

## 벼 약배양에 효과적인 배지조성 및 저온처리 방법

이기환, 원용재, 고종민, 박향미, 조준현, 오병근, 양세준, 김순철, 남민희\*  
영남농업시험장, 경남 밀양시 내이동 1085번지, 627-803

### Effects of Cold Shock Pretreatment and Carbohydrate Sources on Anther Culture of Rice

Gihwan Yi, Yongjae Won, Jongmin Ko, Hyangmi Park, Junhyeon Cho, Byeonggeun Oh, Saejun Yang,  
Soon-Chul Kim, and Min-Hee Nam\*

National Yeongnam Agricultural Experiment Station, RDA, Milyang-gun, Gyeongnam-gun, Gyeongnam 627-803, Korea

**ABSTRACT** In spite of potential benefits of anther culture, low productivity of plant regeneration in some genotypes; e.g. tongil and indica rice, is one of the major obstacles for practical use of anther culture. This study was conducted to improve cold shock method and carbohydrate source for increasing the efficiency of anther culture in rice. The most common carbon source, sucrose was replaced to maltose, which has two molecules of glucose. Maltose increased callus induction 1.4- to 1.8-fold higher in japonica rice, 3.2- to 11.6-fold in tongil types and 2.7-fold in indica rice IR50. Callus induction was increased from 0.2% to 12.5% in maltose medium compared to the medium supplemented with sucrose plus glucose in indica rice "Tetep". A simple procedure of vacuum packaging of panicles during cold shock treatment prolonged not only anther viability more than 15 days but also increased callus induction more than 2-fold compared to open-air storage (conventional method). Combining of above two methods, callus induction was increased 28 to 56% in japonica, 13 to 33% in tongil type and 12 to 31% in indica rice. Plant regeneration was increased 14 to 35% in japonica, 10 to 20% in tongil and 4 to 15% in indica rice, respectively.

**Key words:** Rice, anther culture, carbohydrate source, maltose, cold pretreatment

#### 서 론

반수체 육종법 중 하나인 약배양법은 응성생식기관인 약을 기내에 배양하여 화분소포자 유래의 반수체를 생산하는 방법이다. 약배양법은 반수성 식물체의 염색체를 배가함으로써 동형접합성 개체를 단시간에 얻을 수 있기 때문에 품종의 육성 연한을 단축시킬 수 있을 뿐만 아니라 열성형질의 선발효율이 높다는 등의 장점으로 인하여 국내에서도 벼를 포함하여 여러 작물에서 널리 실용화되고 있다 (Chung and Sohn 1986). 그러나 약배양 기법을 실제 포장육종에 이용하기 위해서는  $F_1$

이나  $F_2$  개체로부터 충분한 수의 재분화 개체를 획득하는 것이 무엇보다 중요하다. 벼 약배양에서 식물체의 재분화 효율은 모품종의 genotype, 화분소포자의 발육단계, 저온전처리의 조건, 배지의 조성 등에 따라 상이한 것으로 보고되고 있다 (Guha-Mukherjee 1973; Niizeki 1983). 배양에 적합한 화분소포자의 발육단계는 1핵기 초기~중기의 화분소포자기이며, 채취한 이삭의 치상전 저온처리는 8~12°C에서 8~16일이 캘러스 유도율이나 녹색체 재분화에 효과적이다 (Chung 1985). 벼 약배양에 적합한 배지는  $N_6$ -Y<sub>1</sub>배지 (Chung 1985)로서  $N_6$ 배지 (Chu et al. 1975)에 질소원인 ammonium sulphate의 양을 1/2로 줄이고 L-glutamine을 보강하였다. 일반적으로 약배양에서 식물체재분화는 인디카형이 자포니카형에 비하여 낮은 것으로 알려져 있는데 (Moon et al. 1996) 이러한 유전자형간의 식물체

\*Corresponding author Tel 055-350-1181 Fax 055-352-3059  
E-mail nammhee@rda.go.kr

재분화력의 차이는 인디카나 통일형 품종을 이용한 약배양 육종에는 큰 걸림돌이 되고 있는 실정이다. 또한 배양의 효율이 낮은 유전자원으로부터 유용형질을 약배양을 통하여 도입하고자 할 경우 배지내의 선발효과로 인하여 형질의 도입이 어렵게 되는 단점도 있다. 이와 같은 문제를 해결하기 위하여 약배양의 효율이 핵내의 유전자에 의하여 지배된다는 것이 알려지면서 DNA 수준에서의 조직배양 분화효율 증진 연구도 이루어지고 있다 (Henry et al. 1994; Tachuchi-Shiobara et al. 1997a). 식물체재분화 능력과 관계된 양적 형질 유전자좌 (Quantitative traits loci, QTL)는 현미배양에서 1번, 2번 및 4번 염색체에 5개가 존재함이 보고되었고 (Tachuchi-Shiobara et al. 1997b), 약배양의 경우 캘러스 형성은 3번과 11번 염색체에 녹색체재분화는 3번과 10번 염색체에 존재하는 것이 보고되었다 (Kwon et al. 2000). 그러나 식물체 재분화 능력과 관계된 유전자의 탐색에 대한 연구도 중요하지만 배양방법이나 배지 조건 개선에 의한 식물체의 분화능력 향상 또한 더욱 깊이 있게 연구되어야 할 분야라고 생각된다. 본 실험에서는 벼 약배양에서 캘러스 유도율과 식물체 재분화능력을 높이기 위하여 일반형 벼뿐만 아니라 인디카나 통일형 벼에서도 재분화력이 높은 배지조건 및 저온처리 방법 개발을 목적으로 하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

본 실험에 사용한 벼는 총 11품종으로 영남농업시험장 벼 (*Oryza sativa* L.) 육종포장에서 표준재배법으로 재배된 교배친포장의 벼를 이용하였다. 인디카형으로는 Tetep, IR36, IR50을 통일형으로는 밀양 23호, 가야, 삼강을 사용하였다. 분화효율이 낮은 것으로 알려진 일반형 벼로는 고시히카리, 히토메보레를, 분화효율이 높은 품종으로는 화영, 동진을, 그리고 tropical japonica 품종으로 Bulu를 사용하였다.

### 약배양 및 저온처리

약배양은 수잉기에 1핵성 소포자의 화분을 갖는 이삭을 채취하여 12°C에서 15일간 암상태에서 저온처리 후 사용하였으며 화분소포자의 발육단계는 엽이간장 (2~5 cm)과 영내의 약의 선단위치( $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{3}$ )를 측정하여 판단하였다. 저온처리는 채취한 이삭을 광구배양병에 넣어 검은색 비닐로 감싼 다음 수분을 공급하면서 12°C 저온챔버 (Conviron Co)에서 15일간 처리하였다. 진공포장 후 저온처리는 PE 필름을 이용하여 가정용 간이진공포장기 (한국에이전트, ABM8080)로 하였으며 기타 처리방법은 광구배양병을 이용한 것과 동일하게 하였다.

### 캘러스 유도 및 식물체 재분화

약의 치상은 먼저 저온처리된 이삭을 70% 에탄올로 표면소독한 다음 약의 화사부분을 가위로 절단한 후 배지에 치상하였다. 캘러스 유도는 2 mg/L의 NAA, 0.5 mg/L의 Kinetin (KI), 5%의 gelrite (Phytigel, Sigma P8169) 등이 첨가된  $N_6$ - $Y_1$  배지 (pH 5.6)를 이용하였으며 121°C에서 15분간 고압멸균 후 지름 6 cm 샐레 (Falcon 1007)에 분주하여 사용하였다. 캘러스 유도는 25°C 암실에서 30일간 배양한 후 치상한 약수에 캘러스를 유기한 약의 수를 백분율로 구하였다. 식물체 재분화는 2 mg/L의 KI, 0.2 mg/L의 ZAA, 40 g/L의 maltose, 5%의 gelrite가 첨가된  $N_6$ - $Y_1$  배지에서 수행하였다. 25°C 명조건 (2,500 Lux, 14시간 조명)의 배양실에서 30일간 배양한 후 배지에 이식한 캘러스 중 shoot와 root를 형성한 완전한 식물체를 분화한 캘러스의 수로 식물체 재분화율을 구하였다.

## 결과 및 고찰

벼 약배양에서 효과적인 탄소원을 찾고자 “밀양 23호”를 이용하여 탄소원의 종류별 캘러스 유도율을 조사한 바 (Table 1), 관행의 sucrose 단용이나 sucrose와 glucose 혼용처리의 3.5%에 비하여 maltose를 사용하였을 때 캘러스 유도율이 16.1%로 현저히 높아졌다. Jain et al. (1996)은 벼의 원형질체 배양에서 탄소원으로 여러가지 당류를 사용한 결과 maltose가 캘러스의 증식이나 shoot분화에 효과적이라고 하여서 본 실험과 일치하는 경향이 있었다. 배지내에 첨가되는 탄소원은 일반적으로 sucrose를 사용하는데 sucrose는 배지내에서 세포가 분비하는 invertase에 의하여 세포가 이용하기 쉬운 glucose와 fructose로 분해된다. 벼의 세포는 fructose보다는 glucose를 우선적으로 소비하는 전형적인 diauxic growth pattern을 보이는 것으로 알려져 있어서 두분자의 glucose로 구성된 maltose 처리에서 캘러스유기율이 높았던 것으로 생각되나 자세한 기작에 대해서는 더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다. 배지내에 첨가되는 maltose의 적정농도는 캘러스 유도율 측면에서 40~60 g/L을 사용했을 때가 sucrose와 glucose를 혼용하였을 때보다 약 5배 정도 높았다 (Table 2). Maltose를 사용하여

**Table 1.** Effect of carbohydrate source on callus formation of anther culture of rice.

Carbohydrate source (g/L)	No. of anther inoculated	No. of anther induced calli	Percentage of callus induction (Index)
Sucrose 40	566	20	3.5 (100)
Glucose 40	551	10	1.8 ( 51)
Fructose 40	533	5	0.9 ( 26)
Maltose 40	589	95	16.1 (460)
Suc 30+glu 10	566	20	3.5 (100)

†: Cultivar : Milyang 23, suc+glu: sucrose + glucose.

‡: Anthers were immediately inoculated with cold pretreatment at 12°C.

품종군별 캘러스 유도정도를 조사하여 본 바 (Table 3), 자포니카 벼에서는 1.4~1.8배, 통일형은 3.2~11.6배, 그리고 인디카형인 IR50에서는 2.7배로 sucrose와 glucose를 혼용하였을 때 보다 높아졌다. 전형적인 인디카 품종인 "Tetep"의 경우 sucrose 단용이나 sucrose와 glucose를 혼용하였을 때는 거의 캘러스가 유기되지 않은 반면 maltose를 사용하였을 경우는 캘러스 유도가 12.5%나 되었다. Maltose 처리에서 공시된 생태형별 모든 품종의 캘러스 유도가 증가되었는데, 그 증가비율은 특히 통일형이나 인디카 벼에서 높았다. 탄소원의 종류가 식물체 재분화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 인디카형 품종인 "Tetep"을 이용하여 sucrose 또는 maltose가 첨가된 배지에서 유기된 캘러스를 각각 sucrose 또는 maltose가 첨가된 재분화 배지로 이식하여 식물체 분화율을 조사한 바 (Figure 1), 캘러스 유도시 sucrose를 사용하였을 때는 재분화시 사용한 탄소원의 종류와는 상관없이 식물체를 분화하지 못하였고, maltose를 사용한 배지에서는 sucrose 첨가 배지 유래의 캘러스에서 6.7%, 그리고 maltose 첨가 배지 유래의 캘러스에서 13.7%의 식물체 재분화율을 보여 식물체 재분화에서도 mal-

tose가 효과적이었다. 벼 원형질체 배양에서도 maltose를 사용하였을 경우 shoot 재분화율이 sucrose 처리에 비해 높았다고 하여 식물체 재분화에 maltose가 효과적이라고 하였다 (Jain et al. 1996). 벼 약배양에서 캘러스 유도효율을 높일 수 있는 방법 중의 하나는 약의 저온 전처리이다 (Chung and Sohn 1986). 일반적인 저온 전처리 방법은 광구배양병에 담아 수분을 공급하면서 외기에 노출된 상태로 저온처리하는 것이다. 본 실험에서는 시료의 전처리시 CA (Controlled Atmosphere) 저장의 원리를 응용하여 PE 필름에 진공포장한 후 저온처리 하였다. 진공포장후 저온처리는 관행방법에 비하여 캘러스 유도가 24%~114% 증가되었다 (Table 4). 또한 관행의 방법으로 약을 30일간 저온처리하였을 경우 캘러스 유도가 11.8%로 오히려 15일간 저온처리하였을 때의 15.3%보다 감소한 반면 진공포장 후 저온처리를 하였을 때는 30일 후에도 캘러스 유도가 19.0%에서 25.3%로 오히려 증가되었다. 이러한 결과는 진공포장을 하였을 경우 30일 후에도 약이 연한 녹색을 유지한 데 비해 관행의 방법으로 저온전처리하였을 경우 외관적으로 보아도 검게 변하여 약의 활력 소실에 의한 것으로 추정된다. 또한 관행의 저온처리는 외기에 노출되어 보관하는 것이어서 15일 이후에는 식물체의 괴사 및 부패가 자연적인 생리현상에 의하여 급격히 진행되었으나 진공포장 후 저온처리한 처리에서는 15일 이후에도 이와같은 현상이 느리게 진행된 것에 기인한 것으로 생각된다. 벼 품종육성에 이용되는 유전자

**Table 2.** Effect of maltose concentration on callus formation of anther culture of rice.

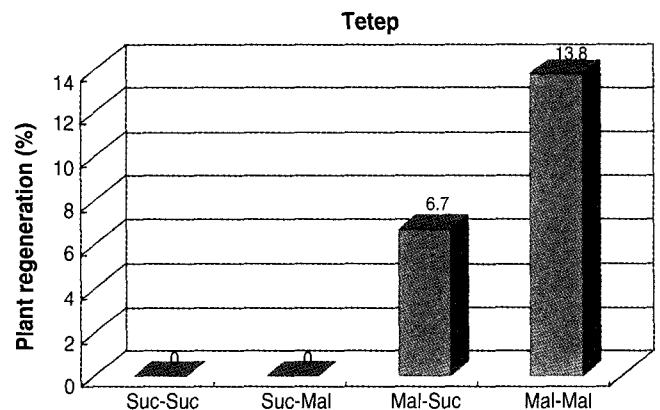
Maltose (g/L)	No. of anther inoculated	No. of anther induced calli	Percentage of Callus induction (Index)
10	622	23	3.7 (109)
20	674	54	8.0 (253)
40	637	106	16.6 (488)
60	510	101	19.8 (582)
Suc 30+glu 10	647	22	3.4 (100)

†: Cultivar : Milyang 23, suc + glu: sucrose + glucose.  
‡: Anthers were immediately inoculated with cold pretreatment at 12°C.

**Table 3.** Callus induction from anther culture on different rice type.

Rice type	Variety	Carbohydrate source	No. of anther inoculated	Callus induction (%)
Indica	IR 50	Maltose	502	12.9 (269)
		Suc + glu	434	4.8 (100)
	Tetep	Maltose	513	12.5 (6,250)
		Suc + glu	606	0.2 (100)
Samgang	Maltose	499	6.0 (316)	
	Suc + glu	515	1.9 (100)	
Tongil	Gaya	Maltose	485	8.9 (989)
		Suc + glu	529	0.9 (100)
	Milyang 23	Maltose	743	10.4 (1,156)
		Suc + glu	663	0.9 (100)
Tropical japonica	Bulu	Maltose	653	9.2 (137)
		Suc + glu	615	6.7 (100)
Japonica	Hwayeong	Maltose	545	37.6 (177)
		Suc + glu	509	21.2 (100)

†: Anthers were immediately inoculated with cold pretreatment at 12°C.  
‡: Maltose 40 g/L, Suc + glu : sucrose 30 g/L + glucose 10 g/L



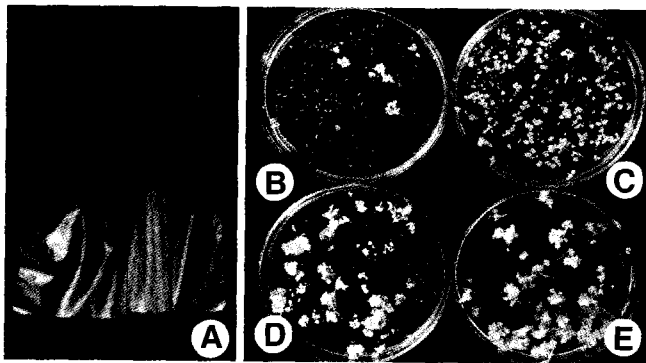
**Figure 1.** Effect of carbohydrate source on the plant regeneration from anther culture of rice. \*A-B: (carbohydrate used in callus induction)-(carbohydrate used in plant regeneration). \*\*Suc: sucrose, Mal: maltose.

**Table 4.** Effect of vacuum packaging on the callus formation during the cold pretreatment of anther.

Cold pretreatment	Percentage of callus induction (cold pretreatment days)		
	0	15	30
Conventional	10.2	15.3	11.8
Vacuum packaging (Index)	-	19.0 (124)	25.3 (214)

\* Cultivar : "Hwayeong"

원의 경우 대부분 출수기가 8월 초·중순으로 집중되어 있는데 이와같은 이유로 배양에 적합한 화분소포자를 갖는 시기 또한 특정시기에 집중되어 주어진 시간에 많은 수의 조합을 배양하는데 어려움이 많이 있었다. 약의 저온처리 기간연장은 캘러스의 유기효율 증진과 더불어 약배양이 가능한 기간연장 및 약치상 작업의 분산이라는 측면에서 활용가치가 높다고 하겠다. 개선된 배지와 저온전처리 방법을 병행하여 생태형별 캘러스 유도율과 식물체 재분화를 본 바 (Table 5, Figure 2), 캘러스 유도율은 일반형이 28%에서 56%, 통일 및 인디카형이 12%에서 32%로 증가하였으며, 식물체 분화율은 일반형 14%에서 35%, 인디카 및 통일형은 6%에서 17%로 캘러스 유도와 식물체재분화 모두 약 2배 이상 높아졌다. 이상의 결과로 볼 때 벼 약배양시 배지내에 첨가되는 carbohydrate source는 sucrose 단용이나 sucrose와 glucose의 혼용보다는 maltose가 효과적이었고 저온전처리시 진공포장 처리는 30일 후에도 약의 활력이 유지되어 약의 수명연장에 상당한 효과가 있었다.



**Figure 2.** Cold pretreatment and plant regeneration on the anther culture of rice. A, Vacuum packaging of panicles during cold shock treatment; Callus induction (B) and plant regeneration (D) on the sucrose supplemented medium; Callus induction (C) and plant regeneration (E) on the maltose supplemented medium.

약배양법은 계통육종법에 비하여 품종의 육성 기간단축뿐만 아니라 소요되는 경비도 적다는 장점도 있어(Sanint et al. 1996) 금후 탄소원으로서의 maltose의 이용에 대한 자세한 작용기작이나 관련 유전자의 탐색 그리고 저온처리시 진공포장에 의한 약의 활성 유지에 대한 자세한 메커니즘에 대한 연구가 더욱 깊이 있게 수행되어진다면 벼에서 약배양의 육종적 활용도는 한층 더 증가할 것이다.

**적 요**

벼 약배양에서 재분화 효율향상을 위하여 캘러스 유도 및 식물체 재분화에 효과적인 저온 전처리방법 개발과 배지내에 첨가되는 탄소원을 선발하였다. 먼저 일반적으로 배지내에 첨가되는 탄소원인 sucrose를 두분자의 glucose로 구성된 maltose로 변경하여 본 바, 캘러스 유도율이 자포니카에서는 1.4~1.8배, 통일형에서는 3.2~11.6배, 그리고 인디카형인 IR50에서는 2.7배 증가하였다. 인디카형 벼인 "Tetep"에서는 캘러스 유도율이 관행의 sucrose와 glucose를 혼용한 처리에서는 0.2% 였으나 maltose를 단용한 처리에서는 12.5%로 크게 증가하였다. 채취된 시료를 간이 진공포장한 후 저온처리 하였을 경우 관행의 광구배양병을 이용한 경우에 비해 캘러스 유도율을 2배 이상 크게 증가시켰고 저온처리기간을 30일까지 연장하여도 캘러스 유도율이 저하되지 않아 약치상 작업시기를 분산시키는 효과가 있었다. 위의 두처리를 병행하여 벼의 생태형별 품종들의 캘러스 유도율과 식물체 재분화율을 조사한 바, 캘러스 유도율은 일반형이 28%에서 56%, 통일 및 인디카형이 12%에서 32%로 증가하였으며, 식물체 재분화율은 일반형 14%에서 35%, 인디카 및 통일형은 6%에서 17%로 캘러스 유도와 식물체재분화 모두 약 2배 이상 높아졌다.

**Table 5.** The Combining effect of carbohydrate (maltose) & cold pretreatment of anther (vacuum packaging) on the callus formation and plant regeneration of rice anther culture.

Rice type	Vareity	Conventional <sup>1)</sup>			Combined treatment <sup>2)</sup>		
		No of anther	Callus induction (%)	Plant regeneration (%)	No of anther	Callus induction (%)	Plant regeneration (%)
Japonica	Hwayeong	273	136 (50)	26	622	496 (80)	46
	Dongjin	244	55 (23)	16	871	363 (42)	38
	Koshihikari	295	76 (26)	9	773	464 (60)	29
	Hitomebore	286	44 (15)	3	889	384 (43)	25
	Mean	1,098	311 (28)	14	3,155	1,707 (56)	35
Tongil	Milyang 23	246	42 (17)	14	793	402 (51)	25
	Samgang	199	17 ( 9)	5	589	87 (15)	14
	Mean	445	59 (13)	10	1,382	489 (33)	20
Indica	IR 50	261	47 (18)	6	840	289 (34)	15
	IR 72	182	12 ( 7)	1	596	136 (23)	12
	Tetep	322	32 (10)	6	692	245 (35)	18
	Mean	765	91 (12)	4	2,128	670 (31)	15

<sup>1)</sup> N<sub>6</sub>-Y<sub>1</sub>배지, cold pretreatment without vacuum packaging. Carbohydrate source : sucrose 30 g/L+glucose 10 g/L.  
<sup>2)</sup> N<sub>6</sub>-Y<sub>1</sub>배지, cold pretreatment with vacuum packaging. Carbohydrate source : maltose 40 g/L.

## 인용문헌

- Chu CC, Wang CC, Sun CC, Hsu C, Yin KC, Chu CY, Bi FY (1975) Establishment of efficient medium from anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen source. *Sci Sin* 18: 659-668
- Chung GS (1985) Application of anther culture techniques to rice improvement. *Korean J Plant Tiss Cult* 12: 35-55
- Chung GS, Sohn JK (1986) Anther culture technology in rice. In: Kannaiyan S (ed), *Rice Management Biotechnology*, Associated Publishing Co. New Delhi, pp 1-9
- Guha-Mukherjee S (1973) Genotypic differences in the *in vitro* formation of embryoids from rice pollen. *J Exp Bot* 24: 139-144
- Henry Y, Vain P, De Buyser (1994) Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. *Euphytica* 79: 45-58
- Jain RK, Jain S, Davey MR, Cocking EC, Wu R (1996) Effects of amino acids, carbohydrates, and water stress on plant regeneration from cell and protoplast cultures of indica and japonica rice varieties. In: *Rice genetics III*, International Rice Research Institute, Manila, P. O. Box 933, Philippines, pp 519-524
- Kwon YS, Kim KM, Cho YG, Eun MY, Sohn, JK (2000) Quantitative trait loci (QTL) associated with callus formation and plant regenerability in anther culture of rice. *Korean J Breed* 32: 266-271
- Moon HP, Kang KH, Choi SH, An SN (1996) Genetic variation of a single pollen-derived doubled haploid population in rice In: *Rice genetics III*, International Rice Research Institute, Manila, P. O. Box 933, Philippines, pp 492-498
- Niizeki H (1983) Uses and application of anther and pollen culture in rice. In: *Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement*, Science Proceedings of a workshop cosponsored by the Institute of Genetics, Academia Sinica and The international Rice Research Institute, Science Press Beijing, China and International Rice Research Institute, pp 165-171
- Sanint LR, Martinez CP, Lentini Z (1996) Anther culture as a rice breeding tools: a profitable investment. In: *Rice genetics III*, International Rice Research Institute, Manila, P. O. Box 933, Philippines, pp 511-518
- Taguchi-Shiobara F, Komatsuda T, Oka S (1997a). Comparison of two indices for evaluating regeneration ability in rice (*Oryza sativa* L.) through a diallel analysis. *Theor Appl Genet* 94: 378-382
- Taguchi-Shiobara F, Lin SY, Tanno K, Komatsuda T, Yano M, Sasaki T, Oka S (1997b) Mapping quantitative trait loci associated with regeneration ability of seed callus in rice, *Oryza sativa* L. *Theor Appl Genet* 94: 828-833

(접수일자 2003년 11월 1일, 수리일자 2003년 12월 2일)