

배지응고제의 종류와 농도에 따른 벼 약배양 효율

양세준* · 오병근¹

작물시험장 수도육종과, ¹영남농업시험장 수도과

Effects of Gelling Agent Brands and Concentration on Rice Anther Culture

YANG, Sae Jun* · OH, Byeong Geun¹

National Crop Experiment Station, RDA, Suweon, 441-100, Korea :

¹Yeongnam Agricultural Experiment Station, RDA, Milyang, 627-130, Korea.*Corresponding author

To detect the effects of gelling agent brands and concentration on rice anther culture, anthers of rice (*O. sativa* L. japonica, cv, Nagdongbyeo) were inoculated on N6-Y1 basic media supplemented with 0.4~1.6% Bacto agar (Difco, 04140-01), Agarose (Sigma, Type 1) and 0.2~0.8% Gelrite (Kelco, 143364) as gelling agents. On 0.4% Bacto agar and Agarose media, the frequency of callus formation which was significantly decreased in proportion to gelling agent's concentration was 39% and 55%, respectively. On 0.6% Gelrite media, the frequency of callus formation which was not statistically significant among the 0.2~0.8% concentration was 44%. Calli derived from the higher concentration of gelling agents showed embryogenic with slow growth, small, whitish and hard shape compare to that of the lower concentration. The frequency of green plant regeneration was high not only in calli derived from the higher concentration but also in plant regeneration medium with the higher concentration after callus transfer. Calli derived from the higher concentration was effective to maintain the frequency of green plant regeneration up to 60 days after anther inoculation. Introduction of 0.6~0.8% Gelrite for callus formation, then transferred 1.6% Bacto agar and Agarose or 0.8% Gelrite for green plant regeneration was effective to increase anther culture efficiency.

Key word : Gelling agents, Anther culture, Rice

벼 약배양 기술이 최근에 크게 발전하면서 작물육종을 위한 새로운 수단으로 그 이용도가 품종 육성에까지 확대되고 있다. 반수체의 염색체 배가를 통한 육종년한단축, 선발 효율의 향상이라고 하는 반수체 육종의 장점을 극대화하기 위한 전제조건은 벼 약배양 효율 자체의 향상에 있다고 하겠다.

벼 약배양 효율은 품종의 유전자형, 기내 배양조건, 모식물의 생리적상태 등에 따라 좌우되는 것으로 알려져 있다. 그중에서 배지를 개량하여 효율증대를 꾀하려는 시도는 약배양 연구의 초기단계부터 꾸준히 계속되고 있는데 기본배지, 성장조정제, 탄소원 등에 관한 분야에서는 많은 진보가 있었으나 배지 응고제(gelling agent)에 관한 연구는 상대적으로 빈곤한 실정이었다 (Lee and Lee, 1995 : Moon et al., 1988).

몇가지 작물의 조직배양에서 캘러스생장 및 배발달에 배지응고제의 영향이 크다는 보고가 있고 (Zimmerman and Cobb, 1989 : Ziv, 1986), 배양체의 생리적 특성과 2차 대사물질의 집적에도 크게 작용한다고 하며 (Morimoto and Murai, 1989 : Suman et al., 1985), 또한 종류와 농도별로 처리하였을 때 식물체 재분화율의 차이가 컸다고 하였다 (Lai and Liu, 1987 : Lyne et al., 1986 : Van Ark et al., 1990).

새로 개발된 배지응고제의 일종으로 Gelrite는 일반적으로 사용되던 agar류에 비하여 캘러스생장 및 식물체 분화에 효과적이라는 연구결과가 있으나 (Morimoto and Murai, 1989, Van Ark et al., 1990), 벼 약배양에 있어서는 아직까지 자세히 검토된 바가 없다. 본 실험에서는 벼 약배양용 기본배지내에 몇가지 배지응고제를 농도별로 처리하고 캘러스형성 및 식물체 재분화에 미치는 영향을 조사하여 보고하는

바이다.

재료 및 방법

실험에 공시된 재료는 영남농업시험장 벼 육종포장에서 재배된 낙동벼(*O. sativa* L. japonica, CV, Nagdongbyeo)로서, 1핵성 소포자를 포함하고 있는 약을 외관으로 식별하여 대체로 약의 생장이 영화전장의 $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{4}$ 정도 되고 영의 색깔이 연녹색인 영화를 취하였다. 이 시기에 해당하는 이삭을 오전 10시경에 채취하여 비이커에 넣고 기부가 잠길 정도로 멸균수를 채운 뒤 재료가 건조하지 않도록 비닐주머니로 봉한 다음 12°C의 저온항온기에서 15일간 저온처리후 배지에 치상하였다. 배지는 N6-Y1 기본배지(Sohn et al., 1985)를 사용하였으며, 배지응고제를 제외한 기타 첨가물질로 캘러스형성 배지에는 2 mg/L NAA + 1 mg/L Kinetin + 2 mg/L ABA에 5% Sucrose를, 식물체분화에는 0.2 mg/L IAA + 2 mg/L Kinetin에 5% Sucrose를 첨가하였으며 pH 5.8로 조정하였다.

배지의 물리성이 약배양효율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Bacto agar (Difco, 04140-01), Agrose (Sigma Type 1)는 캘러스형성 배지에는 0.4, 0.8, 1.2, 1.6% 식물체분화 배지에는 0.8, 1.6% 첨가하였으며, Gelrite (Kelco, 14364)는 캘러스형성 배지에는 0.2, 0.4, 0.6, 0.8%, 식물체분화 배지에는 0.4, 0.8% 첨가하였다.

치상약수는 배양용기(Ø8.7x2cm petri dish)당 100약으로 조정하였고 치상방법은 70% ethanol로 이삭을 표면 소독한 뒤 영의 기부를 절개하여 약을 배지상에 털어 넣는 방법을 취하였다. 캘러스형성율은 치상된 약수에 대한 캘러스가 형성된 약수의 백분율(%)로, 식물체 재분화율은 이식된 캘러스수에 대한 분화된 녹색체의 백분율(%)로 구하였다.

캘러스 이식시기별 비교에서는 약을 치상한 날로부터 40일, 60일 후에 형성된 캘러스를 식물체 재분화 배지에 이식하여 식물체 재분화율을 조사하였고, 이때 이미 식물체 재분화가 시작된 캘러스는 제외시켰다. 배양온도는 25°C ± 1°C, 광조건은 캘러스형성에는 암상태, 식물체 재분화에는 1일 14시간씩 2000Lux 정도 조명 처리하였다.

결과 및 고찰

캘러스형성

배지응고제의 종류와 농도별 캘러스형성율은 Figure 1과 같다. Bacto agar와 Agarose에서는 0.4%의 저농도에서 캘러스형성율이 가장 높았으며, 0.8%에서 1.6%까지 농도가 증가할수록 캘러스형성율이 낮아지는 경향으로 유의성이 인정

되었다. Gelrite 배지에서는 0.2~0.8% 농도에서 처리간 차이가 유의성이 인정되지 않았으며 0.6% 농도에서 캘러스형성율이 44%로 가장 높게 나타났다.

형성된 캘러스의 생육양상을 보면 저농도 처리구에서 형성된 캘러스는 생장속도가 빠르고 조직이 유연하게 보이는데, 고농도 처리구에서는 생장속도가 늦고, 생육일수가 경과되어도 작고 단단한 모양으로 배발생 캘러스(embryogenic callus)에 가까운 형태를 보이고 있었다. 이러한 차이는 배지내의 수분 및 물질흡수와 관련있다고 생각되는데, Debergh(1983)는 배양용기내의 수분정도는 배지응고제인 agar의 종류와 농도가 크게 작용하며 마개와 밀봉재료도 영향을 미친다고 하였다. Lee와 Lee(1995)는 Gelrite 0.6% 첨가에서 캘러스형성율, 식물체 재분화율 및 기내 자연이배체 재분화율 등이 크게 향상되었다고 하였다.

식물체재분화

배지응고제의 종류와 농도를 달리한 배지에서 형성된 캘러스의 생육일수를 약치상일로부터 각각 40일, 60일로 구분하고 배지별로 두가지 농도 수준의 식물체분화배지에 이식하여 식물체재분화에 대한 배지응고제의 영향을 조사하였다.

Bacto agar가 배지응고제로 첨가된 배지에서 형성된 캘러스를 식물체분화배지에 이식하였을 경우 (Table 1), 분화배지의 배지응고제 농도가 Bacto agar 및 Agarose는 16 g/L, Gelrite는 8 g/L 첨가된 고농도 배지에서 식물체재분화율이 높았다. 캘러스 생육시기에 따라서는 식물체분화배지보다 캘러스 유기배지의 영향이 커서 40일후에 이식하였을 때는 4 g/L의 저농도보다는 8~16 g/L의 고농도에서 형성된 캘러스의 식물체분화능력이 우수하였고, 60일후에 이식하였을 경우는 분화배지의 종류에 관계없이 4~8 g/L에서는 전혀 식물체분화능력이 없었으며 12 g/L에서는 약간의 캘러스에서 반응을 보였고, 16 g/L의 고농도에서 형성된 캘러스는 40일의 경우와 비슷한 정도의 높은 식물체분화능력을 보유했다.

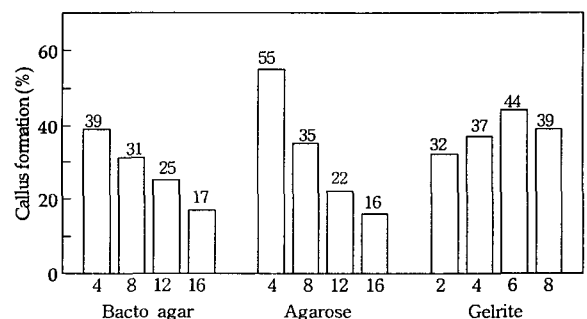


Figure 1. Effect of three kinds of gelling agents and its concentration(g/L) on callus formation in rice anther culture.

Table 1. Effect of Bacto agar concentration and callus age in callus formation medium on the frequency of green plant regeneration in the case of calli derived from Bacto agar used as gelling agent for callus formation

Gelling agents ^a		Frequency of green plant regeneration (%)							
Kind	Conc. (g/L)	40 DAAI ^b				60 DAAI			
		4 ^c	8	12	16	4	8	12	16
Bacto agar	8	12	24	34	32	0	0	1	34
	16	30	42	60	54	0	0	3	46
Agarose	8	10	22	32	35	0	0	4	33
	16	26	50	44	56	0	0	6	54
Gelrite	4	14	26	28	30	0	0	12	46
	8	32	40	64	62	0	0	6	58

^aKinds and concentration of gelling agents in plant regeneration medium^bCallus age : Days after anther inoculation (DAAI)^cConcentration of Bacto agar in callus formation medium**Table 2.** Effect of Agarose concentration and callus age in callus formation medium on the frequency of green plant regeneration in the case of calli derived from Agarose used as gelling agent for callus formation

Gelling agents ^a		Frequency of green plant regeneration (%)							
Kind	Conc. (g/L)	40 DAAI ^b				60 DAAI			
		4 ^c	8	12	16	4	8	12	16
Bacto agar	8	24	32	40	24	0	4	34	25
	16	32	30	75	48	0	1	66	63
Agarose	8	20	32	44	30	0	2	45	35
	16	32	64	68	46	0	2	47	57
Gelrite	4	24	34	50	32	0	4	47	32
	8	26	54	72	46	0	6	63	32

^aKinds and concentration of gelling agents in plant regeneration medium^bCallus age : Days after anther inoculation (DAAI)^cConcentration of Bacto agar in callus formation medium**Table 3.** Effect of Gelrite concentration and callus age in callus formation medium on the frequency of green plant regeneration in the case of calli derived from Gelrite used as gelling agent for callus formation

Gelling agents ^a		Frequency of green plant regeneration (%)							
Kind	Conc. (g/L)	40 DAAI ^b				60 DAAI			
		4 ^c	8	12	16	4	8	12	16
Bacto agar	8	24	32	36	46	0	1	22	44
	16	36	50	48	70	0	2	22	65
Agarose	8	24	30	46	54	0	2	34	60
	16	36	54	68	64	0	4	56	49
Gelrite	4	28	34	46	54	0	4	12	34
	8	30	50	70	73	0	2	35	56

^aKinds and concentration of gelling agents in plant regeneration medium^bCallus age : Days after anther inoculation (DAAI)^cConcentration of Bacto agar in callus formation medium

하였다.

Agarose가 배지응고제로 첨가된 배지에서 형성된 캘러스를 식물체분화배지에 이식하였을 경우 (Table 2), Bacto agar에서의 경우와 마찬가지로 분화배지의 응고제 농도가 고농도(16 g/L)에서 식물체재분화율이 높았으며 캘러스 형성배지의 영향도 비슷한 경향이었으나 약치상 60일 후에 이식하였을 경우에는 8 g/L 첨가부터 식물체재분화 능력을

보유하였으며 12~16 g/L에서는 40일 이식과 비슷한 양상을 나타냈고 전반적인 식물체분화율은 Bacto agar보다 다소 높은 편이었다.

Gelrite가 배지응고제로 첨가된 배지에서 형성된 캘러스를 식물체분화 배지에 이식하였을 경우 (Table 3), 배지응고제의 농도 변화에 따른 식물체재분화 정도는 함량을 절반으로 감량한 상태에서 앞의 두가지 응고제 종류와 비슷한 경

향을 보여 배지응고력이 가장 강력한 것으로 드러났다

벼 약배양에서 캘러스형성과 식물체재분화에 관여하는 배지응고제의 효과는 종류에 따라 다소 차이는 있었지만 배지에 첨가된 농도에 의해 현저한 차이가 인정되었다. 즉, 캘러스형성은 저농도에서 유리하였으나 식물체재분화는 고농도에서 용이하였으며 특히 저농도에서 형성된 캘러스는 이식시기가 지연되면 식물체재분화율이 급격히 떨어짐을 알 수 있었다.

위 결과는 식물체분화배지의 agar 농도를 1.6%로 높였을 때 식물체재분화율이 현저히 증가되었다고 한 Moon 등(1988)의 결과와 일치하였으며, Lyne 등(1986)은 보리 약배양에서 분화배지에 첨가된 배지응고제의 종류에 따라 식물체재분화율에 차이가 나고, 배지응고제가 배발달의 초기단계에는 영향을 미치지 않으나 식물체분화에 크게 작용한다고 하였다. Sohn 등(1985)은 벼 약배양에서 식물체재분화에 대한 캘러스형성배지의 영향을 크게 강조하였다.

또한 Lai와 Lin(1987)는 벼의 미숙배로부터 형성된 캘러스를 재료로 하여 2년동안 계대배양한 세포를 재분화시킬 때 0.8% agar 농도에서는 식물체를 얻지 못하였으나, 1.6% agar 배지에서는 40%의 분화율을 보고하여 배지응고제의 농도가 식물체 재분화에 크게 영향한다는 본 실험의 결과와 일치하였다.

식물조직배양에 사용되는 배지응고제는 재료와 제조회사에 따라 여러 가지가 있으며 종류별로 응고정도가 다르고 순도 차이도 있어 불순물로 인하여 배양세포에 해를 주는 경우도 있다. 일반적으로 사용되는 agar류에는 소포자로부터의 배발생에 유해한 물질을 포함하고 있다고 보고되었으며 (Kohlenbach and Wemicke, 1978), 따라서 가격이 비싼데도 불구하고 특수한 배양에 있어서는 보다 정제된 Agarose 등을 사용하거나 (Lorz et al., 1983) 또는 활성탄소(activated charcol)를 첨가하여 독성물질을 제거하거나 액체배양을 해야 하는 경우도 있다. Gelrite는 Pseudomonas 다당체로부터 정제된 물질로 응고화 능력이 다른 agar류에 비해 강하고, 십자화과 식물의 조직배양에 사용하였을 때 유리화현상(vitrification)을 억제시키는 효과가 있다고 보고되고 있으며 (Morimoto and Murai, 1989; Zimmerman and Cobb, 1989), agar류에 비해 2배정도의 분화율을 나타내었다고 보고되었다 (Van Ark et al., 1990).

또한 고농도 배지에서 형성된 캘러스는 이식시기가 다소 지연되더라도 식물체재분화율이 오래 유지되고 특히 Gelrite는 0.6~0.8%의 고농도에서도 캘러스 형성율이 높게 나타나 치상된 약수에 대한 최종 식물체 획득이 유리한 점으로 미루어볼 때 많은 양의 약을 취급해야 하는 반수체 육종의 효율향상에 크게 기여할 수 있는 배지응고제라고 생각된다.

적 요

벼 약배양 배지에 첨가되는 배지응고제의 종류와 농도가 캘러스형성 및 식물체재분화에 미치는 영향을 구명하기 위하여 실험한 결과는 다음과 같다.

배지응고제인 Bacto agar(Difco, 04140-01), Agrose(Sigma, Type 1) 0.4% 처리에서 각각 39%, 55%의 캘러스형성율을 보였으나 농도가 높아질수록 캘러스 형성율이 현저하게 감소하였다. Gelrite(Kelco, 143364)의 0.2~0.8%처리에서는 농도에 따른 차이가 인정되지 않았으며 0.6% 처리에서 44%의 캘러스 형성율을 보였다.

고농도 배지응고제 처리에서 형성된 캘러스는 생장이 늦은 반면 작고 단단하며 백색에 가까운 배발생적인 특성을 보였다.

식물체재분화율은 고농도 배지응고제 처리에서 형성된 캘러스에서 양호하였으며, 또한 고농도 배지응고제가 첨가된 식물체분화배지에서 높았다. 저농도 배지응고제 처리에서 형성된 약치상후 60일된 캘러스는 식물체 재분화율이 급격히 감소하였다.

치상된 약에 대한 최종적인 식물체분화 효율을 향상시키기 위해서는 0.6~0.8% Gelrite 첨가배지에서 형성된 캘러스를 1.6% Bacto agar 및 Agarose 또는 0.8% Gelrite 식물체분화배지에 이식할 것을 추천한다.

인 용 문 헌

- Debergh PC (1983) Effects of agar brands and concentration on the tissue culture medium. *Physiologia Pl* 59: 270-276
- Kohlenbach HW, Wemicke W (1978) Investigations on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture. *Z Pflanzenphysiol* 86: 463-472
- Lai KL, Liu LF (1987) High frequency plant regeneration in water and salt stressed rice cell and polypeptide changes during plant regeneration. *Korea-China Plant Tissue Culture Symposium* p 19-34
- Lee JH, Lee SY (1995) Effects of gelling agents and growth regulators on rice anther culture. *Korean J Plant Tissue Culture* 22: 35-39
- Lyne RL, Bennet RI, Hunter CP (1986) Embryoid and plant production from cultured barley anthers. *Plant tissue culture and its agricultural applications*. Ed. Lyndsey A. Withers and Alderson, PG p 405-411
- Lorz H, Larkin PJ, Thomson J, Scowcroft WR (1983) Improved proplast culture and agarose media. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 2: 217-226
- Moon HP, Choi SH, Cho SY, Son YH (1988) Effect of high agar medium on plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.) anther culture. *Korean J*

- Breed 20 : 335-340
- Morimoto H, Murai F** (1989) The effects of gelling agents on platanol accumulation in callus cultures of *Croton sublyatus* Kurz. Plant Cell Reports (1989) 8 : 210-213
- Suman S, Townsend EC, Oberly GH** (1985) Mineral nutrient status of crobapple and pear shoots culture *in vitro* on varying concentrations of three commercial agars. Journal of American Society for Hort Sci 110 : 407-411
- Sohn JK, Oh BG, Lee SK** (1985) Effects of media and its components on callus induction and plant differentiation in rice anther culture. Korean Journal of Crop Science 30 : 271-276
- Van Ark HF, Van der Valk P, Zaal MACM, Molenaar JC** (1990) The effect of gelling agent and abscisic acid on regeneration and formation of somatic embryos on seed-derived callus cultures of *Poa pratensis* L. Abstracts Vllth international congress on plant tissue and cell culture P 6
- Zimmerman TW, Cobb BG** (1989) Vitrification and soluble carbohydrate levels in petunia leaved as influenced by media Gelrite and sucrose concentrations. Plant Cell Rept 8 : 358-360
- Ziv M** (1986) *In vitro* hardening and acclimatization of tissue culture plants. Plant tissue culture and its agricultural applications. Ed. Lyndsey, A. Withers, and Alderson, PG p 190

(1997년 4월 17일 접수)