

# 水稻 生産性増大를 위한 花粉細胞 培養 및 融合技術 確立

許 文 會 · 蔡 永 岩

## Development of Anther and Cell Culture Techniques for Enhancement of Rice Productivity<sup>1)</sup>

Mun Hue Heu · Young-am Chae\*

### ABSTRACT

A series of experiments were carried out to know the effects of pollen stage, cold shock temperature and duration, and media for callus and green plant induction in rice anther culture. The results indicated that: (a) uninucleate stage of pollen was the most suitable stage for effective callus induction, (b) cold shock temperature of 8°C and 12°C was appeared to be proper temperature for callus induction, (c) callus induction rate was increased in the eight to 12 days long cold storage, (d) the medium N6 was better than that of N6D for callus induction, (e) green plant induction was better in both 4°C and 8°C than that of 12°C cold shock, (f) green plant frequency was higher in eight to 12 days long cold storage and (g) green plant frequency was doubled in the MS medium when compared with N6 medium.

### 緒 論

水稻 藥培養으로부터 처음으로 半數體를 성공적으로 유도한(Niizeki and Oono, 1968)이래 한국, 일본 및 중공에서 이에 대한 관심이 고조되기 시작하였고 새로운 育種方法으로서의 이용 가능성이 검토되기 시작하였으며 현재는 상당히 기술이 발전되어 좋은 成果를 거두고 있다. 특히 중공에서는 약배양을 통한 품종이 보급되고 있는 단계이다.

半數體를 倍加시켜 2倍體로 만드는 이 육종방법은 育種年限을 단축시키는 효과는 물론 純系水準에서 質的選拔方法에 대한 정보까지 제공할 수 있다. 즉 homogygous 단계에서 새로운 遺傳型的 改良을 제공할 수 있는 것이다. 이러한 새로운 유전자형을 固定하는 데는 기존의 방법으로는 상당한 기간을 필요로 하지만 androgenesis의 첫 世代에서 染色體를 배가함으로써

서 고정기간을 최소화할 수 있어 농가에 새로운 品種을 보급하는 데 3~4년 밖에 소요되지 않는다(Shen et. al, 1983). 또한 이러한 육종과정에서 새로운 형이나 變異型이 나타날 수 있기 때문에 이들은 育種材料로서 가치가 큰 것이며 보통의 육종방법에서는 넓은 分離世代 면적과 노력 그리고 결과가 불확실하지만 약배양을 통하여 이런 것들을 해결할 수도 있다.

水稻 藥培養이나 花粉培養을 통하여 육종년한 단축이나 새로운 변이를 창조할 수 있는 가능성이 크지만 이러한 방법을 일반적으로 광범위하고 효율적으로 다른 품종에 적용하여 實用化할 수 있는 단순하고 다시 반복할 수 있는 방법은 아직 개발되고 있지 못하기 때문에 이에 대한 문제 해결을 위한 연구 노력이 지속되어야 할 것이다. 여기에 관련된 문제점으로서 (1)再分化 技術의 결여, (2)화분배양으로 재분화시켜 얻은 반수체를 2배체로 만드는 기술의 부정확성, (3)白色體의 높은 빈도, (4)genotypes(品種)에 따른

\* 서울대학교 農科大學

\*College of Agriculture, Seoul National University, Suwon 170, Korea.

1) 이 論文은 韓國學術振興財團의 1983年度 研究支援에 의하여 이루어졌음.

반응의 변이성, (5)배양 培地에 따른 상이한 반응 등을 들 수 있다. 그러나 가장 기본적인 것은 綠色體 出現率을 우선 높이는 방법이다. 녹색체 출현율에 영향을 주는 요인으로서 배지에 약을 치상할 때의 화분의 발육단계, 배양배지, 화분의 前處理 溫度와 期間, 배양온도와 光條件 그리고 遺傳子型을 생각할 수 있다.

본 연구에서는 녹색체 출현율에 영향을 주는 요인들에 대한 문제 해결을 위해 일련의 실험을 수행하였으며 지금까지 얻어진 결과를 여기에 보고한다.

## 研 究 史

綠色體 出現率에 영향하는 것은 치상 당시의 花粉의 발육단계인데 이것은 proembryo와 반수체식물 유도에 영향을 주기 때문이다. Guha-Mukherjee(1973)는 4分子期나 이보다 이른 경우에는 화분이 발육되지 않았고 다만 單核期 花粉을 가진 葯만이 embryo로 分化되었다고 하였으며 Sun(1978)은 초기, 중기, 후기 단핵기의 약은 화분의 활력이 있었으나 2核期の 화분은 모두 사멸되었다고 하였다. Chen(1977)은 초기나 중기의 단핵기에서 가장 좋은 녹색체 출현율을 보였고 후기 단핵기에서는 이보다 낮았다고 한 반면 Zapata 등(1982)은 중기 단핵기에서 초기 2핵기 사이가 androgenetic development에 적합하며 이보다 일찍이나 늦은 경우는 녹색체 출현율이 낮다고 하였다.

약을 低溫處理하는 경우 callus나 녹색체 출현율이 높아진다는 보고가 있는데 Chaleff 등(1975)은 6°C에서 5일간 처리하였을 경우 callus 형성율이 2배(22.2%)로 증가되었다고 하였고 Zhao(1980)는 6~8°C에서 6일간 처리가 callus 형성과 분화에 좋았는데 이는 저온처리 기간 동안 약의 호흡과 영양소모의 감소 정도가 온도에 따라 다르게 나타나서 결국 약벽 세포의 생존의 연장이 화분의 degeneration을 지연시켰기 때문이라고 설명하였다. 그러나 Chen 등(1980)은 10°C에서 20일 처리한 경우 callus 형성이 좋았다고 하였다. 또한 Chaleff와 Stolarz(1981)는 7°C에서 3일 이상 처리한 경우 callus 형성이 비교적 잘 되었다고 하였으며 Zapata 등(1983)은 8°C에서 8일간 처리한 것이 callus 형성이 제일 높았으며 14일간 처리한 경우도 상당히 효율이 높았으나 백색체 출현이 높았다고 하였다. 그리고 이들은 저온처리의 효과를 (1)花粉母細胞를 영양핵과 생식핵을 만드는 대신에

2개의 똑같은 핵을 만들도록 하고, (2)체세포의 老化를 지연시켜 화분의 활력을 유지시키고, (3)어느 특별한 proembryo inducer를 만들도록 도와주고, (4)세포를 같은 발육단계로 만들어준다고 하였다. Hu 등(1978)은 약을 10°C에서 4~8일간 처리한 경우 녹색체 출현율이 10% 증가되었다고 하였으며 Genovesi와 Magill(1979)은 13°C에서 14일간 처리한 경우 녹색체 출현율은 18%에서 68%까지 증가하였다고 보고하였다. 위와 같이 연구자에 따라 온도와 처리기간이 상이한 것은 사용한 품종에 따른 차이로 해석이 되며 일반화하기가 어려움을 제시하여 주고 있다.

사용한 培地에 따라서도 callus 형성과 녹색체 분출율에 차이가 있는 데 Niizeki와 Oono(1968)는 반고형 Blaydes 배지(1966)를 사용하였으나 4~8주 후의 재분화율은 0.6%였다. Blaydes 배지는 Miller 배지(1963)에 고농도의 IAA와 2,4-D 및 kinetin을 함유한 것이다. Chu(1978)는 N6 培地를 사용하여 callus 형성을 16.3% 그리고 이로부터 녹색체 출현율을 57%까지 높일 수 있었다고 하였으나 이에 대한 반응은 품종에 따라 다르다고 하였다. Chaleff와 Stolarz(1981)는 Murashige and Skoog 배지(1962)에 NAA를 첨가하여 사용하였으나 callus 형성이나 녹색체 출현이 극히 낮았다고 하였다. Liang 등(1982)은 N6 배지가 MS 배지보다 callus 형성이 좋았으며 callus 유도배지에 2,4-D를 사용한 것보다 NAA나 kinetin을 사용하는 것이 녹색체 출현에 좋은 영향을 주었다고 하였다. Zapata 등(1982)은 callus 유도배지는 E-24 배지를 사용하고 녹색체 유도배지는 N-19 배지를 쓰는 경우 효율이 높다고 하였다. 이상에서 보는 것처럼 배지에 따라 callus 형성이나 녹색체 출현율이 상이하게 나타난 것은 genotypes에 따라 같은 배지에 대한 반응이 다르게 나타나고 있음을 알 수 있다.

綠色體 대신 白色體가 경우에 따라 많이 나타나는데 Oono(1975)는 genotypes에 따라 백색체 출현율에 차이가 있다고 하였고 Wang 등(1978)은 배양온도가 30°C 이상으로 높을 경우 백색체 출현율이 증가하였다고 보고하였다. 이와 같은 백색체 출현 기작을 protein 대사의 방해 때문이라고 Liang 등(1978)은 설명하고 있다.

## 材料 및 方法

### 1. 供試品種

본 실험에 공시된 품종은 TCP 156, T 1668, 미네히

かり, 금강, 신광, Taipei 309, 농백의 7個 品種을 사용하였으며 파종은 2월 14일부터 15일 간격으로 pot에 파종하여 온실에서 생육시켰고 4월 20일부터는 15일 간격으로 논밭자리에 3회 파종하여 키운 모를 논에 이양하여 재료를 양성하였다.

## 2. 花粉細胞 發育段階와 callus 形成率

약배양에서 callus 형성율은 화분의 발육단계와 관계가 있기 때문에 葉耳間長別로 시료를 채취하여 이삭을 8°C에서 8일간 저장한 다음 약치상시 현미경 하에서 화분의 발육단계를 검경하였다.

## 3. 花粉細胞의 低溫處理가 callus 形成과 綠色體 出現率에 미치는 影響

화분세포의 균일한 발육단계 조절에 의하여 callus와 녹색체 출현율에 영향을 미치는 저온의 정도와 시간의 상호관계를 알기 위하여 온도를 4, 8, 12°C와 대조구를 두었고 각 온도 조건별로 저장 기간을 4, 8, 12일 및 15일로 처리하였다.

## 4. 培地에 따른 callus와 綠色體 生現率

약배양의 배지에 따라 또 여기에 첨가되는 홀몬의 종류와 농도에 따라 callus와 녹색체 출현율에 영향을 주고 있기 때문에 callus 유도배지로는 N6 기본배지(2,4-D 대신 NAA 2mg/l 첨가)와 N6D 배지(N6 organic saltz + MS inorganic salts + NAA 4mg/l + kinetin 2mg/l)를 사용하였으며 녹색체 분화 배지는 N6 배지(IAA 0.2mg/l + kinetin 1mg/l)와 변경 MS 배지(MS + adenine sulfate 40mg/l + NAA 1mg/l + kinetin 4mg/l)를 사용하였다.

## 5. 培養環境

Callus 유도를 위해 치상한 약은 25°C의 압조건에서 배양하였으며 기관분화는 25°C에서 16시간 2000 lux 조명 하에서 분화를 유도하였다.

## 6. 葯置床 方法 및 培養環境

單核期에 해당되는 엽이간장이 5~7cm 정도된 이삭에서 약을 선택하여 N6와 N6D의 callus 유도배지에 각각 3개씩 약을 치상하였으며 시험관당 15~20개의 약을 치상하여 25°C 암상태에서 배양한 후 30일과 45일에 callus 유기율을 조사하고 3mm 정도된 callus를 기관분화 배지인 N6과 개량 MS 배지에 한개씩 치상한 다음 25°C에서 16시간의 2000lux 광

도하에서 배양하면서 녹색체 출현율을 조사하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 花粉發育段階와 callus 形成率

정확한 화분 발육 단계는 화분 세포를 염색 검경하여 결정하였으며 이 때 葉耳間長을 측정하여 차후 포장에서 시료를 채취할 때 도움이 되도록 하였으며 그 결과는 표 1과 같다. 이 결과에 의하면 시료 채취시기는 花粉發育段階로 보아 單核期에 가장 좋은 결과를 나타내고 있으며 실제 채취할 때의 기준은 엽이간장이 5~8cm 정도가 됨을 알 수 있다. 4分子期에서는 callus 유기를 기대하지 않았으나 동일한 이삭에서 약을 채취하더라도 이삭내에서 약의 위치에 따라 초기 단핵기의 것이 있어 callus가 형성된 것으로 생각된다. 이상의 결과는 Chen(1977), Guha Mukherjee(1973), Sun(1978), Zapata 등(1982, 1983)의 보고와 같다.

동일한 이삭내에서 약의 착생 위치에 따라 차이가 있는가를 알기 위하여 이삭을 3등분하여 맨 윗쪽부분을 上部로 하여 치상한 결과는 표 2에서 보는 바와 같이 엽이간장이 5~8cm인 때는 상부와 중간부위에

Table 1. Relationship between auricle distance and callus induction after 45 days incubation.

Auricle distance	Variety	Anthers plated(No)	Callus induced (No.) (%)	
2-4 cm (tetrad)	TCP 156	46	0	0.0
	T 1668	37	0	0.0
	Minehikari	184	9	4.9
	Kumkang	61	2	3.3
	Sinkwang	-	-	-
	Sum	328	11	
Average				3.3
5-8 cm (early-mid uninucleate)	TCP 156	517	57	11.0
	T 1668	929	120	12.9
	Minehikari	457	77	16.8
	Kumkang	13	4	30.8
	Sinkwang	-	-	-
	Sum	1,916	258	
Average				13.5
9-10 cm (late uninucleate)	TCP 156	689	61	8.9
	T 1668	332	35	10.5
	Minehikari	483	70	14.5
	Kumkang	63	8	12.7
	Sinkwang	296	19	7.1
	Sum	1,836	193	
Average				10.5

**Table 2.** Degree of callus induction at different position of anthers within the same panicle.

Variety	Top			Middle			Bottom		
	Anthers plated (No.)	Callus induction (No.)	(%)	Anthers plated (No.)	Callus induction (No.)	(%)	Anthers plated (No.)	Callus induction (No.)	(%)
TCP 156	121 (164)	31 (4)	25.6 (2.4)	57 (236)	13 (29)	22.8 (12.3)	46 (0)	1 (0)	2.2 (0)
Minehikari	232 (220)	43 (19)	18.5 (8.6)	195 (186)	29 (42)	14.9 (22.6)	30 (77)	5 (9)	16.7 (11.7)
T 1668	323 (120)	52 (8)	16.1 (6.7)	347 (122)	45 (10)	13.0 (8.0)	259 (90)	23 (7)	8.9 (7.8)
TCP 156	190 (265)	35 (13)	18.4 (4.9)	212 (303)	20 (35)	9.4 (11.6)	115 (121)	2 (13)	1.7 (10.7)
Sum	866 (769)	161 (44)		811 (847)	107 (116)		450 (288)	31 (29)	
Average			18.6 (5.7)			13.2 (13.7)			6.9 (10.1)

\* Figures without and with parenthesis indicate that anthers were taken from the panicle with auricle distance of 5-8cm long and 9-10cm, respectively.

서 약을 취함이 바람직하며 엽이간장이 9~10cm 인 경우에는 중부와 하부의 약을 채취하는 것이 좋음을 알 수 있다.

**2. 低溫處理와 callus 形成率**

저온처리가 callus 유기에 미치는 영향을 溫度와品種別로 나타낸 것이 표 3이다. 표에서 보는 바와 같

**Table 3.** Effects of cold shock for callus induction.

Temperature	Variety	Anthers plated(No.)	Callus induced (No.)	(%)
4°C	T 1668	1,654	703	42.5
	TCP 156	1,397	339	24.3
	Taipei 309	1,793	690	38.5
	Nongback	696	76	10.9
	Average	1,385	452	32.6
8°C	T 1668	1,724	538	31.2
	TCP 156	962	383	39.8
	Taipei 309	681	282	41.4
	Nongback	436	7	1.6
	Average	951	303	31.8
12°C	T 1668	728	217	29.8
	TCP 156	532	243	45.7
	Taipei 309	653	396	60.6
	Nongback	197	32	16.2
	Average	528	222	42.0
Control (plated right after sampled)	T 1668	489	101	20.6
	TCP 156	639	93	14.6
	Taipei 309	269	49	18.2
	Nongback	394	22	5.6
	Average	448	66	14.8

이 전체적으로 볼 때 무처리구(control)의 callus 형성율이 14.8%인데 비하여 저온처리를 한 경우 2배 이상 callus 형성율이 높았음을 알 수 있다. 온도 처리 중에서도 4°C나 8°C보다는 12°C로 처리한 경우가 더 좋았으며 4°C와 8°C간에는 차이가 없었다.

이 결과는 10~13°C 범위에서 callus 형성이 좋다고 하는 Chen(1980), Genovesi and Magill(1973), Zhou and Cheng(1981)과 같은 경향이며 Chaleff 등(1975, 1981), Zapata 등(1982, 1983) 및 Zhao(1980)는 6~8°C에서 오히려 callus 형성이 양호하였다고 하였는데 위의 결과로 보아도 4~8°C에서 무처리구(control)에 비해 2~3배 정도로 높은 효율을 나타내고 있어 사용한 품종에 따라 달리 나타날 수 있음을 알 수 있다. 표 3에서 보아 알 수 있듯이 같은 온도 조건이라고 하더라도 품종에 따라 callus 형성에 차이가 있음을 알 수 있다. 예로 T 1668은 4°C에서 제일 좋았고 TCP 156은 8°C에서 Taipei 309는 12°C에서 그리고 농백은 다른 품종에 비하여 현저히 callus 형성율이 떨어지나 12°C에서 비교적 높게 나타났다.

위의 결과는 온도 처리기간을 고려하지 않고 합산하여 나타낸 결과이므로 이것을 다시 온도 처리기간별로 나타낸 것이 표 4, 5 및 6이다. 먼저 표 4에서 보면 T 1668은 4°C로 처리하였을 때 8일간 저장한 경우가 68%로 제일 반응이 좋았고 다음이 12일 저장한 경우이다. TCP 156은 12일 저장한 경우 34.2%로 제일 높았고 Taipei 309도 12일 저장한 경우

**Table 4.** Effects of cold shock duration for callus induction at 4°C.

Variety	Cold shock duration (days)	Anthers plated(No.)	Callus induced (No.)	(%)
T 1668	4	346	92	26.6
	8	172	117	68.0
	12	452	167	37.0
TCP 156	4	874	191	21.9
	8	485	135	27.8
	12	38	13	34.2
Taipei 309	4	440	54	12.3
	8	368	134	36.4
	12	506	277	54.7
	15	479	225	47.0
Nongback	4	320	38	11.9
	8	52	4	7.7
	12	324	34	10.5
Control (Plated right after sampled)	T 1668	489	101	20.6
	TCP 156	639	93	14.6
	Taipei 309	269	49	18.2
	Nongback	394	22	5.6

**Table 5.** Effects of cold shock duration for callus induction at 8°C.

Variety	Cold shock duration (days)	Anthers plated (No.)	Callus induced (No.)	(%)
T 1668	4	792	98	12.4
	8	586	273	46.6
	12	346	167	48.3
TCP 156	4	137	13	9.5
	8	825	370	44.9
	12	—	—	—
Taipei 309	4	—	—	—
	8	280	96	34.3
	12	401	186	46.4
Nongback	4	131	6	4.6
	8	107	1	0.9
	12	198	0	0.0
Control (plated right after pampled)	T 1668	489	101	20.6
	TCP 156	639	93	14.6
	Taipei 309	269	49	18.2
	Nongback	394	22	5.6

54.7%로 callus 형성이 양호하였으며 4일이나 8일 저장한 것보다 15일간 저장한 경우가 47%로 높았다. 농백은 무처리구보다 모두 좋은 결과를 보였으나 저장기간에 따른 반응은 큰 차이가 나타나지 않았다.

표 5에서 보면 T 1668은 8°C로 처리하였을 경우 8일이나 12일 동안 저장한 경우가 각각 46.6%와

**Table 6.** Effects of cold shock duration for callus induction at 12°C.

Variety	Cold shock duration (days)	Anthers plated (No.)	Callus induced (No.)	(%)
T 1668	4	115	21	18.3
	8	259	91	35.1
	12	300	71	23.7
TCP 156	4	312	106	34.0
	8	137	100	73.0
	12	83	37	44.6
Taipei 309	4	—	—	—
	8	195	62	31.8
	12	458	334	72.9
Nongback	4	88	19	21.6
	8	109	13	2.8
	12	—	—	—
Control (plated right after sampled)	T 1668	489	101	20.6
	TCP 156	639	93	14.6
	Taipei 309	269	49	18.2
	Nongback	394	22	5.6

48.3%로 4일간 처리한 12.4%보다 월등히 반응이 좋았다. TCP 156은 8일간 저장한 경우가 역시 callus 형성율이 높았다. Taipei 309도 8일과 12일간 저장한 경우 높은 callus가 유기되었다. 농백은 오히려 control보다 다소 callus 형성이 떨어졌으나 4일간 처리한 경우가 좋았다. 표 6에서 보면 12°C에서는 T 1668은 8일간 저장한 경우가 가장 좋았고 다음이 12일 동안 저장한 경우이다. TCP 156은 8일간 저장하였을 때 callus유기가 73%로 제일 높았고 다음이 12일간 저장한 경우이다. Taipei 309는 12일간 저장하였을 때 성적이 양호하였으며 농백은 4일간 저장한 경우 callus가 제일 많이 유기되었고 시간이 경과함에 따라 오히려 감소되었다.

위의 결과로 보아 callus유기는 온도, 품종에 따라 차이는 있지만 대체로 8~12일간의 저장 기간이면 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각한다.

### 3. 培地種類와 callus 形成率

배양 배지의 종류에 따라 callus 형성에 차이가 있는가를 알기 위하여 N6와 N6D 배지를 시험한 결과는 표 7과 같은데 여기서 보면 품종이나 저온처리에 관계 없이 N6 배지에서 callus 유기율이 높았다.

Chu(1978)와 Liang(1982)도 N6 배지가 callus 유기율이 높았다고 하였으며 2.4-D보다는 NAA나 kinetin을 사용하는 것이 후에 녹색체 분화에 좋다고 하였다. 이 표에는 나타나지 않았으나 각 저장 기간

**Table 7.** Effects of media for callus induction at different temperature.

Variety	Media	Cold shock temperature			Average (%)
		4°C	8°C	12°C	
T1668	N6	49.1% (399/812)*	36.0% (307/852)	35.2% (86/244)	41.5
	N6D	36.1% (304/842)	26.5% (231/872)	22.6% (97/430)	29.5
TCP 156	N6	30.5% (207/679)	45.5% (197/433)	47.8% (121/253)	38.8
	N6D	18.4% (132/718)	35.2% (186/529)	43.7% (122/279)	28.8
Taipei 309	N6	44.6% (367/823)	57.1% (206/361)	66.8% (221/331)	52.4
	N6D	33.3% (323/970)	23.8% (76/320)	54.3% (175/322)	35.6
Nongback	N6	11.4% (38/341)	2.4% (5/207)	17.3% (19/110)	9.4
	N6D	10.7% (38/355)	0.9% (2/229)	14.9% (13/87)	7.9

\* Upper and lower figures indicate the callused anthers and plated anther numbers, respectively.

에 따른 효과도 역시 N6 배지가 N6D 배지보다 callus 유기에 효과적이었으며 T 1668의 경우 MS 배지를 사용하였을 경우 callus 형성율이 36.2%(8°C에서 8일간 처리)로 나타난 경우도 있었다.

#### 4. 低溫處理와 綠色體 出現率

저온처리가 녹색체 분화에 미치는 영향을 온도와 품종별로 정리한 것이 표 8이다. 표에서 보면 전체적으로 보아 4°C나 8°C로 처리한 경우 녹색체 출현 비율이 높았으며 control에 비하여 3~4배 정도로 효과가 크게 나타났다. Hu 등(1978)은 10°C에서 Zapata 등(1982, 1983)은 8°C로 처리한 경우 녹색체 출현율이 높았다고 보고하여 위의 결과와 같은 경향

임을 알 수 있다. 그러나 같은 온도 처리를 한 경우라도 품종에 따라 반응이 달리 나타나고 있다. 4°C에서 TCP 156은 68.5%로 제일 높았고 8°C에서는 TCP 156과 Taipei 309가 각각 55.6%나 58.9%로 높았으며 12°C에서는 TCP 156이 50.4%로 제일 높았다. 따라서 genotypes에 따라 반응온도가 다를 수 있어 genotypes별로 최적온도를 조사하여야 할 것이지만 8°C 정도면 무리가 없을 것으로 본다. 백색체 출현율도 온도와 관련된 것으로 보여 온도가 높아감에 따라 증가하는 경향을 보이고 있다. 4°C와 8°C에서는 녹색체 출현율이 백색체 출현율보다 2배 이상 많았으나 12°C에서는 같은 비율로 나타났음을 알 수 있다. Zapata 등(1983)도 14°C로 처리한 경우

**Table 8.** Effects of cold shock for green plant induction.

Temperature	Variety	Calluses plated (No.)	Green plants		Albino	
			(No.)	(%)	(No.)	(%)
4°C	T 1668	262	52	19.9	35	13.4
	TCP 156	92	63	68.5	13	14.1
	Taipei 309	410	189	46.1	69	16.8
	Nongback	29	4	13.8	4	13.8
	Average	198	77	38.9	30	15.3
8°C	T 1668	156	31	19.9	24	15.4
	TCP 156	144	80	55.6	51	35.4
	Taipei 309	90	53	58.9	7	7.8
	Nongback	3	3	100.0	0	0.0
	Average	98	42	42.6	21	20.9
12°C	T 1668	169	15	8.9	56	33.1
	TCP 156	125	63	50.4	35	28.0
	Taipei 309	126	39	31.0	32	25.4
	Nongback	18	3	16.7	0	0.0
	Average	110	30	27.3	31	28.0
Control (plated right after sampled)	T 1668	33	0	0.0	6	18.2
	TCP 156	51	8	15.7	4	7.8
	Taipei 309	19	4	21.1	7	36.8
	Nongback	17	0	0.0	0	0.0
	Average	30	3	10.0	4	14.1

**Table 9.** Effects of cold shock duration for green plant induction at 4°C.

Variety	Cold shock duration(days)	Calluses plated(No.)	Green plants		Albino (No.)
			(No.)	(%)	
T 1668	4	38	1	2.6	0
	8	24	3	12.5	2
	12	81	19	23.5	15
TCP 156	4	25	36	144.0	8
	8	59	20	33.9	3
	12	8	7	87.5	2
Taipei 309	4	11	11	100.0	8
	8	68	26	38.2	12
	12	168	69	41.1	19
	15	163	83	50.9	30
Nongback	4	14	0	0.0	1
	8	3	2	66.7	1
	12	12	2	16.7	2
Control (plated right after sampled)	T 1668	33	0	0.0	6
	TCP 156	51	8	15.7	4
	Taipei 309	19	4	21.1	7
	Nongback	17	0	0.0	0

**Table 10.** Effects of cold shock duration for green plant induction at 8°C.

Variety	Cold shock duration(days)	Calluses plated(No.)	Green plants		Albino (No.)
			(No.)	(%)	
T 1668	4	2	2	100.0	0
	8	108	20	18.5	13
	12	46	9	19.6	11
TCP 156	4	9	27	300.0	9
	8	135	53	39.3	42
	12	—	—	—	—
Taipei 309	4	—	—	—	—
	8	37	18	48.7	2
	12	53	35	66.4	5
Nongback	4	3	3	100.0	0
	8	—	—	—	—
	12	—	—	—	—
Control (plated right after sampled)	T 1668	33	0	0.0	6
	TCP 156	51	8	15.7	4
	Taipei 309	19	4	21.1	7
	Nongback	17	0	0.0	0

녹색체 유기가 상당히 좋았으나 백색체 출현율이 높았다고 하여 위와 같은 경향임을 알 수 있다.

위의 결과는 온도 처리기간을 고려하지 않고 합산하여 나타낸 결과이므로 이것을 다시 온도 처리 기간별로 나타낸 것이 표 9, 10 및 11이다. 먼저 표 9에서 보면 T 1668은 12일간 처리한 경우가 좋았으며 TCP 156은 처리 기간에 관계 없이 좋은 반응을 나타내었다. Taipei 309는 치상한 callus 수를 고려한다면 8일에서 15일까지 모두 녹색체 형성율이 높았고

농백은 8일간 처리에서 분화율이 높게 나타났다. 표 10에서 보면 T 1668은 치상한 callus 수를 고려하면 8일과 12일 저장한 경우가 녹색체 출현율이 높은 것으로 생각되고 TCP 156도 8일 정도가 좋은 것으로 여겨진다. Taipei 309도 8일과 12일에서 좋았으나 12일 처리한 경우 녹색체 분화율이 높았다. 농백의 경우는 심한 오염으로 결과를 해석하기 힘들다. 표 11에서 보면 T 1668은 12°C에서 8일간 저장한 경우가 녹색체 분화율이 제일 높았고 TCP 156은 4일

**Table 11.** Effects of cold shock duration for green plant induction at 12°C.

Variety	Cold shock duration(days)	Calluses plated(No.)	Green plants		Albino (No.)
			(No.)	(%)	
T 1668	4	31	1	3.2	2
	8	31	6	19.4	0
	12	102	8	7.8	5
TCP 156	4	61	53	86.9	25
	8	49	10	20.4	8
	12	25	0	0.0	0
Taipei 309	4	—	—	—	—
	8	14	2	14.3	1
	12	112	37	33.0	31
Nongback	4	12	1	8.3	0
	8	6	2	33.3	0
	12	—	—	—	—
Control (plated right after sampled)	T 1668	33	0	0.0	6
	TCP 156	51	8	15.7	4
	Taipei 309	19	4	21.1	7
	Nongback	17	0	0.0	0

저장한 경우 86.9%로 8일간의 20.4%보다 4배 이상 높은 효율을 보였다. Taipei 309는 12°C에서 12일간 저장한 경우가 증았고 농백은 8일간 저장에서 녹색체 분화가 잘 되었다.

위의 결과로 보아 대체로 8일에서 12일간 저장한 경우 녹색체 분화가 좋은 경향을 보이고 있으나 품종, 온도에 따라 변이를 보이고 있다. 본 실험의 결과는 이제까지 보고된 Chaleff 등(1975, 1981), Genovesi와 Magill(1979), Hu 등(1978), Zapata 등(1982, 1983), Zhao(1980), Zhou와 Chang(1981) 등의 결과와 같은 경향이며 genotypes에 따라 처리 온도와

기간을 결정하여야 할 것으로 생각된다.

### 5. 培地와 綠色體 形成率

배양 배지의 종류에 따라 녹색체 출현율에 차이가 있는 가를 알기 위하여 N6 배지와 개량 MS 배지를 사용하여 시험한 결과는 표 12와 같다. 표에서 보면 품종이나 온도처리에 관계 없이 녹색체 변화율은 개량 MS 배지가 N6 배지보다 대부분 2배 이상의 높은 효과를 나타내고 있다. 표에는 나타내지 않았으나 각 저장 기간에 따른 효과도 역시 N6 배지보다는 개량 MS 배지에서 녹색체 출현율이 높았다.

**Table 12.** Effects of media for green plant induction at different temperature.

Variety	Media	Cold shock temperature			Average (%)
		4°C	8°C	12°C	
T 1668	N 6	12.6% (17/135)*	11.8% (9/76)	6.3% (5/80)	10.7
	MS	27.6% (35/127)	27.5% (22/80)	11.2% (10/89)	22.6
TCP 156	N 6	64.0% (32/50)	39.2% (29/74)	16.4% (11/67)	37.7
	MS	73.8% (31/42)	72.9% (51/70)	76.5% (52/68)	74.4
Taipei 309	N 6	39.3% (81/206)	53.3% (24/45)	24.2% (15/62)	38.3
	MS	52.9% (108/204)	64.4% (29/45)	37.5% (24/64)	51.4
Nongback	N 6	6.7% (1/15)	—	20.0% (2/10)	12.0
	MS	21.4% (3/14)	100.0% (3/3)	12.5% (1/8)	28.0

\* Upper and lower figures indicate green plant and plated callus numbers, respectively.

### 6. 再分化 植物體의 特性調査

Callus로부터 재분화된 녹색 식물체는 9월 12일부터 온실에 옮겨 생육시키고 있으며 이들에 대한 생존율, 형태적 특성 및 수량형질에 대하여 앞으로 계

속 조사할 계획이다.

### 7. 花粉細胞 裸出 및 融合

화분으로부터 原形質體 裸出은 成熟花粉, 花粉母細胞



胞 및 4分子에서 얻을 수 있으나 그 나출 과정이 까다롭고 효율도 낮아 많은 어려움이 있을 뿐만 아니라 벼에서는 약배양보다 화분배양의 효율이 아주 낮아 실용적인 것이 되지 못하고 있다. 그 이유는 분리시킨 화분으로부터 callus 분화율이 일반적으로 낮을 뿐만 아니라 녹색체의 출현율이 높기 때문이다. 따라서 화분세포로부터 효소 처리로 원형질체를 나출하여

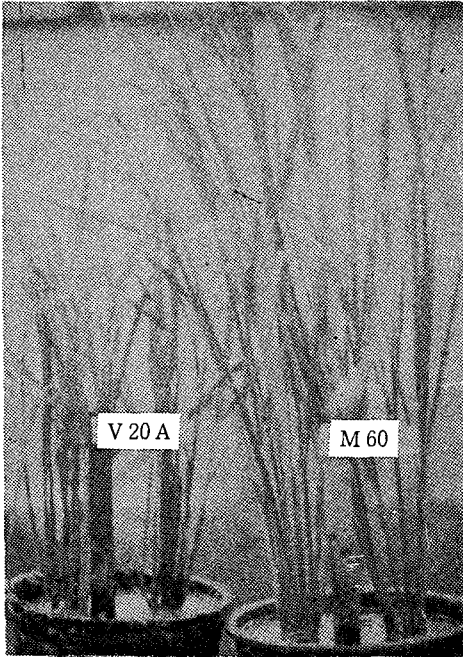


Fig. 1. Parents.  
left : MS line V20 A  
right : Maintainer Milyang 60

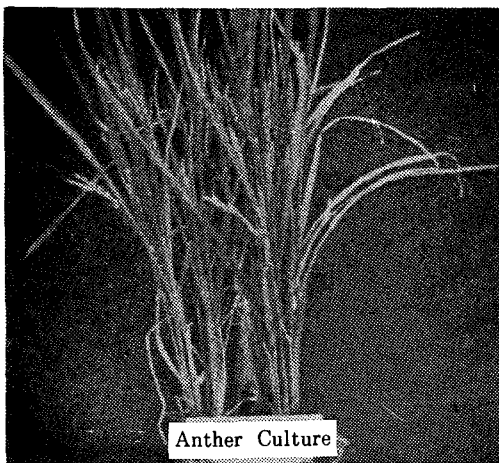


Fig. 2. Regenerated plant from F<sub>1</sub> hybrid anther culture.

융합을 시도하는 것보다는 교배에 의한 F<sub>1</sub> 식물체의 약을 배양하는 것이 효율적인 것으로 생각된다. 그림 1과 2는 음성불임계통(V20A)에 유지친인 밀양 60의 양친과 교배에서 얻은 F<sub>1</sub> 식물체를 약배양하여 얻은 것으로 이 식물체는 양친의 중간 형질을 가지고 있어 결국 원형질체의 융합 방법보다는 F<sub>1</sub> 식물체의 약배양을 통한 육종방법이 보다 실질적이고 능률이 높은 것으로 판단된다.

## 要 約

水稻 藥培養의 효율을 높이기 위하여 callus 유기와 녹색체出現率에 영향을 미치는 花分의發育段階, 花分の低温處理와 기간 및 培地の 영향에 대한 일련의 실험을 수행하였으며 이에서 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 單核期の 화분에서 callus 유기율이 높았으며 이때는 대체로 葉身間長이 5~8cm에 해당되나 품종에 따라 차이가 있다.

2. 이삭을 상, 중, 하로 나누어 조사한 결과 엽이 간장이 5~8cm의 것은 상부와 중간부분에 단핵기에 해당되는 것으로 나타났고 9~10cm 정도의 것은 중부와 하부 부분이 단핵기에 해당하는 것으로 나타났다.

3. 일반적으로 저온처리 8°C에서 12°C가 callus 유기에 알맞는 것으로 나타났다. 그러나 온도에 대한 반응은 품종에 따라 차이가 있어 4°C에서 callus 유기가 잘된 것도 있었다.

4. 저온 처리기간은 일반적으로 8~12일 정도에서 callus 유기가 잘 되었으나 품종간 차이가 있다.

5. 본 실험에서는 N6D 배지보다 N6 배지에서 callus 유기율이 높았다.

6. 대체로 녹색체 출현율은 4°C와 8°C로 처리한 것이 12°C 처리보다 높았다. 그러나 품종간 차이가 있었다.

7. 녹색체 출현에 좋은 결과를 주었던 온도 처리기간은 대체로 8~12일로 나타났다.

8. 본 실험에서 녹색체 출현율은 N6 배지보다 개량 MS 배지에서 2배 정도 높았다.

## 引 用 文 獻

1. Blydes, D. F.(1966) Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean

- tissue. *Physiol. Plant.* 19:748-753.
2. Chaleff, R. S., Hill, S. R., and J. M. Dunwell (1975) Rice anther culture, *John Innes Annu. Rept.* pp64-66.
  3. Chaleff, R. S. and A. Stolarz(1981) Factors influencing the frequency of callus formation among cultivated rice anthers. *Physiol. Plant.* 51:201-206.
  4. Chen, C. C.(1977) In vitro development of plants from microspores of rice. *In Vitro* 13(8): 484-489.
  5. Chen, Y., Lu, D. Y., Li, S. Y., Zuo, W. X., and S. W. Zheng(1980) Studies on the effects of cold pretreatment on rice anther and isolated pollen culture in vitro. *Annu. Rept. Inst. Genet. Acad. Sinica.* pp.79-81.
  6. Chu, C. C.(1978) The N6 medium and application to anther culture of cereal crops. *Plant Tissue Culture* pp.43-50. Pitman Adv. Pub.
  7. Genovesi, A. D. and C. W. Magill(1979) Improved rate of callus and green plant production from rice anther culture following cold shock. *Crop. Sci.* 19:662-664.
  8. Guha-Mukherjee, S.(1973) Genotypic differences in the in vitro formation of embryoids from rice pollen. *J. Exp. Bot.* 24:139-144.
  9. Hu, C., Huang, S. C., Ho, C. P., Liang, H. C., Huang, C. C., and L. P. Peng(1978) On the inductive conditions of rice pollen plantlets in anther culture. *Proced. Symp. Plant Tissue Culture, Beijing.* Science Press. pp.87-95.
  10. Liang, C. L., Chou, Y. H. and C. M. Chen(1978) A study of submicroscopic structure and metabolic blocks in the albino plants of rice. pp.161-166 *in* *Proced. Symp. Plant Tissue Culture.* Science Press, Beijing.
  11. Liang, J. C., Pen, C. L., Chien, H. L. and S. T. Hsin(1982) Medium evaluation for rice anther culture. pp.551-552 *in* *Proced. 5th. Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, Tokyo.*
  12. Miller, C. O.(1963) Kinetin and kinetin-like compounds. *In* *Moderne methoden der Pflanzenanalyse.* (ed. Peach, K. and M. V. Tacey). pp. 194-202. Springerverlag. Vol. VI.
  13. Murashige, T. and F. Skoog(1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
  14. Niizeki, H. and K. Oono(1968) Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proced. Jpn. Acad.* 44:554-557.
  15. Oono, K.(1975) Production of haploid plants of rice by anther culture and their use in breeding. *Bull. Natl. Inst. Agri. Sci.* 26D:139-222.
  16. Schaeffer, G. W.(1982) Recovery of heritable variability in anther-derived doubled-haploid rice. *Crop. Sci.* 22(6):1160-1164.
  17. Shen, J. H., Li, M. F., Chen, Y. Q., and Z. H. Zhang(1983) Improving rice by anther culture. pp. 183-205 *in* cell and tissue culture techniques for cereal crop. improvement. Science press, Beijing.
  18. Sun, C. S.(1978) Androgenesis of cereal crops. pp.117-123 *in* *Proced. Symp. Plant tissue culture.* Science Press, Beijing.
  19. Wang, C. C., Sun, C. S., Chu, C. C., and S. C. Wu.(1978) Studies on the albino pollen plantlets of rice. pp. 149-160 *in* *Proced. Symp. Plant tissue culture.* Science Press, Beijing.
  20. Zapata, F. J., Torrizo, L. B., Romero, R. O., and M. S. Alejar(1982) Androgenesis in *Oriza sativa*. pp.531-532 *in* *Proc. 5th. Intl. Cong. Plant tissue and cell culture, Tokyo.*
  21. Zapata, F. J., Khush, G. S., Crill, J. P., Neu, M. H., Romero, O., Torrizo, L. B., and M. Alejar(1983) Rice anther culture at IRRI. pp.27-46 *in* cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. Science Press, Beijing.
  22. Zhao, C. Z.(1980) Effects of low temperature on induction and differentiation of callus in rice anther culture, P13 *in* *Cell and tissue culture techniques for cereal improvement.* Science Press, Beijing.
  23. Zhou, X. T. and Q. L. Cheng(1981) The cold-pretreatment effects on the rate of pollen induced plant of Hsin rice. *J. Fujian Agri. College:*25-32.