

보리의 未熟胚培養 時 胚의 成熟程度, 生長調節物質 및 低溫處理가 植物體 再生과 生育에 미치는 影響

박용주* · 유창연** · 조동하** · 장병호** · 정일민*** · 안상득**

Effect of Embryo Age, Growth Regulators, and Low Temperature Treatment on Regeneration and Plant Growth in Immature Embryo Culture of Barley

Yong Chu Park* · Chang Yeon Yu** · Dong Ha Cho**
Byong Ho Chang** · Il Min Chung*** and Sang Deuk Ahn **

ABSTRACT : This study was conducted to determine the effects of embryo age, growth regulators, low temperature treatment on regeneration, plant growth, and heading in immature embryo culture of Barley. Shoot and root development was more in older than in younger excised embryos, and more in a medium without kinetin than in one with kinetin. The rate of survival was higher on medium without growth regulators and lower on medium with kinetin 5 mg /L because of retarded plant growth.

Embryo age and media did not completely replace low temperature treatment. Twenty- and 14 day-old embryos responded by flowering after 4 weeks of vernalization. Embryo culture at 14- and 20 days after anthesis coupled with 4-week cold treatment shortens generation time of barley. When 20 day immature embryos of barley (cv. Olbori) was treated low temperature treatment for 4 weeks, the rate of heading was better than the other treatment.

Key word : Immature embryo culture, Barley, Plant regeneration

麥類는 秋播性程度에 따라서 秋播型和 春播型으로 분류되는데, 이들 추파형 맥류는 일정기간 저온 처리를 하여야만이 出穗를 할 수 있다. 그러나 일반적인 춘화방법은 출수까지 많은 시일이 소요되므로 1년에 여러세대를 요구하는 유전, 육종의 연구

에 있어서는 많은 어려움이 따르게 된다. 그러므로 세대단축을 촉진시키므로써 육종의 효율을 제고하고, 관련 요인들을 구명하기 위한 많은 연구들이 시도되고 있다. 출수에 영향을 미치는 요인들로는 遺傳子型, 低溫處理期間^{3,10)}, 植物生育段階⁹⁾, 春花

* 韓農 種苗 株式會社 育種研究室 (Laboratory of Breeding, Hannong Seed Co.)

** 江原大學校 農科大學 資源植物開發學科 (Department of Plant Resources, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea)

*** 建國大學校 農科大學 農業資源研究所 (Agriculture Resources Institute, College of Agriculture, Kunkuk University, Seoul 133-701, Korea)

〈'94. 9. 23 接受〉

處理方法¹¹⁾, 日長 및 Kinetin, Gibberellin, Auxin^{2,9,11)}과 같은 化學物質인것으로 보고되고 있다. 胚培養은 未熟胚培養에 의한 育種年限의 단축, 半數體 生産, 交雜不和合性的 克服, 器內繁殖 始發材料^{4,5,6,12)} 등에 널리 이용되고 있으며 Sharma와 Gill¹³⁾은 밀의 미숙배를 배양하므로써 40일의 육종 기간을 단축하였다고 보고하였다. 따라서 본 실험에서는 과성이 다른 보리의 胚를 成熟程度, 低溫處理期間, 植物生長調節物質의 종류 및 농도가 기관 재생, 식물의 生育 및 出穗에 어떠한 영향을 미치는가에 대한 일련의 연구를 실시하였으며 그 결과를 소개하고자 한다.

材料 및 方法

供試品種은 江原大 農科大學 實驗圃場의 麥類品種區에서 播性I인 강보리와 播性IV인 올보리를 사용하였으며, 이 두 품종은 과중후 출수가 시작되었을 때 각각 이삭에 개화일을 표시하고 개화 후 14일과 20일이 되었을 때 미숙종자를 채취하여 시료로 사용하였다. 배양배지는 Murashige & Skoog 배지⁸⁾에 Sucrose 3%, Agar 0.8%, myo-inositol 0.4mg/l, L-arginine-HCl과 glycine 및 L-tyrosin을 첨가하였다. 배지의 양은 시험관(20×300mm)에 15ml씩 분주하였다. 배지의 pH는 5.8로 조절하였고, 고압멸균기로 20분간 멸균하였다. 배양은 온도가 25℃인 배양실에서 조도 2000 Lux의 광도하에서 24시간 장일조건에서 실시하였다. 시료의 소독은 미숙종자를 채취하여 무균상에서 70% 에탄올에 1분간 담근 후 멸균수로 1~2회 세척하여 15% NaOCl액에 넣고 20분간 회전시키면서 소독하고 멸균수로 3~4회 흔들어 씻어낸 후에 解剖顯微鏡下에서 未熟胚를 摘出하여 시험관에 치상하였다. 미숙배(개화후 14일, 20일)는 각각 GA₃ (1 mg/l, 5 mg/l)와 Kinetin(0.5 mg/l, 5 mg/l)이 첨가된 배지에 치상한 후 배로부터 shoot의 형성일을 조사하고, 10일후에 식물체의 초장, root 길이, root수, shoot수를 조사하였다. 조사후 각 미숙배별로 5℃의 냉장실에서 4수준으로 저온처리(0, 2, 4, 6주)를 하였다. 저온처리후 생육조사를

실시하고 총 240개를 처리별로 Pot에 옮겨 심은 후 낮 26℃, 밤 15℃이며 일장은 장일조건인 온실에서 재배하였다. 그 후 식물체의 생존율과 출수 시기를 조사하였는데 출수일은 이삭이 완전히 밖으로 나온 것을 기준으로 조사하였다.

結果 및 考察

1. 未熟胚로부터 식물체 유도

강보리와 올보리의 受精후 14일, 20일된 미숙배를 농도를 달리한 GA₃와 Kinetin을 첨가한 MS배지에 치상하여 shoot형성의 소요일수를 그림 1에 나타내었다. 강보리의 14일, 20일된 미숙배에서는 Kinetin 0.5mg/l와 GA₃ 5mg/l처리한 것이 shoot形成日이 빨랐으며, 배성속도에 따라서는 20일된 미숙배가 14일된 미숙배보다도 모든 생장조절물질처리에서 shoot형성일이 빠르게 나타났다. (그림 1-A).

올보리도 강보리와 같이 14일, 20일된 미숙배에서 모두 Kinetin 0.5mg/l, GA₃ 5mg/l 처리한 것이 shoot形成日이 가장 빨랐고, 20일된 미숙배는 GA₃ 5mg/l처리한 것이 무처리한 것보다 1.3일

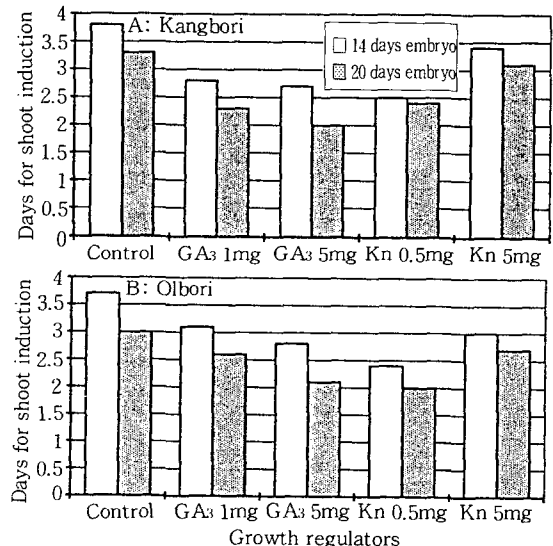


Fig. 1. Effect of embryo ages and growth regulators on shoot formation in immature embryo cultures of barley.

정도 빨랐으며, 14일된 미숙배에서는 Kinetin을 0.5 mg/l 처리하였을 때 1.4일 빨랐다(그림 1-B). 그러나 14일, 20일 된 미숙배를 배양하여 식물체를 유도하는 데에는 성장조절물질이 첨가 안된 MS배지만으로도 충분한 효과를 얻을 수 있었다. Kinetin과 GA₃가 shoot형성을 촉진시킨다는 결과에 대해서는 Andrews & Simpson¹¹은 Gibberellin이, Sharma와 Gill¹³은 Kinetin이 胚로부터의 shoot형성을 촉진시킨다는 보고와 일치하였으나, Kinetin의 농도가 높아짐에 따라 shoot형성은 억제되어지는 결과를 얻었다.

2. 유도된 식물체의 土壤 生存率

각 배지조성별 분화된 식물체의 토양 生存率은 Kinetin이 첨가된 배지에서 낮게 나타났는데, 특히 높은 농도의 Kinetin이 첨가된 배지일수록 생존율은 낮았다(표1). 無處理 배지에서는 생존율이 높았으며, GA₃가 첨가된 배지에서는 GA₃ 1mg/l가 첨가된 배지가 GA₃ 5mg/l가 처리된 배지에서 보다도 생존율이 높았다. 이는 GA₃의 농도가 높은 배지에서는 식물체가 너무 웃자랐으며, 식물체가 연약하게 자라는 형태로 이러한 요인이 생존율을 낮추는 것으로 사료된다. 올보리도 무처리 배지에서 생존율이 가장 높았으며, Kinetin이 처리된 배

Table 1. Mean survival percentage of barleys (cv. Kangbori and Olbori) seedling regenerated from embryos of different ages on medium with different plant growth regulators

Embryo age	Growth regulator(mg/l)	% of survival	
		Kangbori	Olbori
14 days	Control	96.5	94.0
	GA ₃ 1	93.5	91.2
	GA ₃ 5	87.0	79.5
	Kn 0.5	73.0	71.4
	Kn 5	52.5	48.0
20days	Control	95.1	99.5
	GA ₃ 1	95.5	93.0
	GA ₃ 5	85.4	80.0
	Kn 0.5	80.4	69.2
	Kn 5	60.0	54.1

Data were taken after the seedlings had been vernalized and transplanted until heading

지에서는 생존율이 낮게 나타났다. 특히 Kinetin이 5mg/l이 첨가된 배지에서 14일 미숙배는 생존율이 48%로 가장 낮았다. 이러한 결과는 Kinetin의 농도가 높아짐에 따라 발근 및 뿌리의 생장을 억제하여 생존율이 낮아지는 것으로 보였으며, Sharma와 Gill¹²이 밀의 미숙배를 배양하여 식물체를 토양에 이식하였을 때도 Kinetin을 첨가한 배지에서 자란 식물체가 기본배지에서 자란 식물체보다 뿌리의 생육이 저조하였으며, 토양에서의 생존율도 낮았다고 보고하여 보리를 재료로 사용한 본실험의 결과와 비슷하였다.

3. 低温處理에 따른 植物體의 生育

未熟胚로부터 分化된 植物體를 각각 低温處理를 달리한 후 生育調査를 한 결과가 表 2에서 보는 바와 같다. 강보리 14日胚를 저온처리한 후 각 성장조절물질에 따른 배지별 草長과 root數, shoot數의 생육을 비교하여 보면 Kinetin이 첨가된 배지에서는 14일, 20일배 모두 다른 배지에서 보다 생육이 나뉘었다. Kinetin이 첨가된 배지에서는 식물체의 初期器官形成중 뿌리를 抑制하는 것으로 나타났다. GA₃ 5mg/l가 첨가된 배지에서 식물체가 가장 좋은 생육을 보였으며, 무처리 배지에서는 GA₃가 처리된 배지에서 보다도 생육이 떨어지지만 Kinetin이 처리된 배지에서 보다는 좋게 나타났다. Shoot數는 저온처리 전에는 生育조절물질 처리별로 큰차이가 보이지 않았으나, 저온처리 후에는 Kinetin이 처리된 배지에서 적게 나타났다. 올보리도 14일, 20일배의 저온처리에 따른 차가 크게 나타나고 있다. 배지의 성장조절물질에 따른 생육정도는 14일, 20일배 모두 Kinetin이 첨가된 배지에서 생육이 불량한 반면 GA₃ 5mg/l가 처리된 배지에서는 좋은 생육을 보였다. 식물체를 低温處理한 後에도 Kinetin의 濃度가 높을수록 減少하는 것은 Kinetin이 shoot보다는 root의 發達을 抑制시키기 때문이라고 사료된다(표 2). 이러한 Kinetin의 억제효과는 Sharma & Gill¹³, Kim & Chang⁷이 Kinetin의 뿌리의 생육을 억제시킨다는 보고와 일치하였다.

4. 出穗

播性이 IV인 올보리의 14日된 胚와 20日된 胚를

Table 2. Growth characteristics of barley seedlings developed from embryos with different days of low temperature treatments

Embryo age	Ver. period (weeks)	Growth regulator	Plant height		No. of root per plant		No. of shoot per plant		
			Kangbori	Olbori	Kangbori	Olbori	Kangbori	Olbori	
14 days	0	C*	22.5±3.1	22.3± 8.6	7.4±1.8	5.0±2.0	5.5±1.8	4.6±2.1	
		G1	24.7±2.8	30.3±13.7	8.3±2.1	5.0±1.2	6.3±1.5	4.3±0.6	
		G2	39.0±2.3	45.8±11.2	6.3±0.6	5.3±1.5	5.0±0.0	5.0±1.0	
		K3	20.3±1.9	19.3± 4.7	4.3±0.6	3.0±1.0	3.7±1.5	3.3±0.6	
		K4	9.9±2.8	8.5± 3.5	2.2±1.0	1.6±0.6	3.7±0.6	2.6±0.6	
	4	C	28.2±2.2	24.6± 2.3	7.3±1.5	7.0±1.0	5.1±2.1	5.1±1.5	
		G1	29.9±2.1	23.5± 3.1	8.7±2.9	5.1±1.2	3.6±1.5	3.6±0.6	
		G2	34.5±2.2	31.7± 1.8	9.7±3.6	6.7±2.1	4.0±0.8	4.0±1.0	
		K3	13.5±3.1	16.9± 0.3	3.7±0.6	3.0±0.0	3.6±1.2	3.6±0.6	
		K4	11.4±3.3	12.7± 4.7	2.3±1.2	2.3±0.6	4.0±0.6	4.0±1.0	
	6	C	26.2±0.4	25.3± 1.6	7.6±0.6	6.3±0.6	4.7±0.6	4.3±0.6	
		G1	23.8±3.8	26.8± 2.8	8.0±3.0	5.7±1.5	4.7±1.2	3.3±0.6	
		G2	33.2±7.0	32.2±10.3	6.0±1.0	4.0±0.0	4.2±0.0	4.0±0.0	
		K3	17.3±2.0	16.9± 2.4	3.0±0.0	3.0±0.0	4.0±1.0	3.0±0.0	
		K4	-	12.8± 4.4	-	2.6±0.6	-	2.9±0.6	
	20 days	0	C	23.8±1.0	32.6± 1.5	11.0±0.6	8.0±2.0	8.0±1.0	4.1±0.6
			G1	26.2±8.0	27.1± 1.6	10.0±1.0	8.0±1.0	6.3±1.2	4.5±2.3
			G2	32.3±2.8	42.4± 2.5	8.7±0.6	8.0±0.0	6.7±1.5	5.2±0.6
K3			20.7±9.4	22.1± 6.6	5.3±2.3	4.0±1.7	4.0±2.6	3.0±0.6	
K4			17.0±4.4	15.3± 4.3	3.0±0.0	3.0±1.0	3.7±0.6	3.0±1.0	
4		C	23.7±0.8	24.4± 2.2	7.3±0.6	8.0±1.2	5.7±0.6	8.0±4.0	
		G1	28.3±1.6	27.2± 2.7	8.0±0.0	7.3±0.6	5.0±0.6	7.3±2.1	
		G2	32.2±1.1	34.0± 1.1	7.4±3.0	8.0±0.0	6.0±1.0	5.0±0.0	
		K3	14.7±1.3	18.8± 9.5	3.0±1.0	4.0±1.0	3.7±0.6	3.7±1.5	
		K4	9.9±1.5	13.9± 2.7	2.0±0.0	3.0±1.0	4.0±0.0	4.7±0.6	
6		C	24.7±3.3	26.5± 2.9	8.7±0.6	6.3±0.6	6.3±0.6	5.3±0.6	
		G1	28.3±10.7	26.9± 1.1	10.8±1.7	7.3±1.2	5.3±0.6	6.7±2.1	
		G2	31.9±2.8	39.2± 4.8	9.0±1.2	6.7±0.6	7.3±2.5	6.0±1.7	
		K3	13.4±0.9	19.5± 1.3	3.3±0.6	5.0±1.0	3.0±0.0	4.3±1.5	
		K4	10.4±1.3	10.1± 0.6	1.3±0.6	1.7±0.6	4.3±1.2	2.3±0.6	

*: Control, G1:GA₃ 1 mg /l, G2:GA₃ 5 mg /l, K3:Kinetin 0.5 mg /l, K4:Kinetin 5 mg /l
 Values were represent the mean of 10 replication±SD

각각 5℃에서 2, 4, 6주의 저온처리를 하였을 때 출수율은 표 3과 같다. 14일배를 2주간 처리하였을 때는 출수되지 않았으며, 4주 처리시에는 토양에 이식후 50일까지는 66.3%가 출수되었으며, 60일까지는 83.9%가 출수되었다. 그러나 6주처리하였을 때는 50일까지 89.2%가 출수하고 60일까지는 95.4%의 출수율을 보였다. 미숙배의 치상후 출수 때 까지의 평균일수는 14일된 배를 4週間 저온처리 하였을때가 95.8일로 6주간 저온처리 하였을 때인 105日 보다 9日 정도 빨랐다. 또한 20일배를 2주간

처리하였을 때도 출수되지 않았으며, 4주 저온처리 하였을 때는 14일배를 4주간 저온처리 하였을 때보다 出穗率이 높았다. 미숙배를 치상한 후 출수때까지의 평균일수는 20일배를 4주간 저온처리하였을 때가 14일배를 4주간 低溫處理하였을 때보다 15日 정도 빨랐다(표 3). 표 4는 울보리와 강보리의 식물생장조절 처리배지와 저온처리별 14일, 28일, 42일의 출수율을 나타낸것으로서 14일된 배를 14日間 저온처리하였을 때는 어떤 배지에서도 출수되지 않았으나, 울보리는 28일간 저온처리하였을

Table 3. Effect of embryo ages and low temperature treatments on heading of barley after transplanting

Embryo age	Low temperature treatment (weeks)	% of plants headed after transplanting		Number of days to heading after embryo culture
		50 days	60 days	Means
14 days	2	—	—	—
	4	66.3	83.9	95.8
	6	89.2	95.4	105.5
20 days	2	—	—	—
	4	80.3	90.4	88.5
	6	90.5	96.3	102.7

*; Seedlings were cultured on standard medium without growth regulators

Table 4. The percentage of barleys (cv. Kangbori and Olbori) headed on different growth regulators and cold treatment days

Growth regulator (mg /l)	Kangbori (%) ¹⁾			Olbori (%)		
	14 ²⁾	28	42	14	28	42
Control	0	38	52	0	48	53
GA ₃ 1	0	53	41	0	53	36
GA ₃ 5	0	49	42	0	46	43
Kn 0.5	0	36	51	0	38	46
Kn 5	0	31	44	0	34	48

¹⁾; Percentage of heading

²⁾; Days of cold treatment

때는 GA₃ 1mg /l가 처리된 배지에서는 53%로 높은 출수율을 보였으며, 강보리는 Kinetin 5mg /l가 처리된 배지에서는 31%로 낮은 출수율을 보였다. 그러나 저온처리를 하였을 때는 Kinetin처리 배지에서도 출수율이 높았다(표 4). 42일 低溫處理 때에는 Kinetin이 첨가된 배지에서도 출수율이 높았다. 따라서 GA₃이 첨가된 배지에서는 저온처리대체효과가 어느정도 나타났으나, Kinetin이 첨가된 배지에서는 저온처리대체효과를 보이지 못하여 出穗를 遲延시킨다고 생각된다. Sharma & Gill¹²⁾은 겨울밀의 Kinetin이 첨가된 배지에서의 생육이 좋지 않았으며, GA₃를 처리한 배지에서는 좋은 결과를 보였다. Gibberellin이 저온처리효과가 있다는 것은 Weibel¹⁴⁾의 결과와 같으며, Kinetin이 출수를 억제한다는 것은 Sharma & Gill¹³⁾의 결과와는 일치하나, Barabas & Csepely²⁾의 Kinetin을 겨울밀 종자에 처리하여 저온처리 효과를 보

았다는 보고와는 일치하지 않았다. 이러한 상이한 결과는 미숙배를 Kinetin이 첨가된 배지에서 생육하였기 때문에 식물체의 생육이 억제되고 출수가 지연되지 않았는가 사료된다. 본 실험의 결과에서와 같이 파성이 IV인 보리를 미숙배 상태에서 배양후 저온처리와 지베렐린을 처리한다면 개화후 완숙기까지 걸리는 40일에 가까운 기간을 20~25일을 단축시킬 수 있을 뿐만 아니라, 가을 파종없이도 출수를 위하여 파성소거에 필요한 기간을 단축하리라 사료된다.

摘 要

本實驗은 大麥의 미숙배 배양을 통한 육종기간을 단축하기 위하여 미숙배 배양시 식물체 유도, 생육 및 출수에 영향을 미치는 성장조절물질, 배의 성숙정도 및 저온처리효과를 구명하고자 실시하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1. 미숙배 배양으로부터 줄기의 유도에에는 성장조절물질이 첨가된 기본배지도 효과적이었으며, Kinetin 0.5mg /l와 GA₃ 5mg /l를 처리한 것이 좋았으나 Kinetin농도가 높을 때에는 shoot 유도가 감소되었다.
2. 지베렐린을 1mg /l와 5mg /l 처리한 배지에서 초장, root길이, root수 등이 좋았으나 Kinetin이 처리된배지에서는 생육이 억제되었으며, 특히 뿌리의 생육을 억제하였다.
3. 유도된 식물체의 토양생존율은 Kinetin 5mg /l

처리시에 생존율이 가장 낮았고 무처리에서 가장 높았다.

4. 과성정도가 IV인 올보리의 20일배를 4주저온처리 하였을 때에 출수율이 높았고 출수하는데 소요되는 기간도 짧았다.
5. 저온처리후 Kinetin 5mg/l처리한 것은 초장, root수, shoot수가 적은 반면 GA₃ 5mg/l처리한 것은 생육이 좋았다.
6. 올보리는 성장조절물질과 저온처리에 따라 출수율에 차이를 보였으며 GA₃를 1mg/l처리하고 28일 저온처리하였을때 출수율이 좋았으며, 출수에 소요되는 기간이 짧았다.

引用文獻

1. Andrew, C.J. and G.M. Simpson, 1969. Dormancy studies in seed of *Avena fatua*. Germinability of the immature caryopsis. Can. J. Bot. 47:1841-1849.
2. Barabas, Z. and L.T. Csepely. 1978. Shortening vernalization of winter wheat with kinetin. Euphytica 27:831-835.
3. Berry, G.J., P.A. Salisbury, and G.M. Halloran, 1980. Expression of vernalization genes in near-isogenic wheat lines: Duration of vernalization period. Ann. Bot. 46:235-241.
4. 최상진. 1993. 식물의 조직세포배양. 대한교과서주식회사. p 103-138.
5. Gill, M.S. and Y.P.S. Bajaj, 1984. Interspecific hybridization in the genus *Gossypium* through embryo culture. Euphytica 33:305-311.
6. Kasha, K.J. 1974. Haploids from somatic cells. Haploids in higher plants. Advances and potential. Publ. by the University of Guelph.
7. Kim, E.H. and B.H. Chang. 1985. Effect of phytohormones on the organogenesis and the growth in the mature embryo culture of wheat. J. Sci. Tech. Kangwon National Uni. .
8. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.
9. Paulii, A.W., J.A. Wilson, and F.C. Stickler. 1962. Flowering response in winter as influenced by temperature night and gibberellic acid. Crop Science 2:271-274.
10. Rumi, C.P. 1959. Influence of vernalization and IAA on the vegetative period of wheat. Rev. Fac. Agron. Argentina 35:15-23.
11. Salisbury, P.A., G.T. Berry, and G.M. Halloran. 1979. Expression of vernalization genes in near-isogenic wheat lines: Methods of vernalization. Can. J. Genet. Cytol. 21:429-434.
12. Sharma, H.C. and B.S. Gill. 1980. Effect of kinetin on vernalization and seedling height in winter wheat. Cereal Res. Comm. 8:615-617.
13. Sharma, H.C. and B.S. Gill. 1982. Effect of embryo age and culture media on plant growth and vernalization response in winter wheat. Euphytica 31:629-634.
14. Weibel, D.E. 1960. Effect of gibberellin on the vernalization period of winter wheat. Agron. J. 52:122-123.