

밀 減數分裂期 Mutagen 處理가 葯培養에 있어서 染色體 變異에 미치는 影響

朴光根 · 姜良淳 · 河龍雄* · 許翰諱**

Influence of Mutagen at Meiotic Stage on Wheat Ploidy in Anther Culture

Kwang Geun Park*, Yang Soon Kang*, Yong Woong Ha* and Han Sun Hur**

ABSTRACT : This experiment was conducted to know the effects of mutagen treatments on callus induction, plant regeneration and their ploidy in the anther culture of wheat. The winter wheat cultivars, "Eunpamil" and "Wonkwang", were treated at the mid or late-uninucleate stage under 4 different doses (100, 200, 500 and 1,000 rad.) of X-ray and 3 different levels (0.1, 0.2 and 0.3 mole) of Ethyl Methane Sulphonate. The anthers treated were set on the C₁₇ medium for callus induction, and callus induced was transferred to 1/2 MS medium for plant regeneration. The mutagen treatments inhibited the callus induction but increased the plant regeneration in the callus which were induced from the anther set on the medium for the long time of 60 to 80 days. Also, the chromosome number to the regenerated plant varied largely by increasing of haploid plants (n=3x=21) and by occurring of aneuploidy having n=20 and n=22 of chromosome number.

最近 들어 葯培養은 作物 育種上 널리 利用되고 있다. 특히 葯培養 過程중 Callus 段階를 거친 分化 植物體는 染色體 造成이 不安定하여 多様な 倍數性 이 나타나므로 變異擴大가 容易하고 한개의 Allele 에 의하여 支配되는 表現型 劣性因子까지도 當代에 쉽게 발현되므로 突然變異體의 選拔效率을 增大시킬 수 있다. 여기 다가 突然變異 誘發源까지 組合되면 效率的인 變異擴大가 期待된다.

Sunderland 와 Dunwell¹⁶⁾은 explant 의 葯에 irradiation 이나 chemical mutagenesis 를 일으켜 葯培養하는 方法을 提案하였다.

Kao¹⁰⁾는 突然變異 誘發源을 花器組織에 處理하여 葯培養하므로서 有用變異의 出現率이 높아졌다고 하였고 gamma線 照射에 의한 分化植物體 變異가 4 배까지 增加된 報告¹⁰⁾도 있다.

본 시험에서는 葯培養에 의한 變異誘發과 突然變異 誘起源 處理效果를 組合하여 變異擴大를 試圖코자 밀 減數分裂期 이삭을 採取하여 X-ray 와 EMS 를 處理한 후 葯培養하므로서 callus 誘起, 植物體 分化 및 分化個體의 染色體 變異를 檢討하였다.

材料 및 方法

밀 品種 原光과 銀波밀을 供試하여 花粉 1核期 前期의 이삭을 葉鞘채로 採取하여 5℃에 3日間 低溫處理하였고 葯置床 직전에 變異誘發源 Ethyl Methane Sulphonate(EMS)를 0.1, 0.2, 0.3 M 水準으로 하여 이속에 試料를 침적시키고 fume hood 內에 設置된 25℃ 恒溫水槽에 넣어 60 RPM 으로 1時間 Shaking 시켰다.

그리고 X-ray 處理는 직경 19cm petri dish 에 試料를 담아 Yamada製 X-ray 處理機 內에서 100, 200, 500, 1,000 rad. 되게 照射하였다. callus 誘起는 C₁₇培地에 置床하여 27℃ 暗室에서 誘起시켰고 植物體分化는 誘起 callus 를 1/2 MS 培地에 옮겨 25℃에서, 2,500 lux 10時間 照明下에서 시켰다.

分化植物體의 體細胞 染色體 檢鏡은 移植시 根端을 採取하여 1-bromonaphthalene 飽和水溶液에 4時間 침적시켰다가 Alcohol + Acetic acid(3:1)

* 麥類研究所 (Wheat & Barley Research Institute, RDA, Suwon 441-440, Korea)

** 農村振興廳 試驗局 (Research Bureau, RDA, Suwon 441-707, Korea) <1990, 11. 18接受>

溶液에 固定시키고 纖維素 分解 酵素인 pectinase 와 cellulase 를 각각 10cc 蒸溜水에 500mg 녹이고 1 N의 HCl 6방울을 가한 酵素溶液에서 1.5 ~ 2時間 연화시킨 후 acetocarmine 으로 染色시켜 適切な 倍率로 鏡檢하였다.

結果 및 考察

1. Callus 誘起 및 植物體分化

藥培養 效率는 培養된 試料 自體의 條件^{3,11)} 과 前處理條件^{2,12)}, 培地條件^{4,14,19)}, 培養條件^{6,13,17)} 등 에 따라 상이한 바 표 1에서는 培養된 試料의 條件 變化를 주기 위하여 突然變異 誘發源을 置床적 전 에 前處理함으로써 callus 誘起 및 植物體 分化 에 미치는 影響을 나타내었다.

callus 誘起는 無處理區 9.9%에 비하여 X-ray 100 rad - 1,000 rad 까지 9.4~0.9%로서 照射量 增加로 急進的으로 減少了고 EMS는 0.1M~0.3 M까지 3.9~0.3%로 X-ray 보다 더 심한 Callus 誘起를 抑制시켜 callus 誘起 效率面에서 본다면 X-ray 100 rad 에서는 誘起 抑制가 거의 없으면서 變異誘發 可能性을 期待할 수 있겠으나 EMS는 0.1M 以上の 水準은 過한 濃度로 判斷되었다.

한편 綠色體分化는 X-ray 處理로 銀波 밑에서는 500 rad 에서, 原光에서는 200 rad 까지 增加되었다. 이것은 組織中 auxin 의 activation 이 높게 維持되면 ethylene 活性이 높아지고 따라서 纖維素 分解 酵素인 pectinase 나 cellulase 의 activation 을 增加시켜 細胞伸長을 持續시키고 植物體分化로 의 轉換이 어려울 것인데 組織에 X-ray 가 照射되면 組織中 内生 auxin 이 破壞되므로 auxin activity 가 떨어지게 되어 細胞伸長 및 分裂力 抑制로

callus 誘起는 減少될 것이나 반면에 誘起된 callus 에서는 X-ray 가 Anti-Auxin 的 機能으로 植物體分化에는 有利한 狀態가 되었을 것으로 보인다.

호밀에서는 1 KRad 照射가 半數體 誘起에 效果의 이었다는 報告¹⁵⁾ 가 있고 許⁷⁾ 는 밑에서 EMS 0.1M 處理에서도 無處理區에 비하여 Callus 誘起가 떨어지지 않았다고 하였으나 본 시험에서는 顯著的 減少를 보였는데 이는 培養試料 條件의 差異인 것 같다. 그리고 배지에 치상된 藥들은 치상후 28 ~ 60일내에 callus 誘起가 많았고 일찍 誘起된 callus 에서 綠色體나 白色體 發生이 많았다.

특히 變異劑가 處理된 藥에서 誘起된 Callus 에서는 치상후 61~80일에서도 綠色體나 白色體의 發生이 많았다. 또한 X-ray 가 處理된 藥의 Callus 에서는 植物體分化 없이 뿌리만 發育되는 個體 發生率이 낮아 callus 의 embryogenic cell 로의 轉換 效果가 큰 것으로 期待되었다(Fig. 1).

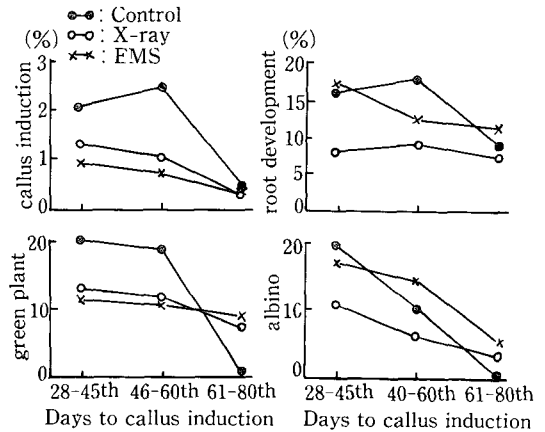


Fig. 1. The callus induction and plant regeneration from callus induced according to days after inoculation of anther on the media.

Table 1. Callus induction and plant regeneration derived from anther treated by mutagens.

Treatments	Eunpamil			Wonkwang		
	No. of anther inoculated	% of callus	% of green plant	No. of anther inoculated	% of callus	% of green plant
Control	600	9.9	13.2	1,950	3.1	16.4
X-ray	100R	1,320	9.4	1,680	2.3	28.2
	200	1,290	5.1	1,830	1.3	21.7
	500	2,040	2.1	1,650	1.2	10.0
	1,000	1,680	0.9	1,590	0.5	12.5
	EMS	0.1M	1,950	3.9	2,610	1.5
	0.2	2,100	3.0	2,880	0.4	0
	0.3	2,160	0.3	2,880	0.3	0

2. 分化植物體의 染色體 變異

突然變異 誘發源이 處理된 藥을 培養하여 分化된 半數體 植物體의 體細胞 染色體數의 變異를 보면 표 2 와 그림 2 에서와 같다.

變異誘發源 處理없이 藥培養된 分化個體의 體細胞 染色體數의 變異는 銀波밀과 原光에서 다같이 半數體와 2倍體만이 거의 같은 比率로 나타난 반면에 突然變異 誘起源이 處理된 藥에서 分化된 個體들에

서는 半數體($n=3x=21$)보다 하나 적은 染色體를 갖는 異數體($n=20$)와 하나 많은 染色體를 갖는 異數體($n=22$)가 發生되었고 그리고 半數體($n=3x=21$) 發生率이 增加되어 藥培養 目的인 半數體 獲得面에서나 變異擴大面을 同時에 滿足시킬 수 있을 것으로 期待되었다.

染色體의 異常은 花粉母細胞의 減數分裂時 分裂 後期에 染色體의 極으로의 移動遲延과 染色體의 不

Table 2. The variation of somatic chromosome number in the root tip of plantlets derived from anther treated by the mutagens.

Mutagen	No. of plantlets investigated	Frequency of ploidy (%)			
		Haploid ($n=3x=21$)	Aneuploid		Diploid ($2n=6x=42$)
			($n=20$)	($n=22$)	
Eunpamil					
Control	12	50.0	0	0	50.0
X-ray	14	92.9	0	7.1	0
EMS	12	83.4	8.3	0	8.3
Wonkwang					
Control	16	56.2	0	0	43.8
X-ray	20	60.0	0	20.0	20.0
EMS	12	100	0	0	0

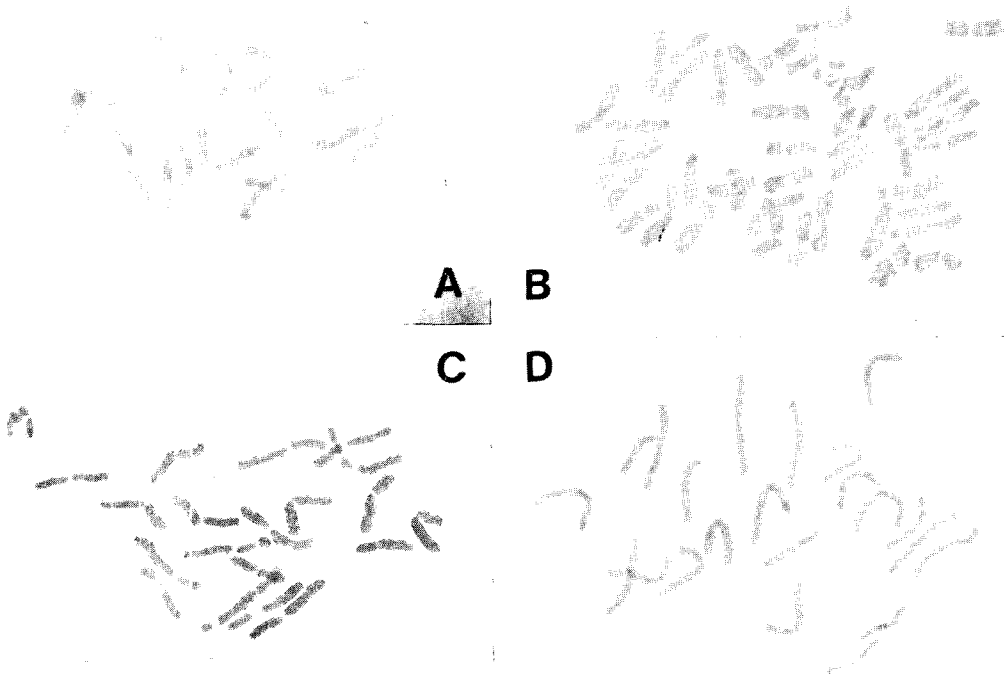


Fig. 2. The variation of somatic chromosome number in the root tip of plantlets derived from anther of wheat treated by mutagens.

A : Haploid ($n=3x=21$)
C : Aneuploid ($n=20$)

B : Diploid ($2n=6x=42$)
D : Aneuploid ($n=22$)

分離⁹⁾, 多極分離¹⁾ 등에 의해서 주로 일어나는데 藥培養에서는 培養期間이 길수록 染色體 變異가 크다는 報告^{5,8,9)}가 많다.

본 시험에서의 突然變異 誘起劑 處理에 의한 染色體 異常은 藥培養중 늦게 분화된 callus 에서도 植物體分化率이 높았던 關係로 藥이 長期培養되는데 따른 영향도 클 것으로 보였다.

摘 要

밀 藥培養에 있어서 Callus 誘起, 植物體分化 및 分化植物體의 染色體 變異에 미치는 突然變異 誘起劑의 處理 效果를 檢討코자 減數分裂期 1核期 이삭에 X-ray는 4水準(100, 200, 500, 1,000 rad), Ethyle Methane Sulphonate는 3水準(0.1, 0.2, 0.3M)으로 각각 處理하여 C₁₇배지에서 callus를 誘起시키고 1/2 MS 배지에서 植物體를 分化시켰다. 그 結果 callus 誘起는 抑制되었으나 植物體分化는 多少 높았으며 특히 藥置床 후 61~80일째 長期 치상된 藥의 callus에서 植物體分化率이 높았다. 分化植物體의 染色體 變異는 半數體(n=3x=21) 發生率이 增加되었고 n=20, n=21개의 染色體를 갖는 異數體가 發生되어 染色體 變異가 컸다.

引 用 文 獻

1. Bayliss, M.W. 1973. Origin of chromosome number variation in cultured plant cells. Nature 246 : 329-530.
2. Bennett, M.D. and Hughes, W.G. 1972. Additional mitosis in wheat pollen induced by ethrel. Nature(London) 240, 566-568.
3. Borojevic, K., S. Seseck and L. Radojevic. 1985. Responses of different genotypes on development of callus from anther cultures of wheat. In proc. symp. on nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement. p. 233-237. IAEA, Vienna.
4. De Buysse, J. and Y. Henry. 1980. Induction of haploid and diploid plants through in vitro anther culture of haploid wheat(n=3x=21). Theor. Appl. Genet. 57 : 57-58.
5. Harn, C.Y. 1987. Somatic embryogenesis and its use in the plant breeding. Korean J. Plant Tissue

- Culture. 14. Supplement : 91.
6. Hu, H., Z.Y. Xi, J.K. Jing and X.Z. Wang. 1983. Production of wheat pollen-derived aneuploid plants through anther culture. In proc. workshop on cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. p. 173-182. Science Press, Beijing.
7. Hur, H.S. 1989. Studies on improvement of cultural efficiency and practical use in anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). Res. Rept. RDA(B) 31(4) : 18-41.
8. Jang, G.W. and K.S. Min. 1989. Cytological study on callus derived from wheat (*Triticum aestivum* L.) leaf I. Effect of cultural period and 2,4-D concentration on aberration of chromosome number. K.J.B. 21(3) : 172-182.
9. Kao, K.N., R.A. Miller, O.L. Gamborg and B. L. Harvey. 1970. Variations in chromosome number and structure in plant cell grown in suspension cultures. Can. J. Genet. Cytol. 12 : 297-301.
10. Kao, K.N. 1981. Plant formation from barley anther cultures with ficoll media. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 103(S) : 437-443.
11. Lazar, M.D., G.W. Schaeffer and P.S. Baenziger. 1984. Cultivar and cultivar x environment effects on the development of callus and polyploid plants from anther cultures of wheat. Theor. Appl. Genet 67(2/3) : 273-277.
12. Marsolais, A.A., G. Seguin-Swartz and K.J. Kasha. 1984. The influence of anther cold pretreatments and donor plant genotypes on in vitro androgenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Tissue Organ Culture 3 : 69-79.
13. Ouyang, J.W., S.M. Zhou and S.E. Jia. 1984. II. Suitable culture temperature for different response of anther culture in wheat to temperature. wheat genotypes. Hereditas 683 : 11-14.
14. Pan, J.L., G.H. Gao and H. Dan. 1983. Initial types of wheat pollen cells and their development in anther culture. In Proc. Workshop on cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. p. 117-129. Science Press, Beijing.
15. Stolarz, A 1974. The induction of androgenesis in

- pollen grains of *Secale cereale* L. Strzekecinskie jare *in vitro* conditions. *Hodowla Rosl., Aklim. Nasienn* 18. 217-220.
16. Sunderland, N. and J.M. Dunwell. 1977. Anther and pollen culture. In *Plant Tissue and Cell Culture*. p. 223-265. Univ. California Press.
 17. Wel, Z.M. and S.W. Loo. 1983. Wheat pollen culture and regeneration of plantlets. In *Proc. Workshop on Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Imporvement*. p. 433. Science Press, Beijing.
 18. Zhao, R.T., H.N. Zhu and Y.J. Bi. 1984. Study of factors affecting induction and differentiation frequences in anther culture of winter wheat. *Hereditas* 681 : 23-25.
 19. Zheng, Q.C., Y.L. Zhu and W.H. Chen. 1986. Induced mutation from irradiated anther cultures of wheat. *Mutation Breeding Newsl.* 27 : 8.