

Comparative Analysis of Callus Induction and Plant Regeneration Rates Using One-step and Two-step Cultures for Rice Anther Cultivation

Young-hie Park*

Department of Agricultural Sciences, Korea National Open University, 86 Daehak-ro, Jongro-gu, Seoul 03087, Korea

Received August 20, 2020 / Revised November 12, 2020 / Accepted January 9, 2021

Anther cultivation for crop breeding is a method of rapid production of homozygosities by greatly reducing the time required for at least six generations to develop new varieties using conventional breeding methods. This technique of producing anther culture provides an opportunity to obtain more green plants from a methodological point of view, and the techniques that save time and effort in anther culture are also important because they increase the efficiency of culture. This study compared the callus induction rate and green plant regeneration rate of a one-step and a two-step culture that differ in their culture media and culture methods. One-step culture allows callus induction and plant regeneration in one medium, whereas two-step culture requires induction and plant regeneration in two different media. In this study, we compared the callus induction and plant regeneration rates of rice anthers as one-step and two-step cultures. The callus formation rate was 13.0% for one-step cultures and 8.6% for two-step cultures, so the rate was 4.4% higher for one-step cultures than for two-step cultures. The plant regeneration rate was 1.0% in one-step cultures and 3.0% in two-step cultures, so the regeneration rate was three times higher for the two-step cultures than for one-step cultures. This suggests that the two-step cultures are more efficient than the one-step cultures for haploid production.

Key words : Anther, breeding, callus, crop, medium

서 론

화분소포자로부터 유래된 벼 반수체 식물의 생산은 1960년대에 처음 보고되었으며, 그 이후 다양한 방법들로 진행된 대규모의 연구들은 세계적으로 동정 생식과 약배양 기술로 수행되었다(Moon et al. 1986). 작물육종에서 분리된 소포자 배양은 재래육종방법으로 신품종을 개발하는데 적어도 6세대가 요구되는 시간을 대폭 줄여줌으로써 동질 이배체를 빠르게 생산 할 수 있는 방법이며, 또한 반수체는 mutation (Chen et al. 2001) 이나 hybridization (He et al. 2006)으로 인해 도입된 좋은 열성 특성 들을 보호하거나 복구 하는데 유용하다. 약배양을 통해서 완전한 식물체를 만드는 기술은 방법론적 측면에서 녹색체를 더 많이 얻어낼 수 있는 기회를 제공하며, 약배양은 시간과 노력을 절약 할 뿐만 아니라 배양 효율을 증가 시켜주기 때문에 매우 중요한 기술이다. 약배양 개체는 벼의 꽃가루 배양을 거쳐 재분화 되었으며, 이는 일반적으로 캘러스 유도, 식물체 재분화 단계의 Two-step culture로 이루

어져 왔다(Kim et al. 2004, Yi et al. 2003). 2 mg/l 2,4-D가 함유된 캘러스 유도 배지에서는 식물체의 재분화가 일어날 수 있다고 보고되었으며(Liang et al. 1987), 식물체 재분화 빈도의 증가와 재분화에 걸리는 기간은 식물 성장조절제의 농도와 여러 조합을 통해서 바뀔 수 있다고 보고된 바 있다(Chung et al. 1996). 이러한 현상을 토대로 약을 식물체 재분화 배지에 옮길 필요 없이 직접 발생시키는 One-step culture 기술이 발전 되어 왔다. One-step 방법은 약 배양 후 재분화 배지로 옮겨 줄 필요가 없기 때문에 많은 시간과 노력을 절약할 수 있다. 또한 이는 성장 조절제, 배지의 굳기, 질소원과 배양 용기 등의 집중적인 연구를 통해 계속적으로 캘러스 유도 효율 및 식물체 재분화 효율을 향상시켜왔다. 실제로 약배양의 효율은 배양에 이용되는 배지의 조성, 재료의 상태, 배양 방법과 배양 환경 등에 따라서 큰 차이를 보이는 것으로 알려져 있다(Henry et al. 1994). 이외에 주요한 약배양 기술로는 적절한 단계의 화분의 상태, 효과적인 화분 절개 방법, 저온 전처리, 배양 용기, 배양 조건과 동시에 효율 높은 순화 방법 등이 있다. 본 연구에서는 배지 조성 및 배양 방법이 다른 One-step culture와 Two-step culture의 캘러스 형성률 및 식물체 재분화률을 비교하여 One-step과 Two-step culture의 방법 중 어느 방법이 약배양 개체의 생산에 더 효과적인지 비교하였다.

재료 및 방법

식물 재료와 전처리 과정

*Corresponding author

Tel : +82-2-3668-4630, Fax : +82-2-3673-2381

E-mail : yhpark0811@knou.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

본 실험의 식물 재료로는 재래식 벼 품종 일미(*Oryza sativa* L.)를 이용하였다. 그리고 내건성 유전자 CaMsrb2가 벼 염색체 1번과 8번 염색체에 각각 안정적으로 들어간 것 확인된 6세대 HV8 과 HV23 식물체를 사용하였다. 이들 식물체 집단들은 2015년 4월 29일에 파종 하였다. 재배 방법은 각 계통 및 모부분은 집단 당 1열씩, 주당 1본, 재식 밀도는 30×15 cm으로 하였다. 그리고 시비량은 N-P₂ O₅-K₂O = 9.0-4.5-5.7kg/10a, 인산, 가리질 비료는 전량 기비로 사용하였고, 질소질 비료는 기비 70%와 분얼비 30%로 분시 하였다. 제초제 및 살충제 살포는 병해충 방제 및 포장 관리는 농촌진흥청 벼 표준 재배법에 준하여 실시하였다. 식물체들은 이삭이 출수 될 때까지 재배되었다. 이삭이 출수되기 20일전 15일 동안 10℃에서 암 상태로 저온 처리 하였다. 약의 발육 단계는 엽이 간장(2-5 cm)과 이삭 껍질 내의 약 선단 위치(1/2~1/3)를 기준으로 판단하였다.

약(藥)의 캘러스 유도과 식물체 재분화

약 배양을 실시하기 전 75% 에탄올을 이용하여 표면 살균하였고, 약 배양의 모든 과정은 클린벤치에서 실시하였다. 벼의 잎집에서 이삭을 꺼내어 각 지경을 분리 하였으며, 멸균 건조된 5 cm 여과지(ADVENTEC, Japan)위에 두고 작업하였고, 화사 1/3 부분을 가위로 절단한 후 화영을 핀셋으로 열어 배지에 치상 하였다. One-step culture 과정에의 캘러스 유도는 N6-Y1 배지에 NAA 1 mg/l, Kinetin 2 mg/l, Maltose 40 g/l, Gelrite 4 g/l를 첨가 하였고, pH 5.8로 맞추었다. 이후 고압증기멸균기(DAIHAN LABTECH CO, LTD Korea)를 사용하여 121℃에서 15분간 고압 멸균 후 petri dish에 분주하여 사용하였다. Two-step culture 과정의 캘러스 유도는 N6-Y1배지에 NAA 2 mg/l, Kinetin 0.5 mg/l, Maltose 40 g/l, Gelrite 4 g/l를 첨가 하였으며, pH 5.8로 맞추는 다음, 121℃에서 15분간 고압 멸균 후 분주하여 사용하였다. 캘러스의 유도는 20일 동안 26±1℃에서 암배양 하였다. 캘러스 유도율은 암조건에서 20일간 배양한 후 캘러스가 생성된 약의 수 / 치상한 약의 총 개수를 백분율로 표현 하였으며, 반복 실험간 편차를 표준편차로 나타내었다. Two-step culture에서 식물체 재분화는 잘 형성된 캘러스를 N6-Y1배지에 IAA 1 mg/l, Kinetin 2 mg/l, Gelrite 4 g/l가 첨가된 배지에 옮겨 주었고, 각 petri dish 당 1 mm 직경 크기 캘러스를 10개씩 치상 하였다. 그리고 식물체 재분화는 온도 26±1℃, 광도 및 광주기 2,500 Lux, Day/Night 16/8시간 조건에서 유도되었다. 식물체 재분화율은 재분화된 식물체의 개수/치상한 캘러스의 총 개수로 계산 하였다. 재분화된 유식물체는 MS배지에 NAA 1 mg/l, Kinetin 5 mg/l, Casein 2 g/l, Sucrose 30 g/l, Gelrite 6 g/l를 첨가하여 직경 2.5 cm, 길이 20 cm의 고압 멸균된 시험관에 분주하였으며 45°로 굳힌 사면배지에 계대 배양하였다. 배양 조건은 온도 26±1℃, 광도 및 광주기 2,500 Lux, Day/Night

16/8시간 조건의 배양실에서 배양 하였다.

기외순화

재분화 식물체는 기외로 순화하기 위하여 32 사각 범농 트레이(BUMNONG, Korea)와 부농 수도용 상토(PUNONG, Korea)를 이용하여 포트를 만들고, 이식시 식물체 뿌리를 다치지 않도록 하기 위해 상토가 수분을 충분히 머금을 수 있게 관수한 뒤 이식을 준비하였다. 그리고 재분화 식물체가 이유키를 지나 4엽기에 들어갈 때 경북대학교 부속농업실습장 유리온실에서 사면배지로부터 포트로 기외순화를 실시하였다. 식물체들은 시험관에서 배지와 함께 꺼내어 증류수로 뿌리에 붙은 배지를 깨끗이 씻어낸 뒤 준비한 트레이에 식물체를 이식하였고, 트레이 위에 랩을 감아 7일 주기로 상부에 뚫은 구멍 수를 늘려 서서히 순화 하였다. 이후 트레이로 이식한 날로부터 4주 뒤에 고무 포트에 이식하여 초형을 확인하였다.

결과 및 고찰

캘러스 유도과 식물체 재분화

Ilmi, HV 8, HV 23의 약은 one-step과 two-step 방법을 이용하여 치상 하였다. 배지에 치상 후 15일이 지났을 때 육안으로 알아보기 힘든 크기의 캘러스가 조금씩 생겨나기 시작했으며, 30일이 지난 후에는 육안으로 확인 할 수 있을 만큼의 캘러스가 형성 되었다. One-step 방법을 이용했을 때 캘러스 유도율은 Ilmi 17.8%, HV8 8.7%, HV23 12.4%이었으며, Two-step 방법을 이용했을 때 캘러스 유도율은 Ilmi 11.5%, HV8 5.9%, HV23 8.5%이었다. One-step과 Two-step 방법에서의 평균적인 캘러스 형성률은 One-step 에서는 13.0%, Two-step에서는 8.6%로 One-step 방법을 이용했을 때가 Two-step 방법을 이용하는 것보다 4.4% 정도 캘러스 형성률이 높았다(Table 1). 이러한 결과는 앞으로 벼 약배양을 하는데 있어서 많은 시간 단축과 높은 효율성을 나타낼 수 있다. 또한 One-step 배양은 캘러스 형성 기간을 단축시킬 뿐 아니라 변이 형성률을 감소시키며, 재분화를 위해 캘러스를 옮겨주지 않아도 되기 때문에 노동 절약의 효과도 있다(Fig. 1). 약 배양 20일 후 현미경을 이용하여 Globular pro-embryo callus를 관찰하였다. 캘러스의 유도는 벼의 약에서 외부 영역의 세포가 분열하면서 시작된다. One-step을 이용하여 약을 배양 했을 때는 캘러스가 작고 규칙적인 모양을 나타냈으며, 조밀하게 모여 있었다. 반면 Two-step을 이용하여 약을 배양 했을 때 캘러스는 덜 치밀하고, 느슨하게 배치되었으며 불규칙한 모양을 형성 하였다(Fig. 2A, Fig. 2B).

벼 약배양을 했을 때 식물체 재분화율은 One-step에서 Ilmi 1.7%, HV8 0.7%, HV23 0.6%로 나타났고, Two-step에서 Ilmi 6.9%, HV8 1.0%, HV23 1.2%로 나타났다. One-step 방법을 이용했을 때 평균 재분화율은 1.0% 였으며, Two-step 방법을

Table 1. Callus formation rate of one-step culture and two-step culture

Genotype of rice	The number of anthers inoculated		The number of calli from anthers (%)	
	One step	Two step	One step	Two step
Ilmi	3,293	4,667	587±34.5 (17.8)	536±10.0 (11.5)
HV8	4,062	3,711	354±21.5 (8.7)	218±18.0 (5.9)
HV23	2,403	2,639	297±52.5 (12.4)	223±10.5 (8.5)
Total	9,758	11,017		
Average			412.7 (13.0)	325.7 (8.6)

Mean ± standard deviation.

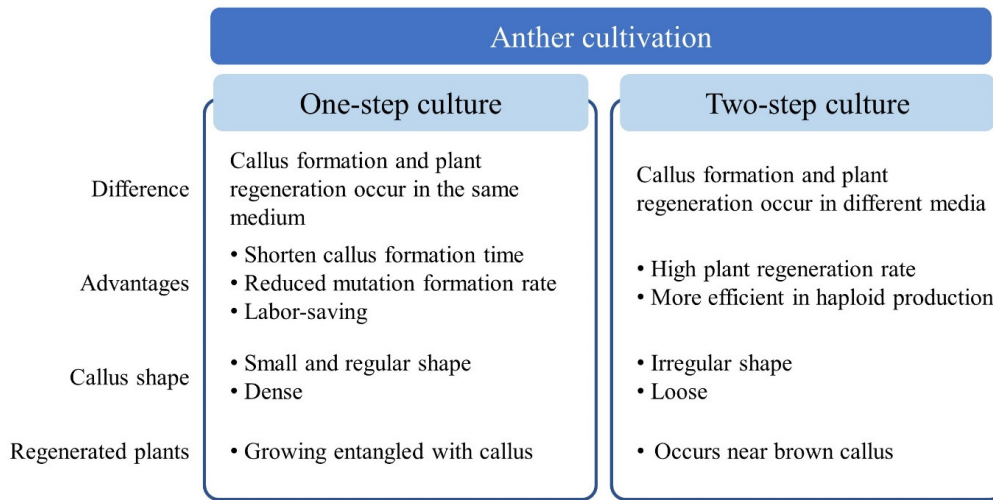


Fig. 1. Differences between one-step culture and two-step culture.

이용했을 때 평균 재분화율은 3.0%로 나타났다. 식물체 재분화율은 One-step 방법을 사용하는 것 보다 Two-step 방법을 사용했을 때 더 높게 나타났다(Table 2).

Chen et al. (1991)은 약 으로부터 캘러스가 형성 되는 빈도는 식물체의 유전자형과 밀접한 관련이 있다고 보고 하였다. One-step 배양에서 식물체의 재분화는 캘러스와 함께 얻히고 자랐지만, Two-step 배양에서는 갈색 캘러스 근처에서 식물체의 재분화가 일어났다(Fig. 2C, Fig. 2D). 이러한 결과는 캘러스 유도 및 식물체의 재분화가 독립적으로 이루어진다는 이전의 결과와는 다르게 나타났다.

작물육종에서 격리된 소포자 배양은 재래육종방법으로 신품종을 개발하는데 적어도 6세대가 요구되는 시간을 대폭 줄

여줌으로써 동질이배체를 빠르게 생산하는 방법이다. 이처럼 약배양 개체를 만드는 기술은 방법론적 측면에서 녹색체를 더 얻어낼 수 있는 기회를 제공하며, 약배양에서 시간과 노력을 절약하는 기술은 배양 효율을 증가시키기 때문에 중요하다. 배지조성 및 배양방법이 다른 One-step culture와 Two-step culture의 캘러스 형성률과 녹색체 재분화율을 비교하여 2가지 방법 중 어느 방법이 약배양 개체의 생산에 더 효과적인지 비교하고자 이 실험을 진행하였다. One-step culture은 하나의 배지에서 캘러스 유기와 식물체로의 재분화가 가능하지만 Two-step culture은 캘러스 유기와 식물체로의 재분화를 서로 다른 배지에서 시행하는 방법이다. 본 연구에서는 벼 약을 One-step culture과 Two-step culture을 이용하여 캘러스

Table 2. Plant regeneration rate of one-step culture and two-step culture

Genotype of rice	The number of anthers inoculated		The rate of calli from anthers (%)		The rate of plants Regenerated (%)	
	One step	Two step	One step	Two step	One step	Two step
Ilmi	3,293	4,667	17.8	11.5	1.7	6.9
HV8	4,062	3,711	8.7	5.9	0.7	1.0
HV23	2,403	2,639	12.4	8.5	0.6	1.2
Total	9,758	11,017				
Average			13.0	8.6	1.0	3.0

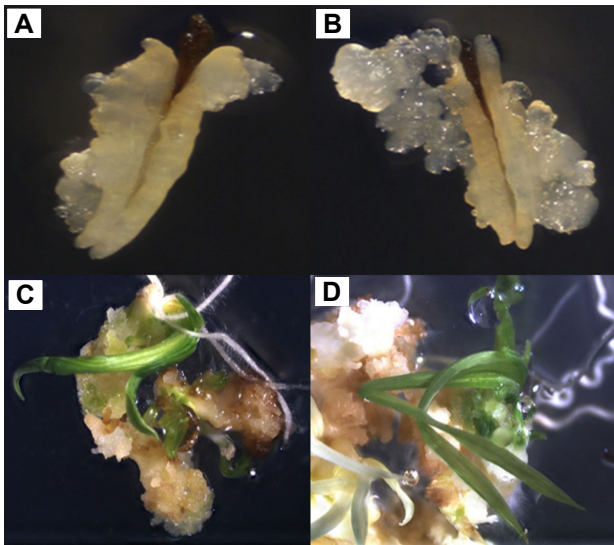


Fig. 2. Microscopic photograph of the callus induction and plant regeneration from the One-step and Two-step culture. A, callus induction in One-step culture; B, callus induction in Two-step culture; C, plant regeneration in One-step culture; D, plant regeneration in Two-step culture.

유기 및 식물체 재분화율을 비교하였다. 캘러스 형성률은 평균적으로 One-step culture가 13.0%, Two-step culture가 8.6%로 나타났고, One-step culture의 비율이 Two-step culture의 비율보다 4.4% 정도 높게 나타났다. 식물체 재분화율은 One-step culture에서 1.0%, Two-step culture에서 3.0%로 Two-step culture의 재분화율이 One-step culture보다 3배 더 높게 나타났다. 이를 보아 Two-step culture가 One-step culture보다 약배양을 통한 반수체 생산에 있어 효율이 더 높다고 생각된다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Chen, Q. F., Wang C. L., Lu Y. M., Shen M., Afza, R., Duren, M. V. and Brunner, H. 2001. Anther culture in connection with induced mutations for rice improvement. *Euphytica* **120**, 401-408.
2. Chung, G. S. and Sohn, J. K. 1996. Anther culture technology in rice. In *Management Biotechnology* 1-9.
3. He, T., Yang, Y., Tu, S. B., Yu, M. Q. and Li, X. F. 2006. Selection of interspecific hybrids for anther culture of indica rice. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **86**, 271-277.
4. Henry, Y., Vain, P. and De, Buysers, J. 1994. Genetic analysis of in vitro plant tissue culture responses and regeneration capacities. *Euphytica* **79**, 45-58.
5. Kim, K. M., Nam, W. L., Kwon, Y. S. and Sohn, J. K. 2004. Development of doubled-haploid population and construction of genetic map using SSR makers in rice. *Plant Biotechnol. J.* **31**, 179-184.
6. Liang, G. H., Xu, A. and Tang, H. 1987. Direct generation of wheat haploids via anther culture 1. *Crop Sci.* **27**, 336-339.
7. Moon, H. P., Cho, S. Y., Son, Y. H., Jun, B. T., Lim, M. S., Choi, H. C. and Chung, G. S. 1986. An anther-derived new high quality and high yield rice variety "Hwaseongbyeol". *Research Reports of the Rural Development Administration-Crops (Korea R.)*
8. Yi, G. H., Won, Y. J., Ko, J. M., Park, H. M., Cho, J. H., Oh, B. G. and Nam, M. H. 2003. Effects of cold shock pretreatment and carbohydrate sources on anther culture of rice. *Plant Biotechnol. J.* **30**, 369-373.

초록 : 벼 약배양 1단계 및 2단계 배양을 이용한 캘러스 유도 및 식물 재분화율 비교 분석

박영희*

(한국방송통신대학교 자연과학대학 농학과)

벼 육종을 위한 약 배양은 기존 육종 방법을 사용하여 새로운 품종을 개발하는데 최소 6세대에 필요한 시간을 크게 줄여 동형접합자를 신속하게 생산하는 방법이다. 이 약 배양기술은 방법론적 관점에서 더 많은 녹색 식물을 얻을 기회를 제공하며, 약 배양에서 시간과 노력을 절약하는 배양의 효율성을 높이기 때문에 중요하다. 본 연구에서는 배양액과 배양 방법이 다른 1단계와 2 단계 배양의 캘러스 유도율과 녹색 식물 재분화율로 비교하였다. 1 단계 배양은 하나의 배지에서 캘러스 유도 및 식물 재생을 허용하는 반면, 2 단계 배양은 두 개의 다른 배지에서 유도 및 식물 재분화가 필요하다. 이 연구에서는 1 단계 및 2 단계 배양으로 벼 꽃밥의 캘러스 유도율과 식물 재분화율을 비교했다. 캘러스 형성률은 1 단계 배양의 경우 13.0 %, 2 단계 배양의 경우 8.6%로 2 단계 배양보다 1 단계 배양에서 4.4% 더 높았다. 식물 재분화율은 1 단계 배양에서 1.0%, 2 단계 배양에서 3.0 %로 1 단계 배양보다 2 단계 배양에서 식물체 재분화율이 3배 더 높았다. 이것은 2 단계 배양이 반수체 생산을 위한 1 단계 배양보다 더 효율적임을 시사한다.