

옥수수, 진주조, 메밀의 藥 및 組織培養 反應

崔炳漢* · 朴根龍* 朴來敬*

Response to Anther and Tissue Cultures of Corn, Pearl Millet and Buckwheat Genotypes

Byung Han Choi* Keun Yong Park* and Rae Kyeong Park*

ABSTRACT

Anther and/or tissue culture of cross pollinated crops would be very important because it can result in the direct use of haploids or doubled haploids for developing superior hybrids or varieties. The objective of the study was to investigate the response frequencies in anther and/or tissue-cultured hybrids of corn, pearl millet and buckwheat to identify agronomically acceptable germplasm of the crops. 27 crosses of corn inbred lines were evaluated by plating their anthers on N6, MS and Yu-Pei media. Two genotypes of FR1141/FR16 hybrid cultured on N6 medium and Fla 2BT73/S6013 hybrid cultured on N6 medium responded with one anther producing calli when plated after 5°C low temperature treatment for one week. Immature embryos of corn hybrid Suwon 19 responded producing calli that were regenerated to plants at a 8.6 percent success rate. Of the 20 corn hybrids, immature tassels of FR1141/FR16, B68/A116N//KS15, KS16/KS17, GA209/DB578 and SDB126/GA209 crosses responded at a relatively higher success rate producing calli that were regenerated to plants. In tissue culture of elongating culms of pearl millet x Napier grass interspecific hybrid, 2.5-4.0mm long pieces of the culm were good for callus induction resulting in higher success rate. The epicotyl of buckwheat was very good for tissue culture, and the node produced the plants regenerated directly without callus induction on the B5 medium containing 1 ppm BA and 0.05 ppm IBA. There were great differences in response to anther and/or tissue culture of corn, pearl millet and buckwheat due to genotype x medium and environment interactions.

緒 言

他家受精作物인 옥수수, 眞珠조, 메밀은 自家受精作物과 달라서 優良自殖系統育成이 매우 어렵고 育種期間이 長期間 所要되므로 藥 및 組織培養技術을 開發, 半數體를 育成하여 育種效率를 向上시킨다면 옥수수를 비롯한他家受精作物的 優良自殖系統 및 交雜種 育成期間을 短縮할 수 있다. 우리나라에서는 이들他家受精作物에 對한 藥 및 組織培養에 關한 研究가 거의 實施되지 않았다. 1970年代初까지 옥수수 藥培養은 매우 어려운 것으로 생각되었으나

1970年代末에 中國 研究家들에 의하여 成功하기 始作하였다. N6 培地²⁾의 開發로 制限되기는 하나 옥수수 藥培養이 成功하게 되었다. N6 培地는 MS 培地에 比하여 Ammonium ion보다 Nitrate比率이 훨씬 높아서 옥수수 藥培養培地로서 優秀함을 發見하였다.³⁾ 그러나 N6 나 Yu-Pei 培地⁶⁾을 使用했을 때 옥수수 藥培養 成功率은 約 1%程度에 不過하였고 遺傳子型에 따른 反應도 매우 달랐다. 옥수수 遺傳子型들의 藥은 callus 나 embryoid를 形成하여 그중 一部分이 植物體로 再分化되어 成熟한 植物體를 收穫할 수 있었다.^{3,8,6)} Nitsch 등¹⁰⁾도 옥수수 藥培養成功率을 10%까지 높였으나 옥수수

* 作物試驗場 (Crop Experiment Station, RDA, Suwon 440-100, Korea) <'89. 3. 27. 接受>

約當 2,000~3,000 以上の microspore 중에서 단지 1~2個만이 callus 나 embryoid로 分化, 發展되었으며 최고의 경우 平均 10個 藥中에서 1個 程度만이 成功되었다고 하였다. Petolino와 Jones¹⁰는 25交雜種中에서 17交雜種에서만 藥培養 反應을 나타냈으며 embryoid로 分化되었으며 9交雜種은 1% 以上の 成功率을 보였는데 이 交雜種들은 H 99, FR 16, PA 91 自殖系統親을 가지고 있었다고 하였다.

本 研究의 目的은 他家受精作物인 옥수수, 眞珠조, 메밀 遺傳子型들의 藥 및 組織培養技術의 向上을 위한 問題點들을 찾아내어 이를 改善하고자 하였다.

材料 및 方法

本 研究에서는 옥수수의 藥, 未熟胚, 未熟雄穗培養, 眞珠조×Napier grass 種間交雜種의 節間伸長部位 組織培養, 메밀 植物體의 組織培養 等으로 나누어 1988年 作物試驗場에서 實施되었다. 옥수수 藥培養에서는 水原 99號 等 27交雜種을 供試하였다. Callus 誘導를 위하여 N6 + 2,4-D 2 ppm, MS + 2,4-D 2 ppm, Yu-Pei + 2,4-D 2 ppm + TIBA 0.1 ppm + casein hydrolysate 50 g/l + activated charcoal 5 g/l 等 3개 培地를 使用하였다. 3개 培地의 pH는 5.8로 調節하였다. 옥수수 雄穗(1核期)를 chlorax액에 15分間 소독한 後 멸균수로 세척한 다음에 plastic bag에 담아 Convicon 항온기內에 넣어 5℃에서 7日間 低溫前處理를 하였다. 前處理한 雄穗를 70% ethanol액으로 소독한 後 멸균수로 세척한 다음에 藥 50個를 50 ml 培地가 들어 있는 petri dish에 넣어 置床한 後 parafilm으로 밀봉한 다음에 aluminum foil로 덮어 暗所(25 ± 1℃)에 4週日間 둔 다음, 16時間 조명조건(2,500 Lux)에서 培養하였다. 植物體分化培地는 N6, MS, Yu-Pei 基本培地에 asparagine 40 mg/l, NAA 1 ppm, kinetin 4 ppm을 添加하여 使用하였다.

옥수수 未熟胚培養에서는 水原 19號를 供試하여 MS 基本培地에 asparagine 1.98 g/l, pantothenate 0.25 mg/l, 2,4-D 2 ppm을 添加하여 callus를 誘導하였다. 未熟胚는 受精後 9~13日에 採取하여 置床하였으며 培養條件 및 方法은 藥培養과 같았다. 植物體 分化培地는 MS 基本培地에 asparagine 40 mg/l, NAA 1 ppm, kinetin 4 ppm을 添加하여 使用하였다.

어 使用하였다.

옥수수 未熟雄穗培養은 水原 99號 等 20 交雜種을 供試하여 N6 基本培地에 2,4-D 2 ppm을 添加하여 callus를 誘導하였고 植物體 分化培地는 MS 基本培地에 asparagine 40 mg/l, NAA 1 ppm, kinetin 4 ppm을 添加하였다. 옥수수 雄穗 길이 2~5 cm 程度 자랐을 때 未熟雄穗를 採取하여 1~3 mm 內外로 잘게 切斷하여 置床하였으며 培養條件 및 方法은 옥수수 藥培養과 같았다.

眞珠조×Napier grass 交雜種의 組織培養은 稈의 節間伸長部位를 採取하여 試料의 크기를 2.5 mm 에서부터 0.5 mm 크기 差異로 9.0 mm 까지의 크기로 切斷하여 置床하였다. Callus 誘導培地는 MS 基本培地에 2,4-D 2 ppm을 添加하였고 植物體 分化培地는 MS 基本培地에 asparagine 40 mg/l, NAA 1 ppm, kinetin 4 ppm을 添加하여 使用하였다. 培養條件 및 方法은 옥수수 藥培養과 같았다.

메밀 植物體의 組織培養은 信農 1號를 供試하여 1/2 B5 基本培地에 메밀 種子를 播種하여 植物體를 養成한 後 epicotyl, hypocotyl, 마디, 葉片을 採取하여 置床하였으며 callus 誘導培地는 epicotyl과 hypocotyl은 MS 基本培地에 NAA 0.1 ppm, BA 5 ppm을 添加하였고 마디用 培地는 B5 基本培地에 BA 1 ppm, IBA 0.05 ppm을 添加하였다. 葉片用 培地는 B5 基本培地에 asparagine 40 mg/l, glutamine 1 ppm, 2,4,5-T 0.1 ppm을 添加하였다. 植物體 分化培地는 B5 基本培地에 BA 1 ppm을 添加한 培地와 1/2 MS 基本培地에 Vitamine과 BA 1 ppm을 添加하여 使用하였다. 培養條件과 方法은 옥수수 藥培養과 같았다.

結果 및 考察

옥수수 藥培養의 경우 27 供試交雜種中에서 FR 1141/FR 16, Fla 2 BT 73/S 6013의 置床藥中에서 各各 1個 藥에서 callus가 形成되었다(表 1). 이 callus는 植物體로 分化되지는 못하였다. 供試된 基本培地別로 보면 N6와 MS 培地에서 各各 1個 藥에서 callus가 形成되었다(表 2). 置床培地別 低溫前處理效果는 뚜렷하지 않았으나 FR1141/FR 16의 藥을 N6 培地에 置床하였을 때와 Fla 2 BT 73/S 6013의 藥을 5℃에서 7日間 前處理後 MS 培地에 置床하였을 때 各各 1個의 藥에서 callus가 形成되었다.

Table 1. Response frequencies in cultured anthers of 27 crosses of corn inbred lines (Suwon, 1988)

Cross combination	Anthers plated	Anthers responded
FR1141/FR16	1,850	1
Fla2BT73/S6013	900	1
KS42/Hi39 and other 24 crosses	34,700	0
Total	37,450	2

Table 2. Response frequencies in cultured anthers of 27 crosses of corn inbred lines plated on N6, MS and Yu-Pei media (Suwon, 1988)

Culture medium	Anthers plated	Anthers responded
N 6	20,240	1
M S	14,610	1
Yu-Pei	2,600	0

옥수수 水原 19號의 受精後 9~13日 된 未熟胚를 MS 培地에 置床, 培養하였을 때 供試未熟胚 175個에서 모두 callus가 形成되었을 뿐만 아니라 이들 callus로부터 綠色體 分化도 比較的 잘 되어 15個體를 얻었으며 綠色體 分化率は 8.6%이었다 (表 3). 分化植物體는 後代檢定을 위하여 養成中이다.

옥수수 KV1/Ga 209 交雜種 등의 2~5 cm 程度 자란 未熟雄穗를 採取하여 培養하였을 때는 20 供試交雜種中 13 交雜種에서 callus가 形成되었으며 7 交雜種은 反應이 없었다(表 4). Callus 形成

Table 3. Response frequencies in cultured immature embryos of Suwon 19 corn hybrid (Suwon, 1988)

Hybrid	Immature embryos plated	Immature embryos responded (%)	Regenerated plants (%)
Suwon 19	175	175(100)	15(8.6)

率이 比較的 높았던 交雜種은 FR 1141/FR 16, B 68/A 116 N/KS 15, KS 16/KS 17, Ga 209/DB 578, SDB 126/Ga 209 등이었다.

眞珠조×Napier grass 交雜種의 節間伸長部位 組織培養에서는 切片의 크기를 달리하여 置床하였을 때 大部分 反應을 보여 callus가 形成되었다(表 5). Callus 量을 많게 하기 위해서는 切片의 크기를 2~3mm 로 작게 잘라서 組織培養을 하는 것이 有利하다고 생각된다. Pearl millet × Napier grass 種間交雜種은 種實이 生産되지 않으므로 營養繁殖으로 栽培面積을 擴大해야 하는 어려움이 있으나 이와

Table 5. Response frequencies in cultured elongating culms of pearl millet x Napier grass hybrid (Suwon, 1988)

Culm length plated, mm	Culms plated	Culms responded
2.5	2	1
3.0	1	1
3.5	2	1
4.0	2	1
7.0	2	2
9.0	1	0

Table 4. Response frequencies in cultured immature tassels of 20 corn hybrids (Suwon, 1988)

Hybrid	Immature tassels plated	Immature tassels responded	Percent response
KV1/Ga209	7	2	29
KS16/KS17	7	3	43
KS42/Hi39	6	1	17
Kwangok/B64	4	1	25
Ga209/DB578	7	3	43
B68/A116N/KS15	8	5	63
FR1141/FR16	6	1	17
FR1141/FR4326	8	5	63
FR1141/Va22	4	1	25
SDB126/Ga209	2	1	50
SDB59/Ga209	8	1	13
SDB11/Ga209	6	2	33
KI16A/Hix4263 and other 7 crosses	39	0	0
Total	112	26	23

Table 6. Response frequencies in cultured epicotyl, hypocotyl, node and leaf pieces of buckwheat (Suwon, 1988)

Variety	Plant parts plated	Pieces plated	Pieces responded	Percent responded	Regenerated plants
Shinnong 1	Epicotyl	45	37	82	1
	Hypocotyl	42	23	55	0
	Node	15	4	27	4
	Leaf	28	5	18	0

같이 節間伸長部位의 組織培養으로 增殖하면 短期間에 많은 量의 分化植物體를 얻을 수 있을 것이다.

메밀 信農 1號 植物體의 epicotyl, hypocotyl, 마디, 葉片組織을 MS와 B5 培地에 各各 置床하였을 때 epicotyl에서 callus가 가장 잘 形成되었고 다음이 hypocotyl이었다(表 6). 葉片에서는 callus 形成이 낮았다. 마디에서는 callus 形成段階를 거치지 않고 直接 植物體로 分化되었으며 植物體分化率は 27%이었다. Epicotyl에서 形成된 callus에서 도 1個의 植物體가 分化되었다.

他家受精作物인 옥수수, 眞珠조, 메밀의 藥 및 組織培養에서 現在까지 開發된 培地를 使用하였을 때 植物體部位의 組織培養은 比較的 成功的이었으나 特別히 옥수수 藥培養에서는 遺傳子型×培地 및 環境 相互作用이 있어 遺傳子型에 따라서 藥培養反應이 매우 다르게 나타났다. 옥수수 藥培養에 反應하는 遺傳子型的 藥도 callus 形成률이 매우 낮았다.

他家受精作物인 옥수수, 진주조 및 메밀의 藥培養에서 가장 重要한 制限要因들^{1,5,10,11,12,13}을 要約하여 보면, 1) 遺傳子型에 따라서 藥培養에 對한 反應이 다르고, 2) 藥과 雄穗採取時期 即 microspore의 生育程度에 따라서 藥培養에 對한 反應이 다르고, 3) 培地種類 및 培地構成成分의 量에 따라서 反應이 다르고, 4) 藥培養前의 前處理(低溫 또는 삼투압 처리) 및 培養溫度 등의 培養環境에 따른 反應이 다르게 나타났다. 따라서 옥수수를 비롯한他家受精作物的 藥培養을 成功시키기 위해서는 1) 藥培養이 잘 되는 遺傳子型들을 選拔, 利用하고, 2) 適當하게 자란 1核期의 microspore를 採取하여 置床하여야 하고, 3) 優秀한 培地를 選拔, 培地의 構成成分과 量을 調節, 改善하여 使用하고, 4) 藥培養始作前에 適當한 前處理, 培養溫度 등 適當한 培養環境을 組成해 주어야 한다.

摘 要

他家受精作物인 옥수수, 眞珠조, 메밀의 藥 또는

組織培養技術의 向上을 위한 遺傳子型 및 問題點들을 찾아내어 改善하기 위하여 1988年 作物試驗場 藥 및 組織培養 研究室에서 實施한 主要研究結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 옥수수 藥培養에서 FR 1141/FR 16 交雜種이 N6 培地에서, Fla 2 BT 73/S 6013 交雜種은 5℃에서 7日間 低溫前處理를 한 後 MS 培地에 置床하였을 때 callus가 形成되었으나 27 供試 交雜種의 全體 37,450 藥中에서 단지 두개만이 callus가 形成되었다.

2. 옥수수 水原 19號의 未熟胚를 MS 培地에 置床하였을 때 모두 callus가 形成되었으며 이 callus로부터 綠色體 分化率は 8.6%이었다.

3. 옥수수 水原 99號 등 20品種의 未熟雄穗培養에서는 FR 1141/FR 16, B68/A 116 N//KS 15, KS 16/KS 17, Ga 209/DB 578, SDB 126/Ga 209 交雜種 등에서 callus 形成률이 比較的 높았다.

4. 眞珠조×Napier grass 種間交雜種의 組織培養에서 稈의 組織培養에 適當한 節間伸長部位의 切片 크기가 2.5~4.0 mm 이었고 callus 形成률이 50~100%로 比較的 높았다.

5. 메밀 信農 1號의 植物體部位別 組織培養에서는 epicotyl에서 callus 形成이 잘 되었고 출기의 마디에서는 callus 形成段階를 거치지 않고 바로 植物體가 分化하였으며 植物體 分化率は 27%이었다. Epicotyl에서 誘導한 callus에서 1個의 植物體가 分化하였다.

6.他家受精作物인 옥수수, 진주조, 메밀의 遺傳子型×培地 및 環境 相互作用이 있어 遺傳子型에 따라서 藥 및 組織培養反應이 크게 달랐다.

引 用 文 獻

1. Armstrong, C.L. and R.L. Phillips. 1988. Genetic and cytogenetic variation in plants

- regenerated from organogenic and friable, embryogenic tissue cultures of maize. *Crop Science* 28 : 363-369.
2. Chu, C.C., et al. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica* 18 : 659-668.
 3. _____ 1978. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. *Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture*, pp.43-50. Science Press, Peking.
 4. Dujardin, M. and W.W. Hanna. 1989. Crossability of pearl millet with wild *Pennisetum* species. *Crop Sci.* 29 : 77-80.
 5. Green, C.E. and C.A. Rhodes. 1982. Plant regeneration in tissue culture of maize. *Maize for Biological Research*. pp.367-372.
 6. Ku, M.K., et al. 1978. Induction factors and morpho-cytological characteristics of pollen-derived plants in maize (*Zea mays*). *Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture*. pp.35-42. Science Press, Peking.
 7. Mejza, S.J., W.R. Krul and B.D. Kim. 1988. Picloram-induced plant regeneration from maize shoot segment. *Korean J. Breed.* 20(1) : 70-77.
 8. Miao, S.H. et al. 1978. Induction of pollen plants of maize and observations on their progeny. *Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture*. pp.23-33. Science Press, Peking.
 9. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.
 10. Nitsch, C., et al. 1982. Production of haploid plants of *Zea mays* and *Pennisetum* through androgenesis. *Variability in Plants Regenerated from Tissue Culture*. E.D. Earle and Y. Demarly, eds. Praeger Sci. Publ., New York.
 11. Petolino, J.F. and A.M. Jones. 1986. Anther culture of elite genotypes of maize. *Crop Sci.* 26 : 1072-1074.
 12. Sheridan, W.F. 1982. Anther culture of maize. *Maize for Biological Research*. pp. 389-396.
 13. Somers, D.A., R.L. Phillips and H.W. Rines. 1988. Corn and oat tissue cultures and genetic variation in regenerated plants. *Technical Bulletin No. 110* : 1-9. Food & Fertilizer Technology Center, ASPAC.