

## 벼 꽃가루 캘러스의 低溫處理에 의한 耐冷性 器內選拔

양세준\* · 오병근  
영남 작물 시험장

### Selection of Rice Primary Pollen Callus with Improved Cold Tolerance

Sae Jun YANG\* and Byeong Geun OH

Yeongnam Crop Experiment Station, Milyang, 627-130. \*Corresponding author.

To obtain cell lines showing high level of rice cold tolerance, direct in vitro selection through cold stress on primary pollen callus derived from anther culture was carried out. Genotypic difference in callus formation and plant regeneration was recognized. Rates of albino was increased along the duration of cold stress. Reciprocal effects were not noticed in anther culturability. There was no variants related to rice leaf discoloration in pollen derived lines from parental varieties regardless of days of cold stress. The regeneration and recombination of rice leaf discoloration in 146 pollen-derived lines, 70 pollen-derived lines from cold stress at 0° C for 10 days, and 830 F<sub>2</sub> plants presented normal distribution curves with skewness in tolerance and no significant difference among 3 populations. Direct in vitro selection for rice cold tolerance through cold stress on primary pollen callus derived from anther culture, therefore, was revealed ineffective as a in vitro technology.

**Key words:** cold tolerance, in vitro selection, primary pollen callus, rice

조직배양을 이용한 육종방법중에서 藥培養은 半數體수준에서 표현되는 유용열성유전인자의 선발이 용이하고, 육종년한의 단축, 그리고 半數體집단에서 돌연변이 개체를 선발하여 육종재료로서 이용할 수 있기 때문에 변이창성의 주요 도구로 이용되고 있으며, 이를 통해 재배 품종이 육성된 바 있다(김, 1993). 반수체로부터 얻어진 2배체 집단은 90% 이상이 유전적으로 안정되어 있고, 변이를 나타내는 계통중에서도 후대에 분리되는 계통의 비율은 극히 낮거나 없는 동형접합체로 알려져 있다. 고등식물의 세포나 조직을 기내에서 배양하게 되면 돌연변이가 발생하게 되는데 식물조직배양에서 나타나는 이러한 체세포변이(somaclonal variation)는 유용 유전자의 중요한 급원이 될 수 있다(정 등, 1991). 반수체를 이용한 변이체 선발은 약배양의 효율증진에 따라 대사억제물질, 환경장해, 제초제 및 식물병원독소등의 연구에 널리 이용되고 있다(Kinoshita et al., 1987;

Lynch et al., 1991).

본 실험은 赤枯로 표현되는 耐冷性정도가 상이한 자포니카형, 통일형 품종과 품종간 교잡 F<sub>1</sub>잡종개체의 약배양으로부터 형성된 캘러스에서 내냉성 세포를 직접 기내 선발하고자 수행되었다.

### 재료 및 방법

벼 藥에서 형성된 캘러스로부터 저온 stress를 통해 耐冷性細胞를 직접 器內 選拔하고자 耐冷性 정도가 상이한 자포니카형 '낙동벼', 통일형 '밀양 83호', '이리 371호'와 그들의 相互交雜 F<sub>1</sub> 4組合를 공시하였다.

건전하게 생육한 벼 이삭의 선단부가 止葉아래잎의 葉耳까지 자랐을 때 切取하여 증류수에 이삭 基部를 담근 채

비닐로 싸서 12°C에 15일간 前處理하였다. 外觀으로 葯의 全長이 穎花全長의 1/3-1/2정도 자란 1核性 小孢子期の 葯을 30 g/L sucrose, 8 g/L agar가 함유된 N6-Y1 기본배지 (Chung, 1988)에 2.0 mg/L NAA, 1.0 g/L kinetin, 2.0 mg/L ABA를 첨가하고 pH를 5.8로 조정한 후 페트리디쉬(직경 6.5 cm)에 100葯씩 치상하여 캘러스를 형성시켰다. 캘러스형성이 육안으로 확인되기 전까지는 암상태로 유지시키고 캘러스 형성후 20일에 치상된 葯수에 대한 백분율(%)로 캘러스 형성율을 조사하였다. 형성된 캘러스를 배양병(직경 9.5 cm)에 이식하기 전에 0°C에 2일, 5일, 10일간 저온 stress를 가하고 무처리구와 함께 0.1 mg/L NAA, 2.0 mg/L kinetin이 첨가된 N6-Y1 기본배지에 이식하여 식물체를 분화시켰다. 식물체 분화배지의 sucrose와 agar는 캘러스형성배지와 동일한 수준이었으며, 이식된 캘러스는 1일 12시간 2,500 Lux 조명하에서 26±1°C 항온으로 배양하였다. 식물체 분화율은 이식된 캘러스에 대한 백분율(%)로 조사하였다.

인위적인 赤枯發生을 유도하기 위하여 자연이배체로 분화된 식물체에서 채종된 종자를 계통으로 취급하여 7월 15일 파종, 8월 15일 이양하는 극만식 재배조건을 부여하였다. 시비수준은 10a당 성분량으로 N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O=12-6-6(kg/10a)으로 하고 실험오차를 줄이기 위하여 전량 基肥로 사용하였다. 극만식 재배조건에서의 赤枯發生정도는 IRRI 달관조사 기준에 의하여 1-9의 계급(1: 정상적 잎색, 9: 고사)으로 조사하였으며, 기타 재배는 Yang 등(1992)의 극만식재배에 준하였다.

## 결과 및 고찰

유전자형이 상이한 자포니카형 “낙동벼”, 통일형 “밀양 83호”, “이리 371호”와 그들간에 相互交雜된 4組合의 F<sub>1</sub>을 공시하여 葯培養한 결과는 Table 1과 같다. 약치상 후 3주 후부터 캘러스형성이 관찰되었으며, 캘러스 형성후 20일에 조사한 캘러스 형성율에 있어서 자포니카형 품종인 “낙동벼”는 24.6%, 통일형 품종인 “밀양 83호”, “이리 371호”는 각각 3.5%, 4.5%로서 생태형간에 뚜렷한 차이가 인정되었다. 자포니카형 “낙동벼”와 통일형 “밀양 83호”가 상호교잡된 F<sub>1</sub>에 있어서 캘러스 형성율은 14.3-14.9%로서 양친의 평균치에 분포하였으나, 통일형 “이리 371호”와 “밀양 83호”가 상호교잡된 F<sub>1</sub>에 있어서의 캘러스 형성율은 5.9-7.1%로서 양친에 비해 다소 높게 나타났다.

또한 상호교잡에 따른 차이 즉 세포질 효과는 인정되지 않았다. 이러한 결과는 대부분의 자포니카형 품종은 인디카형 품종이나 통일형 품종보다 캘러스 형성율이 높다고 보고한 李 등(1985)의 결과와 일치하였고, 캘러스 형성율이 배양조

Table 1. Difference in the frequency of callus formation in parental varieties and their F<sub>1</sub> hybrids.<sup>a</sup>

Materials	No. of anthers inoculated <sup>b</sup>	No. of callus formed	Frequency <sup>c</sup> (%)
Parental Var./Line			
Nagdongbyeo	26,500	6,530	24.6
Milyang 83	30,000	1,068	3.5
Iri 371	28,600	1,298	4.5
F <sub>1</sub> hybrids			
Nagdongbyeo/Milyang 83	73,900	10,987	14.9
Milyang 83/Nagdongbyeo	63,300	9,028	14.3
Iri 371/Milyang 83	36,900	2,606	7.1
Milyang 83/Iri 371	39,300	2,313	5.9

<sup>a</sup> N6-Y1+2.0 NAA+1.0 KIN+2.0 ABA.

<sup>b</sup> Cold pretreatment for 15 days at 12°C before anther inoculation.

<sup>c</sup> Callus formation=(Callus formed/Anthers inoculated)×100(%).

건 보다도 어떤 특정 유전자형에 따라 크게 좌우된다고 한 Chaleff(1979)의 보고 이후 약배양에서 인정되고 있는 사실이다. 相互交雜에 따른 차이가 인정되지 아니한 결과는 Yang(1988)과 Sohn과 Yang(1993)의 보고와 유사하였다.

캘러스 형성후 20일에 캘러스형성율을 조사한 뒤 캘러스가 생육하고 있는 페트리디쉬(직경 6.5 cm)를 0°C 2일, 5일, 10일의 저온 stress를 가하고, 무처리구와 함께 식물체분화배지에 캘러스를 이식한 결과는 Table 2와 같다. 무처리구에 있어서 이식한 캘러스를 기준으로 한 식물체 분화율을 보면 자포니카형 “낙동벼”, 통일형 “밀양 83호”, “이리 371호”는 각각 52.2%, 38.3%, 34.3%로 나타났으며 자포니카형 “낙동벼”와 통일형 “밀양 83호”가 相互交雜된 F<sub>1</sub>에서는 42.5-46.7%, 통일형 “이리 371호”와 “밀양 83호”가 相互交雜된 F<sub>1</sub>에서는 19.5-21.7%로 나타나 모본과 교배조합에 따른 차이가 인정되었다. F<sub>1</sub>의 경우 품종형간 교잡인 “낙동벼”와 “밀양 83호”의 상호교잡에서는 양친의 평균치에 분포하여 캘러스 형성율의 양상과 비슷하였으나, 품종형내 교잡인 “이리 371호”와 “밀양 83호”의 상호교잡에서는 양친의 분화율에 미치지 못하였다. 식물체 분화율에서도 상호교잡에 따른 차이는 인정되지 않았다.

저온 stress를 가한 캘러스를 식물체 분화배지에 이식했을 때, 저온처리 일수가 길어질수록 식물체 분화율이 낮아졌으며 모본과 교배조합에 따른 차이는 무처리와 비슷하였으며, 백색체 분화율이 증가되는 경향으로 나타났다. 자포니카형 및 자포니카형과 통일형이 교잡된 F<sub>1</sub>보다는 통일형 및 통일형간의 교잡 F<sub>1</sub>에서 백색체 분화율이 상대적으로 증가하여 백색체 분화율 또한 유전자형에 따른 차이를 인정할 수 있었다.

자포니카형 및 자포니카형과 통일형이 상호교잡된 F<sub>1</sub>보

**Table 2.** Changes in the frequency of plant regeneration according to days of cold stress at 0°C after callus formation.<sup>a</sup>

Parents /Hybrids	No. of days at 0°C on callus	No. of callus inoculated	Plant regenerated <sup>b</sup>		
			Tata (%)	Green plant (%)	Albino (%)
Nagdongbyeo	C	1200	627(52.2)	407(33.9)	220(18.3)
	2	1400	638(45.6)	444(31.7)	194(13.9)
	5	1700	532(31.3)	296(17.4)	236(13.9)
	10	1300	398(30.6)	214(16.5)	184(14.1)
Milyang 83	C	240	92(38.3)	42(17.5)	50(20.8)
	2	220	62(28.2)	30(13.6)	32(14.6)
	5	210	39(18.6)	15( 7.1)	24(11.5)
	10	190	29(15.3)	9( 4.8)	20(10.5)
Iri 371	C	210	72(34.3)	25(16.7)	37(17.6)
	2	200	42(21.0)	24(12.0)	18( 9.0)
	5	200	57(28.5)	20(10.0)	37(18.5)
	10	200	58(29.0)	18( 9.0)	40(20.0)
Nagdongbyeo /Milyang 83	C	1500	637(42.5)	365(24.4)	272(18.1)
	2	1800	680(37.8)	392(21.8)	288(16.0)
	5	1800	657(36.5)	410(22.8)	247(13.7)
	10	1700	455(26.8)	188(11.1)	267(15.7)
Milyang 83 /Nagdongbyeo	C	1900	888(46.7)	619(32.5)	269(14.2)
	2	1800	764(42.4)	498(27.7)	266(14.7)
	5	1800	592(32.9)	333(18.5)	247(14.4)
	10	1900	502(26.4)	205(10.8)	297(15.6)
Iri 371 /Milyang 83	C	350	76(21.7)	30( 8.6)	46(13.1)
	2	410	56(13.7)	19( 4.6)	37( 9.1)
	5	400	59(14.8)	16( 4.0)	43(10.8)
	10	310	38(12.3)	13( 4.2)	25( 8.1)
Milyang 83 /Iri 371	C	410	80(19.5)	37( 9.0)	43(10.5)
	2	390	69(17.7)	33( 8.5)	36( 9.2)
	5	380	42(11.1)	13( 3.4)	29( 7.6)
	10	350	46(13.1)	14( 4.0)	32( 9.1)

<sup>a</sup>N6-Y1+0.1 NAA+2.0 KIN.

<sup>b</sup>Plant regeneration=(Plant regenerated/Callus inoculated) ×100(%).

다도 통일형 및 통일형간에 상호교잡된 F1에서 이식된 캘러스의 갈변화가 빨리 진행됨이 관찰되었다. 품종별 식물체 분화율은 내냉성이 강한 “낙동벼”, “이리 371호”는 무처리에서 각각 52.2%, 34.3%였으며 0°C 10일 처리에서는 각각 20.6%, 29.0%로서 LD 50치가 0°C 10일이상 이었으나, “밀

**Table 3.** Variation of leaf discoloration in rice pollen-derived lines regenerated from cold-stressed callus.

Parents /Hybrids	No. of days at 0°C on callus	No. of lines tested	Degree of leaf discoloration								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nagdongbyeo	C	39	39								
Acp	2	43	43								
	5	57	57								
	10	40	40								
	-	-	* <sup>a</sup>								
Nagdongbyeo (CK)	C	146	8	50	35	30	13	7	2	1	
Nagdongbyeo/ Milyang 83 Acp	2	72	6	27	21	9	5	3	1		
	5	45	6	17	13	5	3	1			
	10	70	2	26	20	11	6	3	2		
	-	-	* <sup>a</sup>								
Milyang 83/ Nagdongbyeo Acp	C	55	4	21	11	9	4	4	2		
	2	64	2	18	14	12	9	5	3	1	
	5	42	2	16	10	8	3	2	1		
	10	49	3	17	12	8	5	3	1		
Milyang 83 Acp	C	7								7	
	2	6								6	
	5	6								6	
	10	4								4	
Milyang 83(CK)	-	-								*	
Iri 371 Acp	C	7						7			
	2	5						6			
	5	6						6			
	10	4						4			
Iri 371(CK)	-	-						*			
Iri 371/ Milyang 83 Acp	C	10	2	4	2	1	1				
	2	7	-	3	2	1	1				
	5	6	1	2	1	1	1				
	10	9	1	3	2	1	1	1			
Milyang 83/ Iri 371 Acp	C	17	3	6	3	2	2	1			
	2	11	1	5	3	1	1				
	5	6	-	3	2	1					
	10	8	-	3	2	1	1	1			

<sup>a</sup>Degree of leaf discoloration in the parental variety.

양 83호”는 무처리에서 38.3%, 0°C 5일 처리에서 18.6%로서 LD 50치가 0°C 5일로 나타나 캘러스 수준에서의 내냉성 차이가 인정되었으며 상호교잡 F1에서도 모본의 내냉성 차이가 캘러스 수준에서 인정되었다.

器內에서 생육시킨 약배양 유래 식물체를 경화 처리후 온실에 이양하였으며, 저온 stress 처리별 집단을 작성한 뒤 자연 2배체로 분화되었거나 반수체 이삭가운데 임실된 개체로부터의 종자를 채종하여 계통으로 취급하였다. 인위적으로 赤枯發生을 유도하기 위하여 7월 15일 파종, 8월 15일 이양하는 극만식 재배 포장에 모본품종, 모본품종의 약배양 집단, 상호교잡 F1의 약배양 집단을 저온 stress 처리에 따라 동시에 공시하여 赤枯發現 樣相을 조사하였다. 고정도가 높은 육성품종(계통)인 “낙동벼”, “밀양 83호”, “이리 371호”의 약배양 후대계통에서는 무처리나 저온 stress 처리일수에 따른 赤枯發現程度가 다른 변이체는 찾아볼 수 없었다 (Table 3). 자포니카형 “낙동벼”와 통일형 “이리 371호”는 赤枯發現程度가 각각 Degree 1, 3으로 낮은 반면 통일형 “밀양 83호”는 Degree 9로서 뚜렷한 차이를 보였다. 相互交

雜 F1에서 유래된 약배양 후대계통에서는 양친의 범위내에 대부분이 분포하였으나 내냉성이 인정되는 적고가 낮은 방향의 초월 분리 계통이 출현하였다. 반면 저온 stress 처리 일수의 증가에 따라 赤枯로서 평가한 耐冷性 정도의 증가는 인정되지 않았음을 볼 수 있었다.

특정한 유전자형이 偏倚될 위험을 피하기 위하여 계통으로서 극만식재배에 공시된 집단중 크기가 큰 “낙동벼”와 “밀양 83호”가 교배된 조합을 선정하여 0°C 10일간 저온 stress 처리된 캘러스에서 분화된 집단과 무처리에서 분화된 집단을 F2 집단과 비교했을 때 집단간에 뚜렷한 차이를 인정할 수 없었다(Figure 1). 이러한 결과는 교배된 組合 F1의 藥培養 分化個體의 後代系統에 있어서 表現形質의 변이를 分離世代인 F2 집단과 비교한 실험에서 두 집단간에 뚜렷한 차이를 인정하지 못한 Yang 등(1987)의 결과와 일치하였다. 고정도가 높은 품종의 약배양 분화개체의 후대계통에도 어느 정도의 체세포 변이체가 발생한다는 보고가 있었으나(Schaeffer, 1982), 본 실험에서는 있어서 赤枯發現에 차이가 나는 계통은 없었다. 따라서 벼 약배양에서 최초형성된 캘러스를 저온 stress 처리하고 내냉성 세포를 직접 기내선발하는 효과는 인정되지 않았으므로, 현탁세포배양 체계를 확립하여 Kinoshita 등(1989)이 제시한 내염성 세포의 기내선발 체계를 응용하는 것이 바람직 할 것으로 생각된다.

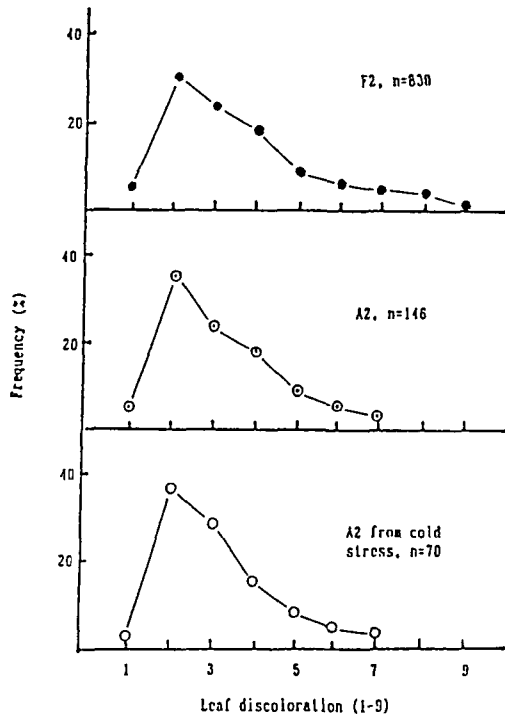


Figure 1. Frequency distribution on leaf discoloration(as a criteria for cold tolerance)in F2, A2, and A2 from cold stress populations of the cross between Nagdongbyeo and Milyang 83.

## 적 요

耐冷性的 指標로 이용되는 赤枯의 發現程度가 상이한 벼品種 및 育成系統과 그들이 相互交雜된 F1의 藥培養에서 최초 형성된 캘러스(primary callus)를 저온 스트레스(stress) 처리하여 耐冷性 細胞의 器內選抜 가능성을 검토하였다. 캘러스 형성율이나 저온 스트레스를 통한 식물체 분화율은 자포니카형이나 자포니카형/통일형 조합이 통일형이나 통일형간 조합보다 높았으며 저온 스트레스 처리일수의 증가에 따라 백색체 분화율이 증가하는 경향을 보였다. 약배양 효율에 있어서 相互交雜에 따른 細胞質效果는 나타나지 않았다. 고정도가 높은 품종이나 교잡 F1의 약배양 후대 계통에서 캘러스의 저온 stress 처리일수에 따른 赤枯 發現程度의 變異가 인정되지 않았다. 赤枯發現 程度가 상이한 品種間 交雜 F1에서 유래된 藥培養 後代 系統의 赤枯 發現은 양친 범위 내에 대부분이 분포하였으나 赤枯 發現이 낮은 방향의 초월분리계통도 나타났다. 최초 형성된 캘러스의 저온 stress 처리(0°C 10일)에서 분화된 약배양 계통, 무처리에서 분화된 약배양 계통과 F2 집단간에는 赤枯 發現의 빈도 분포에서 차이가 인정되지 않았다. 따라서 벼 약배양에서 최초 형성된 캘러스 수준에서 저온 스트레스를 통해 내냉성 세포를 직접적인 기내선발방법은 효과적이지 못함이 밝혀졌다.

## 인 용 문 헌

- Chaleff R S (1979) Tissue culture in rice improvement, A paper presented at the International Rice Research Conference IRRI, pp 1-13
- Chung G S (1988) Rice (*Oryza sativa* L.) Anther Culture, In Cell and Tissue Culture in Field Crop Improvement, FFIC Book series No. 33, pp 94-107
- Kinoshita T, K Mori and T Mikami (1989) Somaclonal selection of physiological mutants through plant cell culture. In M. Maluszynski, ed ; Current options for Cereal Improvement, Kluwer Academic Publishers, pp 81-96
- Lynch P T, R P Finch, M R Davey and E C Cocking (1991) Rice tissue culture and its application. In Gurdev S Khush, Gary H Toenniessen, eds, Rice Biotechnology, IRRI, pp 135-156
- Schaeffer G W (1982) Recovery of heritable variability in anther-derived doubled-haploid rice. *Crop Sci* 22: 1160-1164
- Sohn J K and S J Yang (1993) Genetic analysis of callus formation and plant regeneration in anther culture of rice. *Korean J Breed* 25: 102-107
- Yang S J (1988) Increase of cultural efficiency and genetic variability of anther-derived plant in rice (*Oryza sativa* L.) anther culture. *Res Rept RDA* 30-1(B): 1-20

Yang S J, S K Lee and G S Chung (1992) Rice leaf discoloration in latest season planting and its inheritance. Korean J Breed **24**: 207-213

Yang S J, B G Oh, G S Chung and J K Sohn (1987) Variability of anther-derived plants in rice (*Oryza sativa* L.) II Variability of anther-derived plants in quantitative characters. Korean J Breed **19**: 378-381

김호일 (1993) 식물 조직배양 기술 및 그 이용, 유전공학 이론과 응용. 농업유전공학연구소, pp 438-451

정근식 등 (1991) 半數體와 植物育種. 형설출판사, pp 132-141

李壽寬, 孫再根, 朴來敬, 諸商津 (1985) 벼 藥培養에 있어서 callus 誘起 및 植物體 分化率의 品種間 差異. 원암 제상올 박사 회갑기념 논문집, p 288-293

(1993년 7월 9일 접수)