

벼 약배양에서 콜히친이 식물체 배수성에 미치는 영향

권용삼* · 이형규 · 박규환¹ · 손재근
경북대학교 농학과, ¹상주대학교 식물자원학과

High Frequency Production of Doubled-haploid Plants by Colchicine Application in Anther Cultures of Rice

KWON, Yong Sham* · LEE, Hyung Gyu · PARK, Gyu Hwan¹ · SOHN, Jae Keun

Department of Agronomy, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea

¹Department of Plant Resources, Sangju National University, Sangju, 742-711, Korea

ABSTRACT To optimize the *in vitro* chromosome doubling procedure in anther cultures of rice, anthers were cultured on callus induction medium with 0.001 to 0.1 mg/L colchicine for 30 days. The addition of colchicine slightly reduced callus formation and plant regeneration in comparison to the colchicine-free medium (control medium). This reduction was greater with higher concentration colchicine. Microspore-derived rice plants in control medium were found to be mainly haploid (50 to 58.8%) and doubled-haploid (31 to 40%) in anther culture of 3 *Japonica* and 1 *Tongil* type cultivars. The application of 0.001 mg/L colchicine was increased to 54.3~60.0% in the frequency of fertile doubled-haploid plants. These results indicate that the addition of colchicine to the callus induction medium is an efficient means to obtain doubled-haploid plants in anther cultures of rice.

Key words: Anther culture, colchicine, doubled-haploid, rice

서 론

벼 약배양 기법은 품종의 육성연한 단축, 유용 열성형질의 조기 선발 등의 장점으로 인하여 하나의 육종방법으로 자리 잡고 있다. 그러나 약배양 기법이 하나의 육종방법으로 자리 잡기 위해서는 높은 빈도의 백색체 출현, 변이체의 발생, 배양 효율의 genotype 간 차이뿐만 아니라 약으로 재분화되는 식물체의 배수성이 불안정하다는 점은 앞으로 깊이 있는 연구가 되어져야 할 분야이다 (Gosal et al. 1997). 벼의 약배양에서 재분화되는 식물체의 대부분은 반수체와 이배체이지만 경우에 따라서는 다배체와 이배체가 출현하는 것으로 알려져 있다 (Chung and Sohn 1995; Gosal et al. 1997). 벼의 반수체는 이배체에 비해 잎, 줄기, 화기, 엽이, 뿌리 등과 같은 모든 기관들이 작을 뿐만 아니라 불임이기 때문에 염색체 배가에 의한 동형 접합성의 이배체로 육성되어져야만 육종재료로

이용할 수 있는데 그 대표적인 염색체 배가법이 콜히친 처리법이다. 그러나 콜히친 처리법은 처리 방법과 과정이 복잡하며 반수체의 염색체 배가율도 아주 낮기 때문에 약배양 효율을 감소시키는 한 요인으로 지적되고 있다 (Chung and Sohn 1995).

최근에 배지 내에 콜히친을 직접 첨가하여 이배체의 획득 빈도를 높일 수 있다는 연구가 밀 (Redha et al. 1998; Zamani et al. 2000), 옥수수 (Barbabas et al. 1999), 유채 (Martin and Widholm 1996) 등의 작물에서 보고되고 있는데 벼 약배양에서 이러한 방법이 효과적으로 적용된다면 반수체 육종효율을 크게 향상시킬 수 있을 것이라고 생각된다.

따라서 본 연구에서는 벼 약배양에서 안정적인 이배체 생산방법에 대한 기초자료를 얻고자, 배지 내에 첨가되는 콜히친의 적정 농도 및 콜히친 처리에 따른 배수성의 품종간 차이 등에 대한 실험을 수행하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

*Corresponding author. Tel 053-950-5711 Fax 053-958-6880
E-mail ys4654@naver.com

재료 및 방법

식물재료

본 실험에는 경북대학교 농과대학 농학과 실습포장에서 표준재배법으로 재배된 '동진벼', '영남벼', '일미벼', '청청벼'를 공시품종으로 이용하였다. 공시 품종의 1핵성 소포자기의 이삭을 채취하여 12°C에서 10일간 저온처리된 약을 1 mg/L NAA, 2 mg/L kinetin, 30 g/L sucrose, 5 g/L gelrite가 첨가된 N₆-Y₁ 배지 (Chung and Sohn 1986)에 배양한 다음, 26 ± 1°C에 암상태로 30일간 캘러스를 유도시켰다. 식물체 재분화는 캘러스 이식과정 없이 1일 16시간 명상태 (2,600 Lux)에서 식물체를 재분화시키는 1단계 배양방법을 이용하였으며, 재분화된 식물체의 배수성은 육안에 의해 조사하였다.

약배양 및 콜히친 처리

벼의 약배양에서 배지 내에 첨가되는 콜히친의 적정 농도를 구명하기 위하여, '일미벼'의 약을 0, 0.001, 0.01, 0.05, 0.1 mg/L의 콜히친이 첨가된 배지에 배양하여 캘러스 형성과 재분화된 식물체의 배수성 정도를 조사하였다. 또한 콜히친이 첨가되지 않은 배지와 0.001 mg/L의 콜히친이 첨가된 배지에서 배양된 약으로부터 캘러스 형성과 식물체 분화 양상을 조사하고자, '일미벼'를 약배양하여 배양 10일 후부터 50일까지 캘러스 형성 정도를 5일 간격으로 조사하였으며, 식물체 분화는 약으로부터 형성된 캘러스를 명조건에서 배양하고 5일 간격으로 45일간 조사하였다. 콜히친 처리에 따른 배수성 정도의 품종간 차이를 조사하기 위하여, 공시품종의 약을 0.001 mg/L의 콜히친이 첨가된 배지에 배양하여 콜히친 첨가에 따른 캘러스 형성 및 재분화된 식물체의 배수성을 품종별로 각각 비교하였다.

결과 및 고찰

'일미벼'의 약배양에서 배지 내에 첨가되는 콜히친의 농도가 캘러스 형성과 식물체 분화에 미치는 영향을 조사한 결과 (Figure 1), 콜히친이 첨가되지 않은 경우 캘러스 형성과 식물체 분화율은 각각 35.5%와 20.3%를 나타내었으나, 콜히친의 농도가 증가할수록 캘러스 형성과 식물체 분화율은 점점 감소하였다. 0.1 mg/L의 콜히친이 약배양 배지에 첨가될 경우 약으로부터 캘러스나 식물체가 전혀 형성되지 않았으나 0.001 mg/L의 콜히친이 첨가될 경우 무처리구에 비해 캘러스 형성률은 다소간의 차이를 보였으나 식물체 분화율은 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

벼 약배양에서 배지 내에 첨가되는 콜히친 농도에 따른 재

분화된 식물체의 배수성을 조사한 결과 (Table 1), 콜히친이 첨가되지 않은 경우 반수체가 이배체보다 20% 이상 높게 출현하는 것으로 나타났다. 0.001 mg/L의 콜히친이 첨가되면 무처리구에 비해 반수체의 출현빈도가 상대적으로 낮아지면서 이배체의 발생빈도가 50%이상 높게 나타났다. 그러나 0.01 mg/L와 0.05 mg/L의 콜히친이 첨가되면 반수체의 발생 정도는 감소하나 이배체와 다배체의 출현빈도가 높은 경향을 나타내었다. 따라서 0.001 mg/L의 콜히친이 배지 내에 첨가되면 식물체 재분화에 큰 영향을 주지 않으면서 이배체의 획득 빈도를 향상시킬 수 있는 것으로 나타났다.

약배양 배지 내에 콜히친의 첨가 유무에 따른 캘러스 형성과 식물체 분화 양상을 배양 10일 후부터 5일 간격으로 조사한 결과 (Figure 2), 콜히친이 첨가되지 않은 배지의 경우 배양 25일 후에 34.8%의 가장 왕성한 캘러스 형성을 보였으나, 0.001 mg/L의 콜히친이 첨가되었을 경우 배양 30일 후에 가장 높은 캘러스 형성 (27.8%)을 나타내었다. 그러나 캘러스로부터 재분화되는 식물체는 콜히친 처리에 관계없이 명조건에서 20일간 배양 후에 가장 높은 경향을 나타내었으며 그 이후는 급격히 감소하였다. 그러나 배양 30일과 40일 후에 재분화율이 다소 증가하는 양상을 보였다. 이는 배양되는 약내

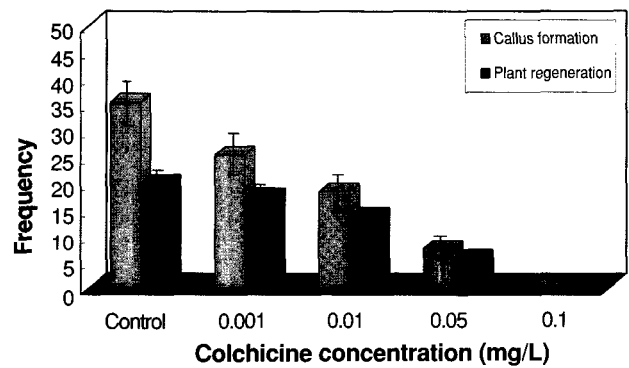


Figure 1. Frequency of the callus formation and plant regeneration to colchicine concentration in anther cultures of rice (*Oryza sativa* L. cv. Ilmibyeo). Error bars indicate SD of five replicates.

Table 1. Effect of colchicine concentration on the ploidy level of microspore-regenerated plants in anther culture of rice (*Oryza sativa* L. cv. Ilmibyeo).

Colchicine (mg/L)	No. of plants observed	Ploidy level of regenerated plants (%)		
		haploid	doubled-haploid	polyploid
Control	60	34 (56.7) ^{a1}	20 (33.3) ^b	6 (10.0) ^{bc}
0.001	52	15 (28.9) ^b	28 (53.9) ^a	9 (17.3) ^b
0.01	30	8 (26.7) ^b	17 (56.7) ^a	5 (16.7) ^b
0.05	20	2 (10.0) ^{bc}	10 (50.0) ^a	8 (40.0) ^a
0.1	-	-	-	-

¹Mean separation within columns by Duncans's Multiple Test at 5% level.

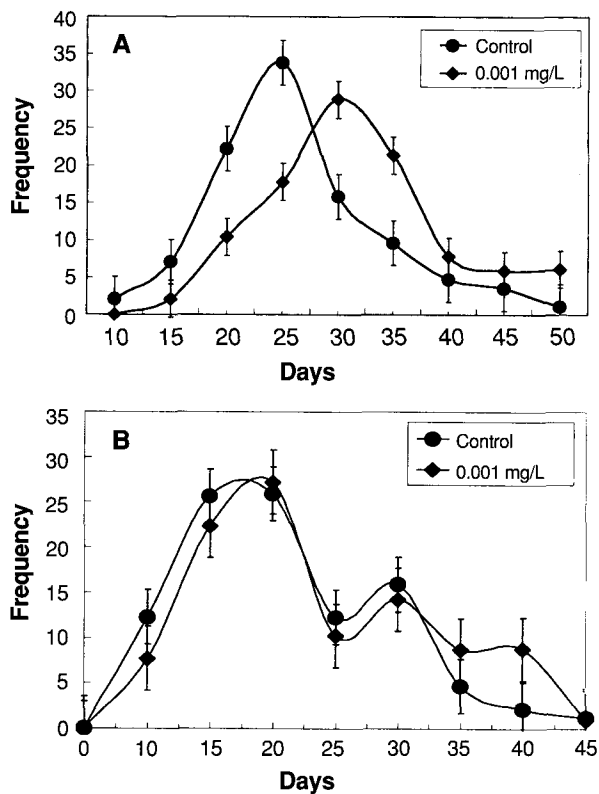


Figure 2. Comparison of callus formation (A) and plant regeneration (B) from anther cultures of rice (*Oryza sativa* L. cv. Ilmiby eo) in colchicine-treated and non-treated medium. Error bars indicate SD of five replicates.

의 소포자 발육 단계의 차이 때문이라고 생각되는데, 이의 구체적인 원인에 대해서는 세포학적 측면에서 세밀한 연구가 있어야 될 것이다.

약배양 배지 내에 0.001 mg/L의 콜히친을 첨가할 경우 식물체 분화율은 억제작용을 받지 않으면서 무처리구에 비해 이배체의 획득빈도가 높은 것으로 나타났다. 따라서 0.001 mg/L의 콜히친을 약배양 배지 내에 첨가하여 배수성의 genotype 간 차이를 조사한 결과 (Table 2), 식물체 분화율은

genotype에 따라 다소간의 차이를 나타내었으나, '일미벼'와 '동진벼'는 콜히친이 첨가되어도 무처리에 비해 식물체 분화율이 큰 차이가 없는 경향을 보였다. 품종별 배수성은 콜히친이 첨가되지 않은 배지보다 첨가된 배지에서 이배체의 획득빈도를 20% 이상 높일 수 있는 것으로 나타났다.

최근에 주요 농작물의 약배양에서 배지 내에 콜히친을 첨가하여 이배체의 획득빈도를 높일 수 있다는 것이 여러 연구자에 의해 지적되고 있는데, 콜히친의 농도나 처리기간 및 방법은 작물의 genotype 뿐만 아니라 동일 작물 내에서도 연구자간에 상이하게 보고되고 있다 (Barbabás et al. 1999; Martin and Widholm 1996; Redha 1998; Zamani et al. 2000). 밀의 약배양에서 Redha (1998) 등은 100 mg/L의 콜히친 농도에서 약을 1~3일간 처리하는 것이 이배체의 획득빈도를 높일 수 있다고 하였으며, Zamani (2000) 등은 약에서부터 형성된 배에 0.03%의 콜히친을 3일간 처리하면 식물체 분화율은 낮아지나 백색체의 출현빈도를 감소시킬 수 있다고 하였다. 옥수수의 경우 0.02%와 0.03%의 농도의 콜히친이 함유된 배지에 약을 2~3일간 전배양한 후, 콜히친이 첨가되지 않은 배지에 계대배양하면 이배체의 획득빈도를 높일 수 있는 것으로 보고하였다 (Barbabás et al. 1999). 그러나 고농도의 콜히친이 첨가된 배지에 약을 장기간 배양하면 콜히친의 억제작용 때문에 배양 효율이 아주 낮아진다는 것은 연구자간의 일반적인 견해다 (Alemanno and Guiderdoni 1994; Barbabás et al. 1999; Zamani et al. 2000).

본 연구에서도 콜히친의 농도가 점차 높아짐에 따라 벼 으로부터 형성되는 캘러스나 식물체 획득 빈도가 급격히 감소함을 확인할 수 있었다 (Figure 1). 그러나 배지 내에 첨가되는 콜히친의 적정 농도는 본 연구와 다르게 나타났는데, 대부분의 연구자는 고농도의 콜히친이 첨가된 배지에서 약을 단기간 전배양한 다음 콜히친이 첨가되지 않은 배지로 이식하는 복잡한 과정을 거치는데 비해 본 연구에서는 저농도 (0.001 mg/L)의 콜히친이 첨가된 배지에 약을 장기간 배양하였기 때문이라고 생각된다. 그리고 약배양 배지에 0.001

Table 2. Influence of colchicine treatment on the ability of plant regeneration of genotypes in anther cultures of rice.

Cultivars	Colchicine treatment (mg/L)	No. of anthers inoculated	No. of anthers forming callus (%)	No. of calli forming plants (%)	Ploidy level of regenerated plants (%)			
					total	haploid	doubled-haploid	polyploid
Dongjinbyeo	Control	400	78 (19.5)	62 (15.5)	50	29 (58.0)	16 (32.0)	5 (10.0)
	0.001	526	91 (17.3) ^{ns}	77 (14.6) ^{ns}	70	15 (21.4) [*]	38 (54.3) [*]	17 (24.2) [*]
Yeongnambyeo	Control	400	104 (26.0)	87 (21.8)	70	38 (54.3)	22 (31.0)	10 (14.2)
	0.001	800	120 (15.0) [*]	97 (12.1) [*]	70	20 (28.6) [*]	40 (57.1) ^{**}	10 (14.2) ^{ns}
Ilmiby eo	Control	400	128 (32.0)	92 (23.0)	80	47 (58.8)	31 (38.8)	2 (2.5)
	0.001	700	191 (27.3) ^{ns}	153 (21.8) ^{ns}	120	27 (22.5) [*]	72 (60.0) ^{**}	21 (17.5) ^{**}
Cheongcheongbyeo	Control	400	42 (10.5)	20 (5.0)	10	5 (50.0)	4 (40.0)	1 (10.0)
	0.001	626	30 (4.8) [*]	27 (4.3) ^{ns}	10	2 (20.0) ^{**}	6 (60.0) [*]	2 (20.0) [*]

*. ** Significantly different from the control at P=0.05 and P=0.01, respectively.

mg/L의 콜히친이 첨가되면 식물체 재분화에 큰 영향을 주지 않으면서 이배체의 획득 빈도를 향상시킬 수 있는 것으로 조사되었는데 앞으로 이보다 낮은 농도에서 재분화된 식물체의 배수성에 대한 세밀한 연구가 있어야 될 것으로 사료된다. 본 연구에서 콜히친이 첨가된 배지에서 캘러스의 발생은 무처리구보다 낮은 경향이었으나 식물체 발생빈도는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다 (Figure 2). 이는 콜히친이 약배양 초기에 소포자 분열을 억제시키나, 일정한 기간이 경과하면 억제 효과는 감소하는 것으로 추정되나, 이의 원인에 대해서는 생리·생화학적인 측면에서 좀 더 깊이 있는 연구가 있어야 될 것으로 생각된다.

배지 내에 콜히친의 첨가에 따른 배수성의 genotype간 차이는 배양되는 소포자의 분열 단계가 다르기 때문이며, 콜히친 처리 그 자체에는 없는 것으로 알려져 있는데 (Zamani et al. 2000), 본 연구에서도 공시된 4품종의 이배체 발생률이 54.3~60.0% 범위로 나타나 (Table 2), 콜히친 처리에 따른 배수성의 품종간 차이는 인정되지 않은 것으로 나타났다. 앞으로 콜히친이 첨가된 배지에 약을 배양하고 소포자의 분열 과정을 세포화학적 측면에서 구체적인 연구가 수행된다면 약으로부터 발생하는 이배체 발생률을 한층 더 높일 수 있을 뿐만 아니라 반수체 육종 효율 또한 증가시킬 수 있을 것이다.

적 요

벼의 약배양 배지 내에 콜히친 첨가에 의한 염색체 배가 방법을 확립하기 위하여, 콜히친의 농도를 0.001~0.1 mg/L까지 조절하여 약배양하였을 때 콜히친의 농도가 증가할수록 캘러스 형성률과 식물체 분화율은 점점 감소하였으며, 그 감소폭은 농도가 증가됨에 따라 점점 커지는 경향이였다. 자포니카 3품종과 통일형 1품종을 콜히친이 첨가되지 않은 배지에 약배양하였을 때 반수체의 출현빈도가 50%이상 높게 나타난 반면, 이배체는 40% 이하의 낮은 발생빈도를 나타내었다. 그러나 0.001 mg/L의 콜히친이 약배양 배지에 첨가될 경

우 품종에 따라 다소간의 차이는 있으나, 반수체의 출현빈도는 상대적으로 감소되고 이배체의 발생 비율이 54.3~60%로 증가하였다.

인용문헌

- Alemanno L, Guiderdoni E (1994) Increased doubled haploid plant regeneration from (*Oryza sativa* L.) anthers cultured on colchicine-supplemented media. *Plant Cell Rep* 13:432-436
- Barbabás B, Obert B, Kovács G (1999) Colchicine, an efficient genome-doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured in anthero. *Plant Cell Rep* 18:858-862
- Chung GS, Sohn JK (1986) Application of anther culture techniques to rice improvement. Research Report of Yeongnam Crop Experimental Station, Rural Development Administration, Korea, Milyang, pp 277-286
- Chung GS, Sohn JK (1995) Anther culture technology in rice. In: Kannaiyan S (ed), *Rice Management Biotechnology*, Associated Publishing Co. New Delhi, pp 1-9
- Gosal SS, Sindhu AS, Sandhu JS, Sandhu-gill R, Singh B, Khehra GS, Dhaliwal HS (1997) Haploidy in rice. In: Jain JM, Sopory SK, Veilleux RE (eds), *In vitro* haploid production in higher plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 1-36
- Martin B, Widholm JM (1996) Ploidy of small individual embryo-like structures from maize anther cultures treated with chromosome doubling agents and calli derived from them. *Plant Cell Rep* 15:781-785
- Redha A, Attia T, Büter B, Saisintong S, Stamp P, Schmid JE (1998) Improved production of doubled haploids by colchicine application to wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Plant Cell Rep* 17:974-979
- Zamani I, Kovács G, Gouli-Vavdinou E, Roupakasi DG, Barbabás B (2000) Regeneration of fertile doubled-haploid plants from colchicine-supplemented media in wheat anther culture. *Plant Breeding* 119:461-465

(접수일자 2001년 1월 17일)