뚜렷한 差異點을 나타내지 못하였으나, 다만 12C에서 6日동안 藥을 低溫處理하여 置床하였을 때(表 8) DL-Alanine 이

2~10 mg/ℓ 添加된 培地에서 無處理에 비해 約 2倍의 callus 誘起率의 增加를 보였으며 100 mg/ℓ 添加에서는 오히려 callus 誘起가 低下되는 傾向을 나타냈는데 이 分野는 앞으로 Indica型 벼 品種에 適合한 培地의 開發이라는 次元에서 많은 研究가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

摘 要

벼 藥培養에 있어서 基本培地 및 培地內 添加物質이 callus 誘起와 植物體分化에 미치는 影響을 究明하기 위하여 試驗한 結果는 다음과 같다.

1. callus 誘起 및 植物體分化는 N₆ 基本培地에서 가장 높았으며 Indica型 品種보다는 Japonica型 品種에서 그 效率이 더욱 높게 나타났다.
2. 藥置床後 callus 誘起는 基本培地의 種類에 關係없이 20~40日 사이에 90% 以上이 誘起되었다.
3. 植物體分化는 callus 誘起培地의 影響을 크게 받으며 Miller 培地에서 誘起된 callus의 植物體分化는 N₆나 MS培地에 比하여 低調하였다.
4. N₆培地內에 包含된 窒素源中 (NH₄)₂SO₄의 含量을 31.5 mM로 調節하였을 때 callus 및 植物體分化率이 向上되었다.

5. 生長調整劑 添加에 있어 2,4-D 單獨 處理보다는 NAA 2mg/ℓ에 Kinetin 1mg/ℓ를 混用 處理하였을 때 callus 誘起 뿐 아니라 植物體分化率도 向上되었다.

6. Indica 型 品種의 callus 誘起에 대한 DL-Alanine 添加效果는 藥을 低溫處理하였을 때 높게 나타났다.

引 用 文 獻

1. Chaleff, R. S. and A. Stolarz. 1981. Factors influencing the frequency of callus formation among cultured rice (*Oryza sativa*) anthers. *Physiol. Plant.* 51: 201-206.
2. Chen, Y. 1981. The advances of studies on anther culture and pollen culture of rice in China. Prepared for workshop on cell and tissue culture techniques for improvement of cereal crops. Beijing, China p. 19-25.
3. Chou, C., T. C. Yu, C. Y. Chang and C. C. Cheng. 1978. An investigation on callus induction hormones in rice anther culture. *Proceedings of symposium on plant tissue culture.* Science Press, Beijing, China, p. 247.
4. Chu, C. C. 1978. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. *Proceedings of symposium on plant tissue culture,* Science Press, Beijing, China, p. 43-50.
5. Cornejo-martin, M. J. and E. Primo-millo. 1981. Anther and pollen grain culture of rice (*Oryza sativa*). *Euphytica* 30: 541-546.
6. Harada, H. and J. Imamura, 1981. Factors that stimulate pollen embryogenesis. *Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement.* Science Press, Beijing, China, p. 145-158.
7. Huang Hung-shu, Ling Ting-hou, Tseng Pi-lu, Shien Yun-lan and Shi Ping. 1978. Studies on medium component in anther culture of *Oryza sativa* subsp. Hsien by mathematical methods. *Proceedings of symposium on plant tissue culture.* Pitman Pub., London, England, p. 244-246.
8. Miller, C. O. 1963. Kinetin and Kinetin-like compounds. *Mordene methoden der pflanzenanalyse* Vol. 6. edited by K. Peach and M. V. Tacey. Springer-Verlag, Berlin, W-Germany. p. 194-202.
9. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
10. Niizeki, H. and K. Oono. 1968. Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proc. Japan. Acad.*, 44: 554-557.
11. Nitsch, C. 1981. Progress in anther and pollen culture techniques. *Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement.* Science Press, Beijing, China, p. 1-10.
12. Oono, K. 1975. Production of haploid plant of rice (*Oryza sativa*) by anther culture and their use for breeding. *Bull. Natl. Inst. Agric. Sci.*, 26 D: 139-229.
13. 孫再根, 李壽寬, 朴來敬. 1984. 벼 藥培養에 있어서 低溫處理가 Callus 誘起 및 植物體分化에 미치는 影響. *農試報告* 26-2 (作物): 23~27.
14. 楊世準, 孫再根, 李壽寬, 鄭根植. 1984. 벼 藥培養에 있어서 Callus 生育程度가 器管分化에 미치는 影響. *韓育誌* 16(3): 329~333.