

벼의 미수분 자방배양에 영향을 미치는 요인

孫再根* · 權容三 · 金敬旻

경북대학교 농과대학 농학과

Factors Affecting Plant Regeneration in Unpollinated Ovary Culture of Rice

SOHN, Jae Keun* · KWON, Yong Sham · KIM, Kyung Min

Department of Agronomy, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea. *Corresponding author.

The optimal conditions for callus formation and plant regeneration were determined by the manipulation of culture method in unpollinated ovary culture of rice. The effect of cold pretreatment on callus formation and plant regeneration varied with duration of pretreatment. The maximum frequency (38.7%) of plant regeneration was obtained from the unpollinated ovary pretreated for 10 days at 12° C. The ability of callus formation and plant regeneration was higher on the medium with picloram (1 mg/L) than that of 2,4-D (1 mg/L). However, the high concentration of picloram increased markedly the frequency of albino plant from unpollinated ovary-derived callus. Floral parts inoculated as a unit play important roles in callus formation and plant regeneration. Best result was obtained when ovary with partial cut glume, pedicel and secondary branch as a unit was cultured.

Key words : Gynogenesis, Rice haploid, Ovary culture

식물의 미성숙된 약을 기내에 배양하여 획득된 반수체는 육종연환의 단축과 유용열성형질의 선발효율을 높인다는 장점 등으로 인하여 기존 육종방법을 보완하는 하나의 수단으로 널리 이용되어지고 있다. 벼의 경우도 1960년대 후반에 화분소포자 유래의 반수체 생산에 성공한 이후 약배양에 영향을 미치는 여러가지 요인에 대한 연구가 수행되어져(Sathish et al, 1995), 우리나라와 중국에서는 이미 약배양법에 의해 실용품종이 육성되고 있는 실정이다(Chung and Sohn, 1995). 근년에는 식물의 응성생식기관인 약배양법 이외에 자성생식기관인 미수분자방이나 배주배양에서도 반수체가 얻어질 수 있다는 것이 보리, 밀, 옥수수 등에서 보고된 바 있다(San and Gelebart, 1986). 벼의 경우도 1980년에 수분되지 않은 자방을 기내에 배양하여 반수체를 얻는데 성공하였다(Zhou and Yang, 1980). 그 이후 벼의 미수분자방배양에 영향을 미치는 몇 가지 요인에 대한 연구가 수행되었지만 약배양에 비해 배양효율은 크게 개선되지 않고 있는 실정이다(Yi et al, 1996).

벼를 포함한 화분과 작물의 약배양에서 가장 큰 문제점중의 하나가 백색체의 출현율이 높다는 것인데 자방배양의 경우는 약배양에 비해 백색체의 출현빈도가 현저히 낮은

것으로 알려지고 있다(Zhou and Yang, 1991). 그리고 자방배양에 의한 식물체 재분화는 배의 초기발달과 자성생식의 과정을 밝히는 데도 매우 유용하게 이용되어 질 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 벼의 미수분자방배양의 효율을 향상시키기 위하여 자방배양에 알맞은 생장조절제의 농도와 배양재료의 상태 등에 대한 몇가지 실험을 수행하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

본 실험에는 경북대학교 농과대학 실습포장에서 표준재배법으로 재배된 자포니카 품종인 "일미벼"를 공시품종으로 하여, 수잉기에 1행성 화분 소포자를 갖는 이삭을 채취하여 12°C에 10일간 저온처리한 후 내외영의 일부, 자방 및 소지경이 2차지경에 부착된 상태로 배양하였다. 자방배양은 Yi 등(1996)의 방법에 준하여 실시하였으며 저온처리된 자방을 26 ± 1°C로 유지되는 항온실에서 암상태로 30일 동안 배양하여 캘러스를 유기시킨 다음 이들 캘러스를 재분화

배지에 이식하고 명상태(2,500 Lux)로 식물체를 분화시켰다.

자방의 저온처리 조건이 캘러스 형성 및 식물체 재분화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 12°C에서 0, 5, 10, 15일 간 저온처리된 자방을 1 mg/L의 2,4-D, 30 g/L의 sucrose, 6 g/L의 gelrite가 첨가된 N6-Y1 (Chung and Sohn, 1986) 배지에서 30일 동안 배양하여 캘러스를 유지시켰으며, 캘러스 형성률은 배양된 자방의 수와 캘러스를 형성한 자방의 비율로 계산하였다. 이들 캘러스를 1 mg/L의 NAA, 5 mg/L의 kinetin, 30 g/L의 sucrose, 6 g/L의 gelrite가 첨가된 N6 (Chu et al, 1978)배지에 이식하여 45일 동안 재분화된 식물체를 조사하였다. 배지의 종류와 gelrite 첨가 유무가 캘러스 형성 및 식물체 재분화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 1 mg/L의 2,4-D와 sucrose가 30 g/L 첨가된 N6 및 N6-Y1 액체 배지와 6 g/L의 gelrite가 첨가된 고체 배지에 자방을 배양한 다음 캘러스 형성률과 식물체 재분화율을 비교하였다. 생장조절제가 캘러스 형성 및 식물체 재분화에 미치는 영향을 조사하기 위해서 1 mg/L의 2,4-D가 첨가된 배지와 picloram이 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L으로 각각 조절된 배지에 자방을 배양하고 각 처리별로 캘러스 형성률과 식물체 재분화 정도를 비교하였다.

자방배양에 알맞은 배양재료를 선정하기 위하여 저온처리된 이삭의 영화로부터 절취된 자방, 내외영의 일부가 포함된 자방, 수술이 제거되고 3~5개의 영화가 2차지경에 부착된 상태의 자방 등을 배양재료로 이용하여 각각의 캘러스 형성정도와 식물체 재분화율을 비교하였다.

결과 및 고찰

미수분자방에 대한 저온처리가 캘러스 형성 및 식물체 재분화에 미치는 영향을 조사한 바(Table 1), 저온처리기간에 따라 캘러스 형성 및 식물체 재분화 정도가 다르게 나타났는데, 12°C에서 10일 동안 전처리된 자방에서 캘러스 형성률과 식물체 재분화율이 각각 10.7%와 38.7%로 유의성 있는 차이를 나타내었다.

12°C에서 10일간 저온처리된 자방을 N6-Y1 배지와 N6 배지의 액체 및 고체배지에 배양하여 캘러스 형성률과 식물체 재분화율을 조사한 바(Table 2), 식물체 재분화 정도는 두 배지 공히 액체배지에서보다 6 g/L의 gelrite가 첨가된 고체배지에서 현저히 높게 나타났다.

자방배양에 있어서 배지내에 첨가되는 picloram의 농도가 캘러스 형성 및 식물체 재분화에 미치는 영향을 조사한 바(Figure 1), picloram이 첨가되지 않는 배지에서는 캘러스가 전혀 발생하지 않았고, 1 mg/L의 2,4-D가 첨가된 배지보다는 1 mg/L의 picloram이 첨가된 배지에서 캘러스 형성률과 녹색 식물체의 재분화율이 각각 17.2%와 50%로 가장 높게 나타났고 picloram의 농도가 증가함에 따라 백색체의 출현

Table 1. Effect of cold pretreatment on callus formation and plant regeneration in unpollinated ovary culture of rice.

Duration (days, 12°C)	No. of ovaries cultured	% of callus formation	No. of callus transferred	% of plant regeneration	
				green	albino
5	750	4.4 b ^a	100	15.0 c	7.0
10	625	10.7 a	300	38.7 a	9.0
15	450	4.4 b	100	20.0 b	9.0
Control	850	3.5 b	100	10.0 d	5.0

^a Means in each column followed by the same letter are not significantly different (P≤5%) according to Duncan's multiple range tests.

Table 2. Effect of basic medium on callus formation and plant regeneration in unpollinated ovary culture of rice.

Medium	No. of ovaries cultured	% of callus formation	No. of callus transferred	% of plant regeneration	
				green	albino
N6 Solid	200	6.5 b ^a	50	40.0 a	6.0
	Liquid	200	2.0 c	30	23.3 b
N6-Y1 Solid	200	10.0 a	60	41.6 a	6.7
	Liquid	200	1.5 c	30	16.6 b

^a Means in each column followed by the same letter are not significantly different (P≤5%) according to Duncan's multiple range tests.

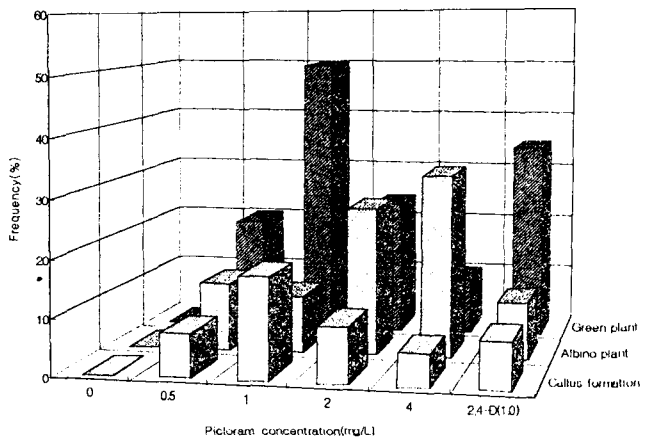


Figure 1. Effect of picloram concentration on callus formation and plant regeneration in unpollinated ovary culture of rice.

빈도가 높아지는 경향이였다.

한편, 미수분 자방만을 벼의 화기로부터 절취하여 배양하였을 때는 캘러스가 형성되지 않았으나 내외영의 일부가 지경에 부착된 상태로 배양하였을 때는 캘러스 형성률이 7.9~9.4%로 높아졌고 식물체 재분화율도 33.5~39.3%로 높게 나타났다(Table 3).

벼의 미수분 자방을 1 mg/L의 picloram이 첨가된 N6-Y1 고체배지에 배양하였을 때, 배양 7일후에 자방이 비대(Figure2-A)해지는 것을 육안으로 관찰할 수 있었고, 배양

Table 3. Effect of explant on callus formation and plant regeneration in unpollinated ovary culture of rice.

Floral part cultured	No. of ovaries cultured	% of callus formation	No. of callus transferred	% of plant regeneration	
				green	albino
Ovary alone	60	0.0b ^a	0	0.0b	0.0
Ovary with partial cut glume	200	2.0b	20	35.0a	0.0
Ovary with partial cut glume, pedicel and secondary branch	380	9.4a	300	39.3a	4.7
Ovary with partial cut glume, stamen, pedicel and secondary branch	340	7.9a	140	33.5a	5.7

^a Means in each column followed by the same letter are not significantly different ($P \leq 5\%$) according to Duncan's multiple range tests.

30일 후에 형성된 캘러스(Figure 2-B)를 1 mg/L의 NAA와 5 mg/L의 kinetin이 첨가된 N6-Y1배지에 이식 후 20 일경부터 식물체(Figure 3-C)가 재분화되었다.

본 연구에서 벼의 미수분 자방을 배양하기전에 12°C에 10 일간 처리하였을 때 식물체 분화율이 무처리에 비해 크게 향상되었다(Table 1). 이러한 연구결과는 보리와 밀의 자방 배양에서 3°C에 5~10일동안 전처리 하였을 때 배양효율이 증가되었다고 한 연구결과(San and Gelebart, 1986)와 저온 처리 효과면에서 같은 양상을 나타내었으나, 벼의 자방배양에서 저온처리효과가 인정되지 않았다고 한 Yang과 Zhou (1982)의 연구결과와는 상이하였는데, 이는 배양에 이용된 모품종의 genotype간 차이로 추정되어지나 앞으로 여러 품종을 대상으로 이에 대한 보다 구체적인 연구가 있어야 될 것으로 사료된다. 벼의 미수분 자방을 1 mg/L의 picloram이 함유된 배지에 배양하였을 때 캘러스 형성률이 가장 높았고 이들 캘러스로부터 정상 녹색체의 분화율도 가장 높게 나타났다(Figure 1). 이러한 연구결과는 2 mg/L의 picloram이 효과적이라고한 Zhou와 Yang(1991)의 연구보고와는 picloram의 농도면에서 다소 다른데 이는 배양재료와 기본 배지 조성의 차이에서 비롯된 결과로 사료되어진다. Picloram의 농도가 2 mg/L 또는 그 이상으로 증가될 경우에는 오히려 백색체의 출현빈도가 높게 나타나는 것(Figure 1)으로 보아 벼의 자방배양에는 1 mg/L의 picloram이 효과적일 것이라고 생각된다.

Zhou와 Yang(1991)은 벼의 자방배양에서 자방만을 배양하였을 때는 캘러스가 형성되지 않았으나 소지경에 내외영과 수술이 포함된 자방에서 배양효율이 가장 높았다고 하였는데 본 연구에서도 자방만을 배양하였을 경우에는 전혀 캘러스가 형성되지 않았다(Table 3). 그리고 캘러스 형성과 식물체 재분화율면에서 내외영, 자방 및 소지경이 2차 지경(Figure 2-A)에 부착된 상태로 배양하였을 때 캘러스

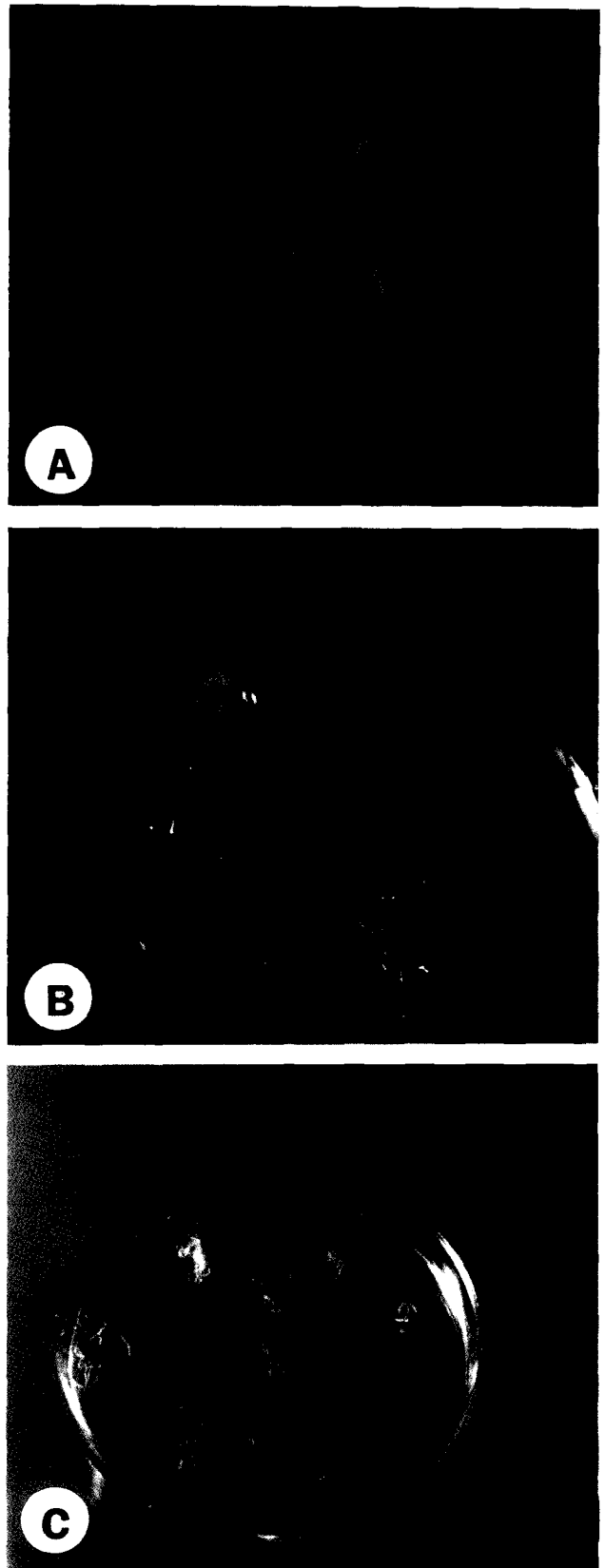


Figure 2. Plant regeneration from unpollinated ovary culture of rice. A: Enlarged ovaries at 7 days after culture. B: Gynogenic callus at 30 days after culture. C: Plant regeneration from gynogenic callus.

형성과 식물체 분화율이 높게 나타났는데 이러한 배양방법은 개개의 영화로부터 자방을 절취하여 배양하는 것에 비해 식물체 분화율도 높지만 배양에 소요되는 노동력과 시간도 크게 줄일 수 있어서 자방배양 효율 향상에 크게 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

벼의 미수분자방배양에서도 저온처리의 효과가 인정되어 12°C에 10일동안 전처리된 자방배양에서 캘러스형성률과 식물체 재분화율이 각각 10.7%와 38.7%로 가장 높게 나타났다. 액체배지에서 보다 6 g/L의 gelrite를 첨가한 고체배지에 자방을 배양하였을 때 식물체 재분화율이 높게 나타났다. 미수분 자방을 1 mg/L의 picloram이 첨가된 배지에 배양하였을 때 녹색체 분화율이 가장 높았고, picloram의 농도가 그 이상 증가함에 따라 백색체의 출현빈도가 높아지는 경향이였다. 저온처리된 이삭으로부터 자방만 분리하여 배양하였을 때는 캘러스가 형성되지 않았으나 내외영의 일부와 자방 및 소지경이 2차지경에 부착된 상태로 배양하였을 때 캘러스 형성률과 식물체 재분화율이 각각 9.4%와 39.3%로 가장 높게 나타났다.

인 용 문 헌

- Chu CC (1978) The N₆ medium and its applications to anther culture of cereal crops, Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture, Science Press, Pecking, pp 43-50
- Chung KS, Sohn JK (1986) Application of anther culture techniques to rice improvement, Research Report of Yeongnam Crop Experimental Station, Rural Development Administration, Milyang, Korea, pp 277-286
- Chung KS, Sohn JK (1995) Anther culture technology in rice, In *In Kannaiyan S, ed., Rice Management Biotechnology*, Associated Publishing Co., New Delhi, pp1-9.
- San LH, Gelebart P (1986) Production of gynogenetic haploids, In Vasil IK, ed, Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol 3. Academic Press, Orlando, Florida, pp305-322.
- Sathish P, Gamborg OL, Murray WN (1995) Rice anther culture : callus initiation and androclonal variation in progenies of regenerated plants, *Plant Cell Reports* 14: 432 - 436
- Yang HY, Zhou C (1982) In vitro induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules, *Theor Appl Genet* 63: 97-104
- YI GH, Sohn JK, Oh BG, Kim HY (1996) Plant regeneration from unpollinated ovary culture in rice. *Korean J Breed* 28: 190-193
- Zhou C, Yang HY (1980) In vitro induction of haploid plantlets from unpollinated young ovaries of *Oryza sativa* L. *Acta Genet Sin* 7: 287-288
- Zhou C, Yang HY (1991) In vitro production of haploids in rice through ovary culture, In Bajaj YPS, ed., *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 14. Springer-Verlag, Berlin, pp 180-192

(1997년 8월 7일 접수)