

벼 藥으로부터 callus 形成과 分化에 對하여

金 達 雄 · 裴 泯 奎

慶北大學校 農科大學 農學科

Callus Induction and Differentiation from Rice (*Oryza Sativa* L.) Anthers

Kim, Dal Ung · Bae, Min Gyu

Dept. of Agronomy, Coll. of Agric, Kyungpook Natl. Univ.

Summary

This study was conducted to obtain basic information on the rice anther culture. Materials used were (Inabawase X YR 2404-14-2-1) F₁ hybrid.

Callus growth rate on various media, induction frequency of callus in spikelet and panicle, and the effect of treatment on anther and callus were evaluated.

The results obtained were summarized as follows ;

The growth rate of callus on N-6, M-S, P.E. agar media was 19.8, 13.1, 4.1 times respectively after 30 days inoculated, and on liquid media was 3.8, 5.1, 1.4 times, respectively.

Organ differentiation on N-6, M-S, P.E. agar media was 37.5%, 12.5%, 17.5% respectively.

The difference of induction frequency of callus per panicle was 0.14% - 6.25% and per spikelet was 0 - 19.05%.

Almost callus was induced 30-35 days after inoculation.

Organ differentiation of induced callus was decreased by culture.

Callus cultured for 13 days after induction did not make shoot.

Anthers cold shocked at 8°C for 5 days obtained 3.32% efficiencys of callus induction per number of anthers plated, and compared with 2.41% of no treated anthers.

But anther treated at 8 C for 7 days decreased 2.24%.

Callus induction periods were shortened by cold treatment for about 5 days.

Callus cultured on medium containing 2mg/l of 2,4-D showed 5% on root formation but medium containing 5mg/l of 2,4-D showed 30% of root formation after transfered on the medium without 2,4-D.

Callus cold shocked at 15–18°C revealed poor efficiency for root formation, but 5 days treatment was good for shoot formation.

緒 論

藥培養은 作物育種에 있어서 時間이나 勞力을 절약할수 있고, 半數體나 倍數體 突然變異 等을 利用할수 있기때문에 많은 研究가 進行되어 왔는데, Guha와 Maheshwari⁴⁾가 最初로 *Datura innoxia* Mill의 成熟花粉을 培養하여 半數體를 獲得하였고, 彼에 있어서는 Niizeki와 Oono¹²⁾가 彼의 藥으로부터 callus의 形成에 對해 報告하였다.

Nishi와 Mitsuoka¹³⁾는 藥培養에 의한 半數體, 二陪體體, 三陪體, 五陪體의 出現을 報告하였고, Han等은 藥培養에 의해 생기는 二陪體中 약 90%가 homozygous라 하였다.^{8, 17)} Niizeki와 Oono¹⁴⁾는 NAA 培地에서 形成된 callus는 分仙培地에 移植하지 않아도 器官이 形成된다고 하였고, chen¹⁾은 小孢子에서 직접 植物體가 되었다고 하였으며 그 比率이 keng벼에서 4% hsen x keng에서 1%였다고 하였다. 또 Tian^{15, 20)}等은 callus를 繼代培養하면 分化率이 감소되며 특히 줄기의 分化가 더 심하게 나타난다 하였으며, Maeda¹¹⁾는 繼代培養할때의 核의 크기가 커짐을 報告하였는데, 이는 核의 變異를 나타낸다 하였다.

藥은 止葉과 들깨잎 사이가 4~8cm²⁾ 일때의 것이 培養에 적당하며 品種에 따른 차이는 별로 없다고 하였으며, chen²⁾은 藥의 底溫處理로써 callus의 形成率과 分化率을 增大시킬수 있다고 하였다.

培地內的 auxin의 含量이 callus의 形成에 많은 影響을 미치는데 Nishi¹⁵⁾等은 2, 4-D와 IAA가 含有된 培地에서 形成된 callus가 比較的 分化率이 높았으며, 특히 IAA가 含有된 培地에서 形成된 callus는 뿌리와 줄기의 分化가 가장 좋았다고 하였다.

Kawata와 Ishihara¹⁰⁾는 器官形成에서 IAA가 줄기의 形成에 有效하다고 하였고 그 量

은 1mg程度라고 하였다. 그에 비해 Tamura¹⁹⁾는 品種에 따라 IAA/Kinetin의 比率이 다르다고 하였고, Saka와 Maeda¹⁰⁾ 10⁻⁷M의 2, 4-D가 含有된 培地에서 Kinetin의 含量이 5 × 10⁻⁵M까지 增加함에 따라 分化率이 增加하였으나 뿌리의 分化에는 影響이 없었다고 하였다. 國內에서는 韓等^{3, 5, 6, 7)}이 藥에서 形成되는 callus와, 그의 半數性에 對해 報告하였다. 그러나 아직까지는 callus의 形成率과 分化率이 낮아 많은 研究가 되어야 하겠으며 따라서 藥의 採取過程이나, 藥의 處理過程이 어떠한 影響을 미치는가를 究明하여 多數의 植物體를 얻기위한 基礎資料를 얻고져 本實驗을 遂行하였다.

材料 및 方法

本 試驗에 使用된 材料는 Inabawase X YR 2404-14-2-1의 F₁雜種의 藥이며 이는 Japnica type으로서 1981년에 交配해서 1982年 4월에 無性繁殖시켜 얻은 個體에서 藥을 採取하였다. 採取時期는 止葉과 들깨잎 사이가 4cm 될때의 이삭을 採取하였고 表面은 10% Ca(Ocl), 溶液에 20分間 殺菌하였다.

藥에서 形成된 callus를 60日間 3回 繼代培養시키고 한번더 增植培地에 移植後 試驗 1-1은 20日後에, 試驗 1-2와 試驗 6, 試驗 7은 10日後에 callus를 採取하여 使用하였다. 使用된 試驗管은 直徑 18mm였으며, 培養液은 各 試驗 共히 10ml씩 넣었으며 두겹의 알루미늄 포일로 막은뒤 120°C에서 30分間 殺菌하였다.

培養條件은 callus誘導를 위해서는 28°C에서 暗培養을 하였고 分化는 25°C에서 700 Lux 照明下에서 實施하였다.

試驗 1-1, 基本培地와 그 堅固度가 callus의 生長에 미치는 影響

사용된培地는 N-6, M-S, potato extract (以下 P.E라 함) 液體培地와 固體培地이며 N-6, M-S, 固體培地는 各各의 基本培地에 1ℓ當 sucrose 30g, 2, 4-D 2mg, agar 10g을 넣었고, P.E 固體培地는 potato extract 200cc, KNO₃ 1500mg, Ca(NO₃)₂ · 4H₂O 100mg, Fe·EDTA 40mg, nicotinic acid 0.5mg, sucrose 30g, 2, 4-D 2mg, agar 10g을 넣었으며 모든培地는 P.H 5.8로 調節하였고 液體培地는 固體培地에서 agar만을 除外하였다.

接種은 生體重 20~25mg되는 callus를 試驗管當 1개씩 하였고 接種後 30일에 生體重, 乾物重, 生長率, 乾物重×100/生體重을 調査하였다.

試驗 1-2. 基本培地가 器官分化에 미치는 影響.

培地는 試驗 1-1의 固體培地에서 2, 4-D만 除外시킨것을 使用하였고 callus는 生體重 20~25mg 되는것을 試驗管當 1개씩 接種하였고 接種後 50일에 뿌리와 줄기의 數를 調査하였다.

試驗 2. 서로 다른 이삭間의 callus 形成率의 差異

培地는 N-6 固體培地를 使用하였으며 10個의 이삭에서 採取한 葯을 接種하였으며 接種後 60日間 이삭當 callus 形成數를 調査하였다.

試驗 3. 한 이삭內에서 小穗에 따른 callus 形成率의 差異

培地는 N-6 固體培地를 使用하였고 10個의 小穗에서 採取한 葯을 接種하였으며 接種後 60日間 小穗當 callus 形成數를 調査하였다.

試驗 4. Callus의 齡이 分化에 미치는 影響

Callus 形成에는 N-6培地를 使用하였고 分化에는 N-6培地에서 2, 4-D만 除外한것을 使用하였다. 葯에서 形成된 callus는 同一한培地에 移植後 7, 10, 13日間 培養後 分化培地에 移植하였고 分化培地에 移植後 50일에 뿌리와 줄기의 數를 調査하였다.

試驗 5. 低溫處理가 callus 形成에 미치는 效果.

培地는 N-6 固體培地를 使用하였으며 이삭은 비닐백에 싸서 7~8℃에서 0, 1, 3, 5, 7日間 各各 處理後 葯을培地에 接種시켰으며 接種後 60日間 處理當 callus의 數를 調査하였다.

試驗 6. 서로 다른 2, 4-D 濃度에서 生長한 callus를 分化培地에 移植後 器官分化에 미치는 影響.

培地는 N-6 固體培地를 使用하였고 1ℓ當 2, 3, 4, 5 ppm의 2, 4-D가 含有된培地에서 30日間 處理後 2, 4-D가 除外된 分化培地에 移植하였으며 分化培地에 移植後 50일에 뿌리와 줄기의 數를 調査하였다.

試驗 7. callus로부터 器官分化에 미치는 低溫處理의 影響.

培地는 M-S 基本培地에 1ℓ當 kinetin 2mg, IAA 1mg, sucrose 30g, agar 8g이 添加된培地를 使用하였고, P.H는 5.8로 調節하였다. 分化培地에 移植後 處理를 중단한 50일째에 뿌리와 줄기의 數를 調査하였다.

結果 및 考察

Callus의 生長: 基本培地 및 堅固度가 다른培地에서 葯으로부터 形成된 callus의 生長을 보면(表 1), 全般的으로 固體培地가 液體培地보다 callus의 生長率이 높게 나타났으며 固體培地에서는 N-6培地에서 19.8배의 生長率을 나타내어 가장 좋았고 다음이 M-S培地의 13.1배, P.E培地의 4.1배였다.

液體培地에서는 M-S培地가 5.1배로서 가장 生長이 좋았고 다음이 N-6培地의 3.8배 P.E培地의 1.4배였다. 生體重에 對한 乾物重의 比率은 液體培地에서 자란 callus가 固體培地에서 자란것보다 거의 2배에 달하였다. 따라서 N-6 固體培地가 가장 callus의 生長에 좋은培地였으며 이는 chen¹⁾의 報告와 같다.

Table 1. The effect of basal media and its solidity on callus growth.

Medium	Weight of inoculated callus (mg)	Fresh weight (mg)	Growth rate (X)	Dry weight (mg)	Dry weight × 100 Fresh weight
N-6 liquid	582	2208	3.8	315	14.3
solid	540	10712	19.8	940	8.8
M-S liquid	611	3106	5.1	432	13.9
solid	523	6870	13.1	517	7.5
P. E liquid	365	515	1.4	70	13.6
solid	451	1866	4.1	134	7.2

Number of test tube : 20 each.
Determined at 30 days after inoculated.

分化 : 分化에 사용된 3種의 固體培地中에서는 N-6培地가 뿌리에서 37.5%로써 가장 分化率이 높았고, 다음이 P. E培地로서 17.50%, 그리고 M-S培地에서 12.50%로써 가장 낮았다. P. E培地에서의 callus의 生長이

M. S培地보다 不良하였으나 分化에서는 良好한것으로 생각되나 N-6培地에는 미치지 못하였다. 또한 줄기의 分化가 되지않은 것은 60日間의 繼代培養으로 인한 分化能力의 減退로 推定된다(表 2).

Table 2. Organogenesis from rice callus on different solid agar media.

Medium	Number of test tube	Rooting	%	Shooting	%
N-6	40	15	37.50	0	0
M-S	40	5	12.50	0	0
P. E	40	7	17.50	0	0

Determined at 50 days after inoculated.

이삭當 callus 形成率 : 이삭當 callus 形成率의 差異는 最低 0.41%에서 最高 6.25%로써 많은 差異가 났다. 이는 藥의 生育過程에서의 生理的인 差異로 推定된다.

藥의 數와 callus 形成率 間에는 거의 相關이 없는것으로 생각되며, 大部分의 callus는 藥을 接種後 30~35日에 出現하여 鄭⁹⁾의 報告와 비슷한 傾向을 나타내었다(表 3).

小穗當 callus의 形成率 : 한 이삭內에서도 藥의 成熟期의 差異에 따라 小穗當 callus의 形成率이 달라지고, 이는 出穗後 開花에 所要

되는 日數가 最小 1日에서 最高 8日까지 7日이라는 差異가 나고, 小穗內에서도 大部分 3~4日間의 差異가 있다고 報告된(그림 1)것으로 보아 藥의 成熟過程에서도 큰 差異가 認定된다.

全般的으로 藥은 이삭의 밑에서 위로, 小穗의 밑에서 위로 갈수록 成熟이 빠르는데, 이것은 이삭의 適切한 選定이 되어도 그 이삭內에서 callus를 形成시킬 適期의 藥數는 制限되어 있는것을 나타낸다. 表 4에서 8번 小穗에서 19.05%가 callus를 形成시킨것은 그

Table 3. The difference of induction frequency of callus per panicle.

Panicle number	No. of anthers inoculated	Days of incubation								Total no. of callus induced	% of callus
		25	30	35	40	45	50	55	60		
1	241	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.41
2	154	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.65
3	100	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1.00
4	89	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1.12
5	253	0	2	2	0	0	0	0	0	4	1.58
6	272	0	2	2	1	0	0	0	0	5	1.84
7	208	0	2	3	0	0	0	0	0	5	2.40
8	106	0	1	3	0	0	0	0	0	4	3.78
9	243	0	0	3	1	4	0	2	1	11	4.53
10	144	5	3	0	0	1	0	0	0	9	6.25
Total	1810	5	12	14	2	6	0	2	1	42	Mean: 2.32

上 下의 比率로 볼때 상당한 差異가 나며, 이 것은 藥의 成熟過程에서 callus를 形成시킬수 있는 幅이 상당히 좁은것을 나타내 주고 있

고, 8번에서 위보다 아래쪽이 形成率이 높은 것은 역시 藥의 成熟이 위에서 밑으로 되어 지는것에 기인하는 것으로 思料된다.

Table 4. The difference of callus induction from anthers of each spiklet in the same panicle.

Spiklet number	Number of anthers inoculated	Callus produced	
		Number	%
1	18	0	0
2	23	0	0
3	22	0	0
4	20	0	0
5	23	1	4.35
6	17	1	5.88
7	25	0	0
8	21	4	19.05
9	20	1	5.00
10	20	0	0
Total	209	7	Mean: 3:35

Determined at 60 days after inoculated.

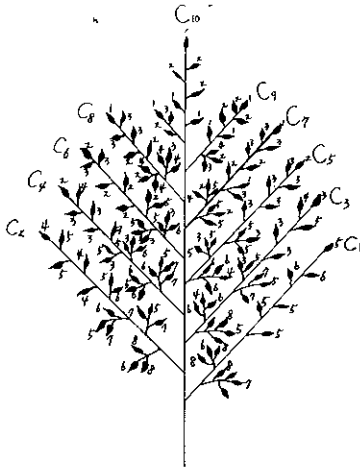


Fig.1. Flowering order of spikelet on a panicle.
Small number : Flowering date after heading.
C: Number of spikelet collected.

形成된 callus의移植: 일단 藥에서 形成된 callus는 增殖期間이 길어질수록 分化率이 急激히 떨어지며, 7日間 培養한것이 줄기가 9.62% 뿌리가 42.31%의 分化率을 나타내는데 비해, 13日間 培養한것은 줄기의 分化는 전혀 없었고 뿌리가 23.08%의 分化率을 나타내므로서 뿌리보다 특히 줄기의 分化率이 顯著히 減少되는 傾向이 있는것으로 보아, 일단 藥에서 形成된 callus는 빨리 分化培地에 移植하는것이 分化率을 높일수 있으리라 思料된다(表 5).

低温處理의 效果: 低温處理로 因한 callus 形成率은 無處理가 2.41%인데 비해, 7~8℃에서 5日間 處理한것은 3.32%로 약 38%의 增加를 나타냈으며, 이는 cheeltt¹⁷⁾ 등이 발표한 Dungham shali의 藥을 6℃에서 5日間

Table 5. The effect of culture period on differentiation of callus from rice anthers.

Culture period in induction medium	Fresh weight of callus (mg)	No. of ballus tested	Rooting	%	Shooting	%
7 Days	6-8	52	22	42.31	5*	9.62
10 Days	15-18	51	18	35.29	4**	7.84
13 Days	20-25	39	9	23.08	0	0

* : Albino ; 3, Green ; 2. ** : Albino ; 2, Green ; 2.

Determined at 50 days after inoculated on differentiation medium.

處理하며 處理하지 않은것의 10.5%에서 22.2%로 增加된것 보다는 적지만 상당한 效果가 있었으며, 1, 3日間 處理한것도 역시 無處理보다 增加하였다. 그러나 7日間 處理한것이 도리어 2.24%로 減少한 것은 어느 限界以上の 低温處理는 오히려 形成率이 減少된다는 다른 報告¹⁸⁾와 같다.

그리고 低温處理하지 않은것이 大部分 接種後 30~35日 사이에 callus가 形成되었으

나, 7~8℃에 1~3日 處理한것은 25~30日, 5~7日 處理한것은 20~30日에 大部分의 callus가 形成되므로서 低温處理로 callus의 形成時期가 빨라지며 또한 形成期間이 길어지는 傾向을 나타내었다(表 6).

Callus의 生長에서의 2, 4-D의 效果: callus의 生長過程에서 高濃度の 2, 4-D는 callus의 老化를 遲延시키는 것으로 推定되며(表 7). Table 2에서 2 mg/ℓ의 2, 4-D가

Table 6. The effect of pre-coldtreatment on induction frequency of callus.

Days of cold treated at 7-8°C	No. of anthers inoculated	Days of incubation										Total no. of anthers induced	% of callus
		20	25	30	35	40	45	50	55	60			
0	374	0	0	6	2	1	0	0	0	0	9	2.41	
1	473	0	4	3	1	2	1	0	1	0	12	2.54	
3	293	0	1	5	1	0	0	0	0	0	7	2.39	
5	241	1	2	4	0	1	0	0	0	0	8	3.32	
7	625	3	2	7	0	1	0	1	0	0	14	2.24	

함유된 培地에서 10日間 培養된것이 뿌리에 서 37.50%의 分化率을 나타내는데 비해 역시 同一한 濃度の 2,4-D 를 함유한 培地에서 30日間 培養한것은 불과 5%의 分化率을 나타내므로서 20日間 32.50%의 分化率의 減少가 있었으며, 그에 비해 5 mg/l 의 2,4-D 濃度

에서는 30%의 分化率을 나타내어 17.5%의 分化率의 減少를 나타내었다. 그리고 2,4-D 의 濃도가 2 mg/l 에서 5 mg/l 로 增加함으로써 약 25%의 分化率의 增加가 나타났다. 이것은 高濃度の 2,4-D 에 의한 分化能力의 保有로 思料된다.

Table 7. The effect of callus sources subcultured at different concentration of 2,4-D on organ differentiation after transferred in N-6 media.

2,4-D Concns for callus production (ppm)	Number of test tube	Rooting	%	Shooting	%
2	40	2	5.00	0	0
3	40	2	5.00	0	0
4	40	2	10.00	0	0
5	40	12	30.00	0	0

Each callus was cultured for 30 days on induction medium and inoculated on differentiation medium.

Determined at 50days after inoculated.

分化中の 低温處理의 效果: 分化中에 있는 callus 의 低温處理는 뿌리의 分化率을 抑制시키며 15~18°C에서 15日間 處理한것은 뿌리나 줄기의 分化가 전혀 되지 않았으며, 이것은 無處理에서 뿌리의 分化率 15%와 比較

해볼때 많은 差異가 있다. 어느것이냐 處理된것은 뿌리의 分化에는 不良하나 5日間の 處理는 줄기의 分化에는 有效한 것으로 思料된다 (表 8)

Table 8. The effect of cold shock on organogenesis from rice anther callus.

Days at 15-18°C in darkness	Number of test tube	Rooting	%	Shooting	%
0	40	6	15.00	0	0
5	40	5	12.50	1*	0.25
10	40	4	10.00	0	0
15	40	0	0	0	0

* : Green plant.

Determined at 50 days after inoculated.

摘 要

벼 藥 培養에 있어서 이삭內, 이삭當 callus의 形成量의 差異와 形成된 callus의 處理過程이 分化에 미치는 影響, 低溫處理에 의한 callus 形成量의 增加와, 分化에서의 效果를 究明하기 위해 實施한 試驗의 結果는 다음과 같다.

Callus의 生長에는 固體培地가 液體培地보다 良好하였고, 특히 N-6培地가 19.8배의 生長率로 가장 良好하였다. 分化에서도 역시 N-6培地가 뿌리에서 37.50%의 分化率로 가장 높았으며, P.E培地는 callus生長에는 M-S培地보다 不良하였으나 分化率은 5% 높았다.

한 이삭內에서는 극히 制限된 數의 藥에서 單 callus가 形成되었으나 그 分布는 넓은 편이었다.

低溫處理로서 callus 形成量이 增加하였고 특히 7~8°C에 5日間 處理한것은 處理하지 않은것보다 38%가 增加하였다. 또한 低溫處理로서 callus의 形成時期가 빨라지며 形成期間의 幅도 넓어지는 傾向이 있다.

藥에서 形成된 callus는 빨리 分化培地에 移植하는것이 分化率이 높으며 時日이 經過할수록 分化率이 減少하였다.

高濃度の 2,4-D는 Callus의 生長過程에서 分化能力을 維持시켜 주는것으로 推定되며 分化中の callus는 低溫處理로서 뿌리에

는 急激한 分化率의 減少를 惹起시키나 줄기에는 15~18°C에 5日間 處理한것이 有效하였다.

引 用 文 獻

1. 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 Oct. pp.19-25.
2. Chen, Y., Zuo, Q., and Li, S. 1981. The effect of cold pretreatment and preculture of anthers on initiation and development of isolated rice pollen in vitro. Institute of genetics. Academia. Peizing. pp.1-3.
3. Chung, Gun Sik. 1975. Studies on tissue culture in rice. *Oryza sativa* L. (In Korean). J. Korean Soc. Crop Sci., 20: 1-26.
4. Guha, S., and S.C. Maheshwari. 1964. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. Nature. 204: 497.
5. Harn, C. 1969. Studies on the anther culture of rice (In Korean). Korean J. breeding. 1: 1-11.
6. Harn, C., and J. Hwang. 1970. Studies on the anther culture of rice-Histological observation of haploid callus-Thesis collection of prof. Less Memorial of Birthday (In Korean). pp.71-74.

7. Harn, C., and J. Hwang. 1970. Studies on the anther culture of rice. 2. Histological observation of haploid callus inoculated on differentiation medium (In Korean). *Korean J. Bot.*, 13: 121-123.
8. Hu, Han., and Shau Qipuan. 1981. Advances in plant cell and tissue culture in China. *Advance in agronomy*, 34: 1-13.
9. Japata, P. J., J. P. Crill., S. D. Merca., R. O. Romero., L. B. Torrizo., M. Alejar., M. A. Reu., and G. S. Khush. 1981. Rice anther culture at IRRI. pp. 1-14.
10. Kawata, S., and Ishihara, A. 1968. The regeneration of rice plant *Oryza sativa* L. In the callus derived from the seminal root. *Proc. Japan acad.*, 44: 549-553.
11. Maeda, E. 1969. Variation on nuclear size of rice callus tissues under the aseptic subculture. *Japan J. Genetics*, 44: 285-289.
12. Niizeki, H., and K. Oono. 1968. Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proc. Japan acad.*, 44: 554-557.
13. Nishi, T., and S. Mitsuoka. 1969. Occurrence of various ploidy plants from anther and ovary of rice plant. *Japan J. Genetics*, 44: 341-346.
14. Niizeki, H., and K. Oono. 1970. Rice plants obtained by anther culture. Second inter. Conf. On plant tissue culture, Strasbourg (in press). pp. 251-257.
15. Nishi, T., Y. Yamada., and E. Takahashi. 1968. Organ redifferentiation and plant restoration in rice callus. *Nature*, 219: 508-509.
16. Nishi, Y., Y. Yamada, and E. Takahashi. 1973. The role of auxins in differentiation of rice tissues cultured in vitro. *Bot. Mag. Tokyo*, 86: 183-188.
17. Rush, M. C., and Qiquen Shao. 1980. Rice research strategies for the future. The special international symposium at IRRI pp. 1-34.
18. Saka, H., and E. Maeda. 1969. effect of kinetin on organ formation in callus tissue derived from rice embryos (In Japanese). *Proc. Japan acad.*, 38: 668-674.
19. Tamura, S. 1968. Shoot formation in calli originated from rice embryo. *Proc. Japan acad.*, 44: 544-548.
20. Tian, Wenzhong., and Y. Chen. 1981. Studies on increase of differentiation frequency of green plantlets in float culture of rice anther. Institute of genetics. Academia Sinica. Beijing. p. 2.