

벼에서 캘러스 유기원과 계대배양 기간에 따른 재분화 계통의 주요 농업형질 변이

이기환, 오병근, 양세준, 김순철, 남민희*
영남농업시험장

Variations of Agronomic Traits on the Progenies of the Different Callus Origin and Subculture Period in Rice

Gihwan Yi, Byeong-Geun Oh, Sae-Jun Yang, Soon-Chul Kim, Min-Hee Nam*

National Yeongnam Agricultural Experiment Station, RDA, 1085 Neidong, Milyang-gun, Gyeongnam 627-803, Korea

ABSTRACT Variations of agronomic traits were evaluated on the progenies of regenerated rice plants of different callus origin and subculture period. From eighty-eight percent to ninety percents of ovary culture-derived plants (OCP) and anther culture-derived plants (ACP) were not segregated within the lines in major agronomic characters. Compare to ACP and OCP lines, the seed culture derived lines (SCP) showed more segregation (17%) in major agronomic traits among the lines. The most frequent segregating traits were grain fertility (6.1%) in ACP, leaf color (4.2%) in OCP and grain fertility (4.9%) and leaf color (4.9%) in SCP lines. The SCP line showed more variation in culm length, panicle length and heading date than those of OCP and ACP lines. The variation of agronomic traits in SCP lines was tended to increase with prolonged subculture. Culm and panicle length were shorter than those of original cultivar in all three types of tissue culture-derived lines (OCP, ACP and SCP).

Key words: Unpollinated ovary culture, anther culture, embryo culture, agronomic traits, variation

서 론

계통육종법은 인공교배와 후대선발을 통하여 목적형질을 가진 안정된 계통을 육성해 낼 수 있다는 장점으로 인하여 벼를 비롯한 주요 작물 육종에 보편적으로 이용되어 왔다. 그러나 초기세대에 많은 개체 및 계통을 취급해야 하는 어려움이 따르고 품종육성에 소요되는 연한이 길어 급변하는 사회적 요구변화에 신속하게 대처하기 힘들다는 단점이 있다. 한편 반수체 육종법은 동형접합체를 만드는데 소요되는 기간이 짧아 품종육성 연한을 단축시킬 수 있으며 선발의 효율이 높다는 등의 장점으로 인하여 벼를 비롯한 일부 작물에서는 이미 신품종이 육성 보급되어 실용화단계에 도달해 있는 상태이다. 세포배양을 통한 반수체 획득 방법은 웅성생식기관인 화분소포자를 이용하는 약배양법과 자성생식기관인 미수분

자방이나 배주를 기내에 배양하는 미수분자방 및 배주배양법이 있으며 벼 (Zhou and Yang 1980)를 비롯하여 보리, 밀, 옥수수 등 작물에서 이미 성공적인 식물체재분화가 보고되고 있다 (San and Gelebart 1986). 벼에 있어서 자성생식기관인 미수분 자방이나 배주배양에 의한 반수체 생산분야는 그 효율성 면에서 약배양에 비해 크게 뒤떨어지고 있으며 지금까지 행하여진 연구의 대부분도 반수체의 생성기원이나 (He and Yang 1988) 배양효율에 영향을 미치는 요인 (Yi et al. 1996; Sohn et al. 1997) 등으로 국한되고 있다. 반수체 육종법이 육종의 한 방법으로 널리 이용되기 위해서는 genotype 간의 재분화 능력의 차이, 백색체의 발생 그리고 분화후대의 유전적 안정성 등이 해결되어야 할 문제로 대두되고 있다 (Niizeki 1983). 기내배양을 통하여 분화된 식물체는 배지내 mutagen의 첨가 없이도 변이체가 출현한다는 것은 사탕수수를 비롯한 여러 작물에서 보고되고 있는데 (Larkin and Scowcroft 1981), 벼에서도 원형질체배양 후대 (Ogura et al. 1989), 체세포 배양 후대 (Sohn et al. 1991), 약배양 후대 (Shen et al. 1983; Sohn et al.

*Corresponding author Tel 055-350-1181 Fax 055-352-3059
E-mail nammhee@rda.go.kr

1995)에서 이러한 변이체의 출현이 보고되고 있다. 세포배양 후대에서 나타나는 체세포 변이의 원인으로는 염색체의 수적·구조적 이상, 유전자의 돌연변이, 전이인자의 활성화, DNA methylation 등이 추정되고 있지만 그 자세한 기작이나 원인은 DNA level에서 깊이 연구되어야 할 분야이다 (Larkin and Scowcroft 1981). 배양후대의 유전적 안정성과 변이체의 발생은 유전자원의 획득과 발굴이라는 점에서는 세포배양의 새로운 이용분야로 연구되어야 하지만 분화 후대의 유전적 안정성을 떨어뜨린다는 점에서는 불리한 요소로 작용하기도 한다. 체세포 변이체의 발생에 대한 분자학적 연구는 벼에서 전이인자의 일종인 Tos 17과 같은 retroelement 들이 조직배양을 할 경우 활성화된다는 것이 알려지면서 시작되었다 (Hirochika et al. 1996). 또한 자포니카와 인디카 벼에 대한 유전자 염기서열 해독이 완료되면서 데이터베이스 탐색을 통하여 전이인자의 일종인 mping이라고 부르는 MITE (Miniature Inverted-repeat Transposable Element)가 알려졌다 (Jiang et al. 2003). MITE는 특이하게 약배양을 하였을 경우 높은 빈도의 활성이 일어나는 것으로 알려져 약배양 후대의 변이체 발생의 한 원인으로 생각되고 있다 (Kikuchi et al. 2003). 따라서 본 연구에서는 벼의 배양부위별로 식물체를 재분화시켜 분화후대에서 발생하는 체세포변이의 빈도와 종류 등을 조사하고 이들 변이체의 발생 원인을 구명하기 위한 기초자료로 이용하고자 수행되었다.

재료 및 방법

세포배양 후대개체 양성

본 실험에 사용한 벼는 영남농업시험장 벼 육종포장에서 표준재배법으로 재배한 자포니카형인 “화영벼”를 이용하였다. 약배양과 자방배양은 수잉기에 1핵성 소포자의 화분을 갖는 이삭을 채취하여 12°C에서 15일간 암상태에서 저온처리 후, 약 및 미숙자방을 N₆-Y₁배지 (Chung and Sohn 1986)에 치상하여 1달간 캘러스를 유도하였다. 현미배양을 위해서는 완숙 현미를 1% sodium hypochlorite 용액에 30분간 표면살균 후 캘러스 유기배지에 이식하여 배반부위에서 1달간 캘러스를 유도하였다. 계대배양 기간에 따른 분화후대의 주요 농업형질을 조사하기 위하여 현미배양에서 유기된 캘러스의 일부 (지름 1mm 크기)를 무작위로 선발하여 2주 간격으로 캘러스 유기배지에 계대 하면서 1~2 달 후 식물체 분화배지로 이식하여 식물체를 분화시켰다. 식물체 재분화는 25°C, 명조건 (2,500 Lux, 14시간 조명)의 배양실에서 1달간 페트리디쉬 (φ87×H 12 mm)에서 분화하였다. 분화된 식물체는 식물체 분화배지와 조성이 같은 배지가 담긴 광구배양병에 이식하여 30일간 더 배양하여 생육시켰다. 분화식물체는 배양병의 뚜껑을 열고 1/3 가량 증류수를 부은 다음 배양실에서 4일간 순화 후 온실에 이양하였다. 약배양, 자방배양, 현미배양에 사용한 배지 및 생

장조정제의 조성은 Table 1에서와 같다.

세포배양 후대의 주요 농업형질 조사

약배양, 자방배양 및 현미배양으로부터 분화된 식물체는 '96/'97년 동계 온실에 재배하여 종자를 채종하였으며 약배양 및 자방배양에서 분화된 개체는 염색체가 자연적으로 배가된 개체에서만 종자를 수확하였다. 이들 집단들의 계통재배를 위해 '97년 5월 16일 상자에 파종하여 6월 12일 재식거리 30×15 cm로 주당 1본씩 포장에 이양하였으며 기타 재배법은 벼표준재배법에 준하였다. 약배양 (A₁), 자방배양 (O₁), 현미배양 (S₁) 후대계통들의 농업적 특성조사는 농사시험연구조사기준 (R.D.A 1995)에 준하였으며 통계분석을 위해서 각 계통당 5개체를 조사하여 평균을 구하였다. 모품종의 신뢰한계 ($\alpha=0.05$)를 벗어나는 것을 변이체로 구분하고, 염색, 입성 및 초형 등의 형태적 특성은 육안으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

약배양 (A₁), 자방배양 (O₁) 그리고 현미배양 (S₁)으로부터 분화된 후대계통들의 주요 농업적 형질 고정도를 조사하고 이를 캘러스 유기원별로 상호 비교하여 본 바 (Table 2), 약배양 후대에서는 89.8%인 88계통이 계통내 분리를 보이지 않았으며 자방배양에서는 87.9%인 211계통이 분리를 보이지 않아 약배양과 마찬가지로 자방배양 후대에서도 반수체 육종의 목적인 형질 고정도가 높은 것으로 나타났다. 반면에 현미배양 후대계통의 고정도는 82.6%로 약배양과 자방배양에 비하여 체세포배양 후대에서 고정도가 다소 낮은 경향이였다. 또한 현미배양 유래의 캘러스를 1달과 2달 계대배양한 다음 재분

Table 1. Media and hormone compositions of callus induction and plant regeneration of anther, ovary and seed culture.

	Medium	Medium Supplements
Callus induction		
Anther culture	N ₆ -Y ₁	NAA 2mg/l, kinetin 0.5mg/l, sucrose 2%, glucose 3%, Gelrite 0.5%
Ovary culture	N ₆ -Y ₁	2,4-D 1mg/l, ABA 5mg/l, sucrose 3%, Gelrite 0.5%
Seed culture	N ₆	2,4-D 1mg/l, ABA 5mg/l, sucrose 2%, sorbitol 3%, Gelrite 0.5%
Plant regeneration		
Anther culture	N ₆ -Y ₁	Kinetin 0.5mg/l, IAA 0.5mg/l, sucrose 2%, glucose 3%, Gelrite 0.5%
Ovary culture	N ₆ -Y ₁	NAA 1mg/l, kinetin 5mg/l, sucrose 3%, Gelrite 0.5%
Seed culture	N ₆	NAA 1mg/l, kinetin 5mg/l, sucrose 2%, sorbitol 3%, Gelrite 0.5%
Subculture	N ₆	2,4-D 1mg/l, ABA 5mg/l, sucrose 2%, sorbitol 3%, Gelrite 0.5%

화한 후대계통의 경우 고정도가 73.3%와 70%로 낮아졌다. 주요 형질별 분리양상을 보면 약배양에서는 임성이 6.1%로 가장 빈도가 높았으며 자방배양에서는 엽색 (4.2%), 현미배양에서는 엽색 (4.9%), 임성 (4.9%) 순으로 높았다. 캘러스를 1달과 두달 계대배양한 후대의 경우 간장에서 각각 8.9%와 10.0%로 높게 나타났다. Oono (1978)는 벼 약배양 후대집단에서 모품종과는 다른 변이체의 출현을 보고하면서 엽색, 출수기, 간장, 임성 등의 변이체가 관찰되었다고 하였다. Sohn et al. (1991)도 체세포배양 후대계통을 대상으로 한 농업형질조사에서 이와 유사한 보고를 하였다. Park et al. (1999)은 약배양, 미수분자방배양 및 현미배양 후대의 주요 농업형질변이는 약배양, 미수분자방배양, 현미배양 순이라고 보고하여 본 실험과 일치하는 경향이였다. 본 실험의 결과로 볼 때 자방배양으로부터 분화된 계통들도 약배양과 마찬가지로 형질의 고정도가 높아서 반수체 육종의 한 방법으로 이용될 수 있는 가능성을 나타내었다. 약배양, 자방배양 및 현미배양 후대계통들의 간장, 수장, 출수기에 대한 변이성 정도를 조사한 바 (Table 3), 배양방법에 따라 체세포배양 후대계통이 약배양 및 자방배양보다 변이가 크게 나타났으며 형질별로는 간장과 수장의 평균은 모품종인 화영벼에 비하여 다소 줄어드는 경향이였고 간장과 수장에 대한 변이계수는 현미배양 후대계통에서 가장 높게 나타났으며 출수기는 약배양과 자방배양 후대보다는 현미배양 후대에서 다소 늦어지는 경향이였다. Schaeffer (1982)는 Calrose 76의 약배양 후대 (R_3)집단의 간장 평균은 모품종보다 15~30% 정도 줄어들었다고 하였다. Lim et al. (1998)도 약배양과 현미배

양으로부터 분화된 집단 (R_2)의 쌀이화학적 특성 변이를 보고 하면서 세포배양후대의 간장과 수장이 줄어드는 경향이였으며, 특히 현미배양후대에서 간장과 수장이 유의성 있게 줄어들었다고 하여 본 실험의 결과와 일치하였다. 이는 세포배양 후대들의 공통된 특징이라고 생각되며 이러한 변이의 원인 구명에 대해서는 보다 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다. 계대배양의 기간이 1달에서 2달로 늘어나면서 변이체의 발생빈도는 증가하는 경향이였는데 Hirochika et al. (1996)은 현미배양후대 캘러스의 retrotransposon 활성화를 보고하면서 캘러스의 계대배양 기간이 길어질수록 Tos 17의 전이율이 증가한다고 하여 retrotransposon의 활성화 증가가 계대배양 기간에 따른 변이체의 발생빈도 증가의 한 원인으로 기인한 것으로 생각된다. Yi et al. (1999) 약배양, 자방배양, 현미배양에서 유래된 변이체의 retrotransposon 활성화를 보고하면서 변이체의 47%에서 Tos 17의 copy 수나 transposition이 관찰되었다고 하였다. 이상의 결과를 종합하여 보면, 벼 세포배양에서 분화된 개체들은 모품종과 같은 개체뿐만 아니라 여러가지 변이체들이 다수 출현 하였으며 그 빈도는 생식세포인 약이나 미수분자방 배양보다는 체세포인 현미배양후대에서 증가하는 경향이였다. 또한 체세포변이의 발생빈도는 계대배양 기간이 길어질수록 높아지는 경향이였다. 미수분 자방배양에서 분화한 개체들도 약배양에서와 마찬가지로 반수체 육종의 원래 목적인 형질의 고정도가 높아 약배양의 보조적인 수단으로 이용될 수 있을 것으로 생각되며 이러한 체세포변이의 발생 원인에 대해서는 분자학적 수준에서의 보다 많은 연구가 수

Table 2. Phenotypic uniformity of progenies derived from anther, ovary seed culture of "Hwayeong".

Culture source	Total	No. of homozygous lines (%)	No. of segregating lines (%)					
			Sub. total	Leaf color	Grain fertility	Culm length	Heading date	Multiple character
Anther	98 (100)	88 (89.8)	10 (10.2)	1 (1.0)	6 (6.1)	3 (3.1)	2 (2.0)	0
Ovary	240 (100)	211 (87.9)	29 (12.1)	10 (4.2)	8 (3.3)	4 (1.7)	0	7 (2.9)
Seed	144 (100)	119 (82.6)	25 (17.4)	7 (4.9)	7 (4.9)	6 (4.2)	1 (0.7)	4 (2.8)
SC 1	45 (100)	33 (73.3)	12 (26.7)	4 (8.9)	1 (2.2)	4 (8.9)	1 (2.2)	2 (4.4)
SC 2	20 (100)	14 (70.0)	6 (30.0)	1 (5.0)	1 (5.0)	2 (10.0)	0	2 (15.0)

* SC 1 : 1 month subcultured callus from seeds.

SC 2 : 2 month subcultured callus from seeds.

Table 3. Comparison of agronomic traits among anther, ovary, seed culture-derived plants.

Culture source	Culm length (cm)		Panicle length (cm)		No. of Panicle		Days to heading	
	Mean±SD	CV	Mean±SD	CV	Mean±SD	CV	Mean±SD	CV
Anther	70.0±4.6	6.6	19.7±1.1	5.7	13.3±1.8	11.9	108.0±1.3	1.2
Ovary	70.7±4.4	6.2	20.7±0.8	4.1	12.4±2.2	18.0	107.4±2.1	1.9
Seed	66.4±2.3	3.4	20.3±1.2	5.9	14.5±2.3	15.8	107.1±0.9	0.9
SC 1	67.2±3.9	5.7	20.3±0.8	3.9	12.9±1.3	10.3	107.8±0.8	0.7
SC 2	66.8±3.3	5.0	20.5±1.4	6.9	13.4±2.7	19.8	108.1±0.7	0.7
Donor cultivar	71.3±2.1	3.0	21.2±0.9	4.1	13.6±2.0	14.5	107.3±0.6	0.6

* SC 1 : 1 month subcultured callus from seeds.

SC 2 : 2 month subcultured callus from seeds.

행되어야 할 것으로 생각된다.

적 요

벼의 미수분 자방배양으로부터 분화된 후대집단 (O₂)의 주요 농업적 형질특성을 조사하고 이를 약배양 및 현미배양으로부터 분화된 후대집단과 상호비교하여 본 바, 주요농업형질의 계통내 고정도는 자방배양에서 87.9%, 약배양에서는 89.8%, 현미배양은 82.6%로 나타나 약배양과 마찬가지로 자방배양에서도 고정도가 높았다. 주요 형질별 분리양상을 보면 자방배양에서는 엽색이 4.2%로 가장 빈도가 높았으며, 약배양에서는 임성 (6.1%), 현미배양에서는 엽색 (4.9%), 임성 (4.9%)순이었다. 또한 캘러스를 1달과 2달 계대배양한 후대의 경우 간장에서 각각 8.9%와 10.0%로 분리하는 형질의 계통비율이 높게 나타났다. 간장, 수장, 출수기에 대한 변이성 정도는 자방배양에서는 약배양과 비슷한 정도의 변이를 보인 반면, 현미배양에서는 크게 나타났으며 간장과 수장의 평균은 모두 모품종인 화영벼에 비하여 줄어들었고 출수기는 다소 지연되는 경향을 보였다.

인용문헌

- Chung KS, Sohn JK (1986) Varietal improvement using anther culture of rice. Annual Report of National Yeongnam Agricultural Experiment Station, Vol. 2, pp 11-261
- He CP, Yang HY (1988) On the stability of synergid apogamy in rice ovary culture and its developmental conditions, J Wuhan Bot Res 66: 203-208
- Hirochika H, Sugimoto K, Otski Y, Tsugawa H, Kanda M (1996) Retro trans- posones of rice involved in mutations induced by tissue culture. Proc Natl Acad Sci USA 93: 7783-7788
- Jiang N, Bao Z, Zhang X, Hirochika H, McCouch S, Wessler SR (2003) An active DNA transposon family in rice. Nature 421: 163-167
- Kikuchi K, Terauchi K, Wada M and Hirano HY (2003) The plant MITE mping is mobile in anther culture. Nature 421: 167-170
- Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Somaclonal Variation- A Novel source of variability from cell culture for plant improvement. Theor Appl Genet 60: 197-214
- Lim SJ, Hwang HG, Oh BG, Kwak DY, Yi GH and Park NB (1998) Variation of physicochemical characteristics of grain in rice plants derived from cell culture. Korean J Breed 40: 9-13
- Niizeki H (1983) Uses and application of anther and pollen culture in rice. In: Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement, Science Proceedings of a workshop cosponsored by the Institute of Genetics, Academia Sinica and The international Rice Research Institute, Science Press Beijing, China and International Rice Research Institute, pp 165-171
- Ogura HK, Yasuyuki, JH and Shimamoto K (1989) Yielding ability and phenotypic traits in the selfed progeny of protoplast-derived rice plants. Japan J Breed 39: 7-56
- Oono K (1978) Test tube breeding of rice tissue culture. Trop Agric Res Series 11: 109-124
- Park Y, Kim KM, Kwon YS, Sohn JK (1999) Variation of agronomic characters in the progenies derived from unpollinated ovary, anther, and seed culture of rice. Korean J Breed 31: 378-385
- Rural Development Administration (1995) Standard evaluation of agronomic research. pp 490-510
- San LH, Gelebart, P (1986) Production of gynogenic haploids, In: Vasil I, (ed), Cell Culture and Somatic Genetics of Plants, Vol. 3, Academic Press, Orlando, Florida, pp 305-322
- Scheaffer GW (1982) Recovery of heritable variability in anther derived doubled-haploid rice. Crop Sci 22: 1160-1164
- Shen JH., Li MF, Chen YQ, Zhang ZH (1983) Improving rice by anther culture, In: Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement, Science Press, Beijing, China and IRRI, Manila, Philippines, pp 183-205
- Sohn, JK, Kwon OH, Cheong ST, Rhee IK (1991) Variation of agronomic characters in regenerated plants from callus culture of rice. Korean J Breed 23: 181-187
- Sohn JK, Yi GH, Oh BG and LIM SJ (1995) Variation of some agronomic traits in anther-derived rice plants. Korean J Breed 27: 404-408
- Sohn, JK., Kwon YS and Kim KM (1997) Factors affecting plant regeneration in unpollinated ovary culture of rice. Korean J Plant Tissue Culture 24: 319-322
- Yi GH, Sohn JK, Oh BG, Kim HY (1996) Plant Regeneration from unpollinated ovary culture in rice. Korean J Breed 28: 190-193
- Yi GH, Nam MH, Oh BG, Choi HC, Kim SC, Han CD, Sohn JK (1999) Activation of retrotransposon in plant variants derived from rice cell culture. Korean J Breed 31: 341-347
- Zhou C, Yang HY (1980) In vitro induction of haploid plantlets from unpollinated ovaries of *Oryza sativa* L. Acta Genet Sin 7: 287-288

(접수일자 2003년 11월 1일, 수리일자 2003년 12월 2일)