

## ***Hordeum spontaneum*에서의 callus 誘起와 植物體 再生 \*\***

崔 鍾 烈\*

### **Callus Induction and Plant Regeneration in *Hordeum spontaneum***

Jong Yol Choi\*

#### **ABSTRACT**

Immature embryos of *Hordeum spontaneum* were cultured on B5 and CI medium (Cheng's modified MS) to induce callus formation. CI media containing 1mg/l and 2mg/l 2,4-D were more effective than B5 medium with 1mg/l 2,4-D for the initiation of callus. Total 883 calli were induced from 1,060 immature embryos plated. Callus induction frequency was 83%.

Calli were transferred to differentiation media after one subculture to regenerate plants. Forty six plants were regenerated from 608 calli. Seventeen plants were chlorophyll deficient. There was no significant difference for plant regeneration among genotypes and media effects in calli which had been induced from immature embryos of seven types of trisomics. The overall regeneration frequency was 7.6%.

#### **緒 言**

高等植物에서의 組織培養은 發生過程에서의 生理的研究나 生化學的研究 뿐아니라 突然變異 誘起의 可能性이나, 再組合 DNA 또는 遺傳子移入 技法에 依한 遺傳的變異 作成의 面에서 多大한 關心의 對象이 되고 있다. 育種의 立場에서 보면, 選拔의 對象은 callus를 거쳐 再生된 植物體이기 때문에 callus의 誘起, 維持 및 植物體再生에 對한 效果의in 技術確立과 實質的으로 充分한 數의 再生體 獲得이 組織培養의 가장 重要한 目標의 하나가 될 것이다. 作物特有 禾本科作物에서의 組織培養은, callus의 誘起와 繼代培養에 依한 長期維持가 困難하고 植物體再生의 效率이 낮기 때문에 育種의 移用에 큰 어려움이 있으며<sup>10,12,13,17)</sup> 이러한 難點을 克服하기 為한 많은 研究가 이루어져 왔다<sup>4,7,8,14,15)</sup>.

*Hordeum vulgare*에서 Dale and Deambrogio<sup>5)</sup>는 頂端分裂組織, 葉鞘, 胚軸, 根, 胚, 未熟胚를 B5, MS 培地 等에 培養하여 callus를 誘起시켰으나, 植物體再生은 未熟胚에서 由來한 callus에서만 可能하다 했으며, Orton<sup>13)</sup>은 2.4-D 5mg/l을 添加한 MS 培地와 2.4-D 4mg/l을 添加한 B5培地를 使用하여 *Hordeum vulgare*에서 78%, *Hordeum jucundum*에서 40%의 callus를 誘起시킬 수 있었다. Bayliss and Dunn<sup>2)</sup>은 2.4-D 含量과 大麥의 遺傳子型이 callus의 誘起와 肥大에 密接한 關係가 있음을 認定했고, Deambrogio and Dale<sup>6)</sup>은 高濃度의 2.4-D 添加가 植物體再生率의 低下를 招來한다고 했다. 한편, Lupotto<sup>11)</sup>는 *Hordeum vulgare*에서 B type callus의 形成은, A type callus를 2.4-D 5mg/l을 添加한 培地에서 照明下에서 培養할 때만 可能하다 했으며, *Hordeum vulgare*의 頂端分裂組織을 培養한 Cheng and Smith<sup>3)</sup>는 SI培地(modified M

\* 江原大學校 農科大學 (College of Agriculture, Kangwon National University)

\*\* 本 研究는 1987 年度 文教部 學術研究 助成費 支援에 依하여 遂行되었음 <87.12.19 接受>

S)에서 60 % 이상의 植物體再生을 보고 있다. *Hordeum vulgare*에서 callus 誘起와 植物體再生에 對한 培地와 遺傳子型의 影響을 研究한 Hanzel等<sup>9)</sup>은 91品種의 未熟胚를 MS培地와 B5培地에 培養하여, 45品種에서만 callus를 얻었고, callus가 形成된 品種中에서 겨우 8品種에서만 植物體再生이 可能하다 했으며, 亦是 大麥의 未熟胚를 MS培地에서 培養한 Ahloowalia<sup>1)</sup>는 30 %의 callus 誘起와 23 %의 植物體再生을 報告하고 있다.

本論文에서는 *Hordeum spontaneum*의 7系統의 trisomics에서採取한 未熟胚 培養에서의 callus 誘起와 植物體再生의 結果를 報告한다.

### 材料 및 方法

*Hordeum spontaneum*의 trisomics 7系統과 disomic 植物體로 부터(Table 1.) 葉 裂開後 14~21日 사이에 穎果를 採取하여, 0.5 % sodium hypochlorite 溶液에 10分間 浸漬後, 70 % ethanol로 2分間 滅菌하고 滅菌蒸溜水로 3回 洗滌한 다음, clean bench 内에서 未熟胚를 剔出하여 18 mm 試驗管內의 培地上에 置床했다. Callus 誘起培地로는 B5培地와 Cheng and Smith<sup>3)</sup>의 CI培地를 使用했으며, 2.4-D

Table 1. Types of trisomics and disomic plant of *Hordeum spontaneum* tested for ability to initiate callus.

Type of trisomics	Chromosome number
Bush	15
Slender	15
Pale	15
Robust	15
Pseudo-normal	15
Purple	15
Semi-erect	15
Disomic	14

Table 2. Components of callus initiation media.

Culture medium	Basal medium	2,4-D
B-1	B5	1mg/l
B-2	B5	2mg/l
CI-1	CI*	1mg/l
CI-2	CI	2mg/l

\*CI – Cheng and Smith's callus initiating medium.

Table 3. Components of regeneration media.

Regeneration medium	Basal medium	Kinetic
B-0	B5	
B-1	B5	1 mg/l
SI-0	SI	
SI-1	SI	1 mg/l

Table 4. Number of calli plated for plant regeneration.

Type of trisomics	Kinetic				Total
	B5	SI	B5	SI	
Bush	24	16	24	16	80
Slender	16	17	17	17	67
Pale	21	15	20	15	71
Robust	17	19	17	19	72
Pseudo-normal	25	18	25	18	86
Purple	20	21	20	21	82
Semi-erect	21	17	21	17	76
Disomic	18	19	18	19	74
Total	162	142	162	142	608

를 각 1mg/l 와 2mg/l 를 添加하고 agar는 0.7 %로 했다(Table 2.). 培地의 pH는 5.8로 調整했고 120°C에서 17分間 高壓滅菌 했다. 試驗管内에 置床한 未熟胚는 約 2,000 lux의 連續照明下에 22°C의 培養室에서 培養했다. Callus 誘起에 使用된 未熟胚의 數는 2.4-D 水準이나 trisomic type에 따라 同一하지 않았으며(Table 5.), callus 形成與否判定은 未熟胚 置床後 4週日後에 하고 有意味性檢定은 Duncan's multiple test에 依하였다. 誘起된 callus는 callus 誘起와 同一한 條件下에서 繼代培養했다. 繼代培養前에 shoot가 發生한 callus에서는 移植前에 shoot를 除去했다. 4週間의 一次繼代培養後, kinetin 水準을 달리한 B5培地와 SI培地<sup>3)</sup>에 移植하여 (Table 3)植物體再生을 誘導했으며 再生培地에 移植된 callus의 數는 Table 4. 와 같다. Shoot가 나온 個體는 250ml Erlenmeyer flask 内의 培地에 옮기고, 葉이 10cm程度 되었을때 滅菌土壤에 盆植했다.

### 結果 및 考察

Callus 誘起는 trisomic type에 따라 最低 77 %, 最高 91 %, 平均 83 %의 높은 誘起率을 나타냈으나 誘起率에 對한 trisomic type間에 有意差는 認定되

Table 5. Frequency of callus initiation from immature embryos of trisomic plants of *Hordeum spontaneum*.

Type of trisomics	No. of embryos forming callus/No. of embryos plated*				Total
	B-1	B-2	CI-1	CI-2	
Bush	36/46 (80)**	36/45 (80)	26/31 (84)	27/31 (87)	125/153 (82)
Slender	20/35 (57)	23/25 (92)	27/30 (90)	22/30 (73)	92/120 (77)
Pale	27/32 (84)	22/34 (65)	25/30 (83)	27/30 (90)	101/126 (80)
Robust	18/30 (60)	23/30 (77)	29/33 (88)	30/30 (100)	100/123 (81)
Pseudo-normal	29/40 (73)	35/42 (83)	27/30 (90)	31/31 (100)	122/143 (85)
Purple	28/32 (88)	28/32 (88)	34/35 (97)	32/35 (91)	122/134 (91)
Semi-erect	30/38 (79)	31/38 (82)	23/30 (77)	29/30 (97)	113/136 (83)
Disomic	26/30 (87)	29/30 (97)	26/39 (87)	27/35 (77)	108/125 (86)
Total	214/283(76)	227/276(82)	217/249(87)	225/252(89)	883/1,060(83)

\*Score were taken 4 weeks after plating.

\*\*Number in parentheses is a percentage.

지 않았다. 培地에 따른 誘起率에서는 最低 76 %, 最高 89 %로 B5 培地에서는 B - 2 區가 B - 1 區보다, 그리고 CI 培地에서는 CI - 2 區가 CI - 1 區보다 높은 傾向을 보였으나 有意差는 없었다. 그러나, CI - 1 와 CI - 2 區는 다같이 B - 1 區보다 顯著하게 높은

誘起率을 나타냈다( $C1-1-B-1=11 > L.S.R. 0.05$  :  $C1-2-B-1=13 > L.S.R. 0.05$ ). 誘起結果는 Table 5. 와 같다. *Hordeum vulgare*의 未熟胚培養에서 B5-1D 와 MS-2D를 使用하여 각각 最高 26 %와 79 %의 callus 誘起를 시킨 Hanzel等<sup>9)</sup>의 結果 및

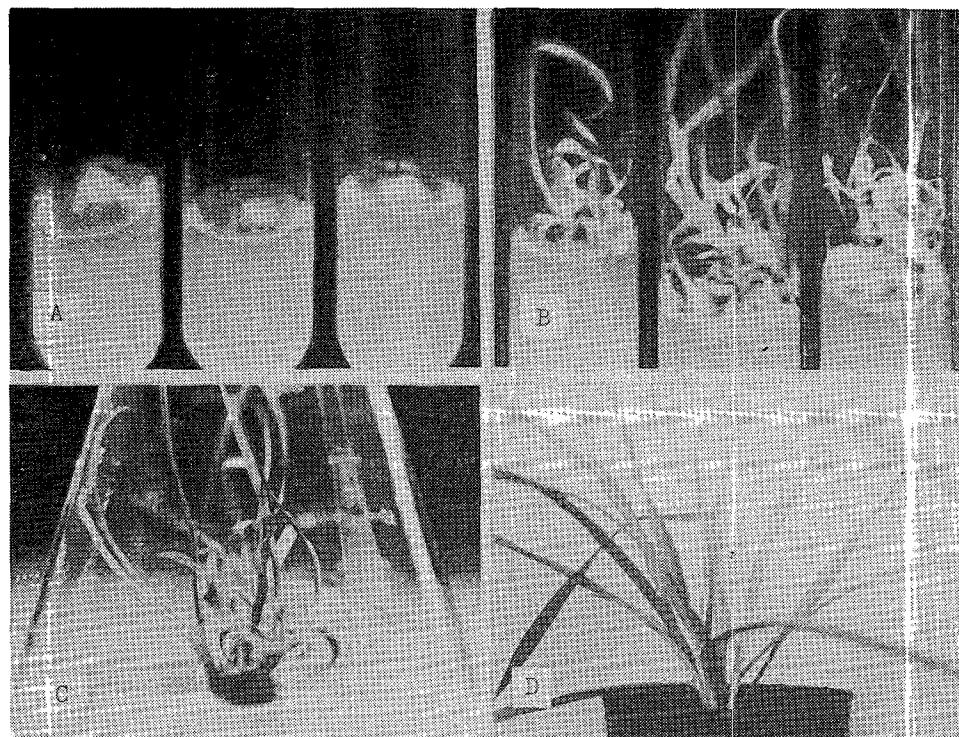


Photo 1. A. Callus culture of *Hordeum spontaneum*.

B. Plants regenerated on SI media.

C. Plant regenerated on SI medium in Erlenmeyer flask.

D. Barley plant transferred to a pot.

MS 培地에서 最高 44 %의 callus 誘起率을 얻은 Ahloowalia<sup>1)</sup>의 結果와 比較하면, 本 結果에서는 훨씬 높은 誘起率을 보이고 있으며, 이것은 *Hordeum spontaneum* 的 遺傳的特性에 基因될 것이라고 생각된다.

Callus 是 白色 또는 軟한 黃色을 띤 半透明의 塊狀을 나타내고(Photo 1), 그 肥大의 速度에는 많은 差異가 있았으며 繼代培養後의 callus의 크기를 Dale and Deambrogio<sup>5)</sup>의 方法으로 比較하면, 最少 3.1 단위에서부터 最高 47.1 단위 까지의 큰 變異를 보였다.

Dale and Deambrogio<sup>5)</sup>는 置床되는 未熟胚의 크기가 크면 形成되는 callus의 크기도 큰 傾向이 있다 하였으나, 本 結果에서는 置床되는 callus의 크기를 测定하지 않아서 이 關係를明白하게 할 수 없었으며, 또한 未熟胚 置床時 胚盤을 培地에 接觸시켜 置床하는 편이 그렇지 않은 경우에 比하여 callus 形成率이 높았다는 報告도 있으나<sup>5)</sup> 本 實驗에서는 全部 胚軸를 培地에 接觸시켜 置床했기 때문에 두 方法間의 優劣를 比較할 수 없었다.

Callus 誘起培地에서 形成된 callus는 一次繼代培養後 再生培地와 trisomic type 別로 8 ~ 13 個를 移植했으며 이 再生培地에서의 再生結果는 Table 6 과 같다.

再生植物體의 數는 Robust에서 1本, Bush에서 2本에 지나지 않았으나, Slender와 Pseudo-normal에서 각각 8本, 그리고 Disomic區에서는 14個體가

Table 6. Plants regenerated from calli on four types of regeneration media.

Type of trisomics	Kinetin				Total
	0 mg/l		1 mg/l		
	B5	SI	B5	SI	
Bush					2(1)*
Slender	3(2)	1(1)	4	8(3)	
Pale		2	2	4	
Robust		1		1	
Pseudo-normal	1(1)	3(3)	2(1)	2(1)	8(6)
Purple	1	2	1	4	
Semi-erect	1	2	2	5	
Disomic	1	6(4)	2(1)	5(2)	14(7)
Total	2(1)	14(9)	12(3)	18(4)	46(17)

\*Number in parentheses indicates number of chlorophyll-deficient plants.

再生成되었다. 한편 kinetin 無添加區에서는, B5 培地에서 2本에 不過하였으나, SI培地에서는 14本이 再生되었다. Kinetin 添加區에서는 B5 培地에서 12本, SI培地에서는 18本이 再生되었으며 合計 46個體로 그中, 17個體가 葉綠素 缺乏個體였다. 再生率은 7.6 %로 Ahloowalia<sup>1)</sup>나 Hanzel等<sup>9)</sup>의 結果와 比較하면多少 低調하였다. 再生培地에서 再生된 再生個體와 移植되어 盆植된 植物體는 Photo 1과 같다.

Callus 誘起率이나 植物體再生率은 遺傳子型과 關聯이 있다고 報告되고 있으나<sup>5,8,9,14,15)</sup>, 本 實驗에서는 trisomic type에 따른 差異는 callus 誘起에서도 또 植物體再生에서도 認定되지 않았다. 이것은 未熟胚를 採取한 植物體는 各 染色體가 1本 添加된 添加型이지만, 採取된 未熟胚는 大部分이 disomic이여서同一한 遺傳子型을 가지고 있기 때문이라고 推測된다. 그러나 callus 誘起率은 培地에 따라 差異가 있었으며 이 傾向은 再生培地의 경우도 同一했다.

*Hordeum vulgare*에서는 callus 誘起率이 좋은 遺傳子型이 반드시 좋은 再生率을 나타내지는 않는다고 報告되고 있으며<sup>5,9)</sup>, 本 實驗에서는 callus 誘起에서나 植物體再生에서 다같이 B5 培地보다 modified M S 培地인 CI培地와 SI培地가 良好한 傾向을 보였다.

Callus 안에 있는 未熟胚의 莖葉의 原基가 繼代培養을 거쳐 再生培地로 옮겨져 莖葉으로 發達할 것이라는 可能性도 있으나<sup>5)</sup> 組織培養이 育種에 利用되기 為해서는 單一細胞로부터의 callus 誘起와 植物體再生이 繫要하다. 또 callus 誘起와 植物體再生에는 遺傳子型과 培地間に 強한 相互作用이 있기 때문에<sup>2,9)</sup> 特定遺傳子型에 適合한 callus 誘起條件과 植物體再生條件의 究明이 必要하다. 遺憾스럽게도, 大麥에서의 再生率은 Cheng and Smith<sup>3)</sup>의 경우를 除外하면 매우 낮기 때문에 callus로부터 植物體再生率을 높이는 研究가 要望된다.

## 摘 要

*Hordeum spontaneum*의 7系統의 trisomic 植物體에서 未熟胚를 採取하여 2.4-D 1mg/l과 2mg /l가 添加된 B5 培地와 CI培地에 置床하여 callus 形成을 誘導했다. Callus 誘起는 2.4-D 1mg /l添加區에서는 B5 培地보다 CI培地에서 良好하였으나, 2mg /l添加區에서는 B5 培地와 CI培地間に 差異가 없었다. 또 trisomic type에 따른 callus 誘起率에서도 差異는 認定되지 않았으며, 平均 callus 誘起率은

83 %였다.

植物體再生에서는 kinetin 1mg / ℓ添加區가 無添加區보다 良好하고, 無添加區에서는 B5培地보다 SI培地가 좋은 傾向을 나타냈으나 다같이 有意差는 없었다. 合計 46 個體가 再生되었으며 그中 17 個體가 葉綠素 缺乏個體였고 再生率은 7.6 %였다.

### 引 用 文 獻

1. Ahloowalia, B. S. 1987. Plant regeneration from embryo callus culture in barley. *Euphytica* 36: 659-665.
2. Bayliss, M. W. and S. D. M. Dunn. 1979. Factors affecting callus formation from embryos of barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Science Letters* 14:311-316.
3. Cheng, T. Y. and H. H. Smith. 1975. Organogenesis from callus culture of *Hordeum vulgare*. *Planta* 123:307-310.
4. Cummings, D. P., C. E. Green and D. D. Stuthman. 1976. Callus induction and plant regeneration in oats. *Crop Science* 16:465-470.
5. Dale, P. J. and E. Deambrogio. 1979. A comparison of callus induction and plant regeneration from different explants of *Hordeum vulgare*. *Z. Pflanzenphysiol.* 94:65-77.
6. Deambrogio, E. and P. J. Dale. 1980. Effect of 2,4-D on the frequency of regenerated plants in barley and on genetic variability between them. *Cereal Research Communication* 8:417-423.
7. Gamborg, O. L., J. P. Shyluk, D. S. Brar and F. Constabel. 1977. Morphogenesis and plant regeneration from callus of immature embryos of sorghum. *Plant Science Letters* 10:67-74.
8. Green, C. E. and R. L. Phillips. 1975. Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop Science* 15:417-421.
9. Hanzel, J. J., J. P. Miller, M. A. Brinkman and E. Fendos. Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley. *Crop Science* 25:27-31.
10. King, P. J., I. Potrykus and E. Thomas. 1978. In vitro genetics of cereals: problems and perspective. *Physiologie Vegetale* 16(3):381-399.
11. Lupotto, E. 1984. Callus induction and plant regeneration from barley mature embryo. *Annals of Botany* 54:523-529.
12. Nabors, M. W., J. W. Heyser, T. A. Dykes and K. J. DeMott. 1983. Long-duration, high frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. *Planta* 157:385-391.
13. Orton, T. J. 1979. A quantitative analysis of growth and regeneration from tissue cultures of *Hordeum vulgare*, *H. jubatum* and their interspecific hybrid. *Environmental and Experimental Botany* 19:319-335.
14. Rines, H. W. and T. J. McCoy. 1981. Tissue culture initiation and plant regeneration in hexaploid species of oats. *Crop Science* 21: 837-842.
15. Sears, R. G. and E. L. Deckard. 1982. Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration. *Crop Science* 22:546-550.
16. Singh, R. J. 1986. Chromosomal variation in immature embryo derived calluses of barley (*Hordeum vulgare*). *Theor. Appl. Genet.* 72:710-716.
17. Smith, H. H. 1974. Model systems for somatic cell plant genetics. *Bioscience* 24(5):269-275.