

쌀보리 약배양을 위한 약치상 방법별 배양효율

박태일^{1*}, 정선옥¹, 김영진¹, 김현순², 서재환¹, 박기훈¹, 김정곤¹, 윤성중³
¹호남농업연구소, ²농촌진흥청 국제협력과, ³전북대학교

Anther Culture Efficiency According to Plating Method in Naked Barley

Tae Il Park^{1*}, Sun Ok Jeoung¹, Young Jin Kim¹, Hyun Soon Kim², Jae Hwan Seo¹
Ki Hun Park¹, Jung Gon Kim¹, and Song Joong Yun^{3*}

¹National Honam Agricultural Experiment Station, RDA, Iksan 570-080, Korea

²International Technology Cooperation Center RDA, Suweon 441-707, Korea

³Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

ABSTRACT Barley anther culture is hard working to plating picking out anther from the glume and demand long time comparing to be short available development stage for effective culture. Also, it has been treatment massive materials due to low plantlet comparing to get desirable plants intensively. Consequently, this experiment was carried out trying to be more high barley anther culture effectively in terms of save plating effort. Plating materials and culture temperature affected anther culture efficiency are among the inoculation tissues or organs such as anthers, spikelets and whole panicles, culture efficiency was higher with spikelets in two-rowed than six-rowed barley due primarily to a lower contamination, and calli were induced within 30 to 50 days. Callus induction and plant regeneration rates were higher in cultures at 25°C than at 15°C and 20°C. Days to callus induction were 25 to 50 days at 25°C and 50 to 60 days at 20°C.

서 론

국내에서의 보리 약배양은 1980년대 중반에 시작되었으나 그 동안 약배양 효율이 높은 품종을 선발하지 못하고 배양효율이 저조하여 약배양 기법을 육종에 도입하는데 많은 문제점이 지적되고 있다. 실제로 지난 20년 동안 보리 약배양 기법에 의한 육종연구는 계통 및 연차별 캘러스 형성의 불안정과 낮은 식물체 재분화로 효율적인 계통전개가 어려워 직접적인 품종개발 보다는 유용 열성인자의 도입을 위한 중간 모본육성 이용에 기여하는 쪽으로 기본적인 방향이 변화되고 있다 (Foroughi-wear et al. 1984). 이러한 단점

때문에 약배양은 F₁ 계통의 신속한 고정과 세대단축을 위해서 효율적인 방법을 모색해야 하는데 짧은 기간 내에 일시적으로 쏟아지는 대량의 약을 치상하기 위한 방법으로 약을 적취하여 배양하는 방법과 빠른 시간 내에 다량의 약을 함유한 이삭의 여러 가지 부위를 치상하는 방법간의 배양 효율을 검토하였다. 이러한 시도들은 아직 보고된 바가 없으며 이것은 약이 아닌 다른 조직에서의 캘러스 유기를 염려해서인데 실질적인 육종에서의 적용은 변이체 창출에 목적을 둘 수도 있고 체세포에서 유기된 식물체는 후대 선발 과정을 거치면서 확인이 가능하기 때문에 다량의 재료를 빠른 시간 내에 치상 하여 많은 양의 재분화 식물체를 생산해 내는데 있다고 보기 때문이다. 이러한 보리 약배양의 전반적인 생력화 정도와 식물체 재분화율을 검토하여 볼 때

*Corresponding author Tel 063-840-2239 Fax 063-840-2116

E-mail: parktl@rda.go.kr

다각적인 시도들은 검토되어야 한다고 생각한다. 특히 보리 약배양을 통한 육종기술의 도입을 위해서는 생육특성상 대량 치상 방법이 절실하다. 따라서 본 연구는 국내 보리 약배양을 이용한 보리 반수체 육종의 기술을 체계화하고 실용화하고자 대량의 약 치상방법과 재료별 효율성을 조사하였다.

재료 및 방법

가. 약의 채취시기 및 전처리

본 실험은 농촌진흥청 호남농업연구소 전작포장의 비닐 하우스 (polyethylene vinyl house)내에서 10월 25일에 13 kg/10 a를 줄뿌림하였으며, 휴폭과 파폭은 40 cm×18 cm, 시비량은 N-P₂O₅-K₂O=12-8-7 kg/10 a를 사용하여 재배하였다. 약배양 시료는 외형적인 시기를 판단 한 후에 화분 1핵기를 중심으로 모식물의 엽이간장 5~10 cm 정도의 시료를 채취하였으며, 약의 전처리는 직경 10 cm 롤 (roll) 비닐봉지에 5~10 개체씩 넣어 4℃에서 21~28일 동안 저온 처리하였다.

나. 치상 및 배양방법

약치상은 무균상에서 75% 알코올로 표면 살균한 후 약을 적취하여 직경 87 mm 페트리디쉬에 40 여개의 약을 치상하여 비닐 랩으로 밀봉 후 항온기에서 배양하였고, 소수 및 통이삭 치상은 시료를 알코올 75% (용)액에 침적 표면 살균하고 이삭을 나출시켜 NaClO 2.0%액에 5~10분간 교반 후, 멸균수로 3회 반복 세척하여 멸균된 여과지로 여분의 물기

를 흡수 건조시켜 치상하였다.

치상 방법은 이삭전체를 치상하는 통이삭 배양, 통이삭을 3~4개 절편으로 나누어 치상하는 절편배양, 소수를 분리하여 하나씩 치상하는 소수배양과 약을 적취하여 배양하는 약배양으로 구분하여 효율성을 검토하였다. 캘러스 유기는 CI 개선배지 (CIH₁)에 0.4% phytigel, 식물 성장 조절제 NAA 2 mg/L, BAP 1 mg/L, maltose 50 g/l 를 첨가하여 25℃에서 배양하였고, 식물체 재분화는 CIH₁ 고체배지에 IAA 1 mg/L, BAP 2.0 mg/L, sucrose 30 g/L를 첨가하여 25℃의 2,000 lux에서 배양하였다.

결과 및 고찰

가. 치상 방법에 따른 약배양 효율

우리나라의 보리 생육은 대부분 추파형 보리로서 월동 후 3월 중 하순경에 최고 분얼기에 도달한 후 광의 장일 조건에 따라 절간 신장이 상대적으로 짧은 기간 내에 이루어지며 출수기의 변이폭도 대부분 15일 이내에 분포한다. 따라서 F₁ 계통의 신속한 고정과 세대단축을 위해서는 효율적인 약배양 방법을 모색해야 하는데 짧은 기간 내에 일시적으로 쏟아지는 대량의 약을 치상하기 위한 방법으로 약을 적취하여 배양하는 방법과 빠른 시간 내에 다량의 약을 함유한 이삭의 여러 가지 부위를 치상하는 방법간의 배양효율을 검토하였다. 치상부위로는 약을 치상하는 일반적인 방법과 소수를 하나씩 분리하여 치상하는 소수치상, 통이삭을 3~4개로 무작위로 절단 치상하는 절편치상, 이삭전체를 치상하는 통이삭 치상 등으로 수행하였는데 이 방법들 간에는 보리의 수형에 따라 차이를 보였다.

1. 치상방법별 배양효과

2조 겉보리인 두산 29호와 6조 쌀보리인 새쌀보리의 수형별 치상속도 및 캘러스율을 단순 비교하여 보면, 시간당 치상수 및 치상속도는 약치상 배양에 비해 소수치상은 3배, 통이삭 치상은 약 5배정도 단축된 반면 오염율은 2조보리의 경우 3~10배, 6조의 경우 2~5배 정도 높았으며, 캘러스율은 이삭당 캘러스 유기율로 환산하여 보았을 때 두산 29호는 약>소수>통이삭 치상 순으로 효율이 높았지만 6조인 새쌀보리는 소수치상에서 18.9%로 높아 6조보리의 소수치상도 품종에 따라서 배양이 가능하였다 (Table 2).

Table 1. Composition of CIH₁ culture media (ml/l)

NH ₄ NO ₃	165	Ca-panthothenate	2.0
KNO ₃	1,900	Nicotinic acid	2.0
KH ₂ PO ₄	170	Pyridoxin-HCl	2.0
H ₃ BO ₃	6.2	Thyamine-HCl	0.4
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	Citric acid	10.0
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	L-glutamine	256
KI	0.82	Biotine	0.02
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	L-proline	250
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	Casein Hydrolysate	300
Na ₂ MoO ₄ ·7H ₂ O	0.025	Myo-Inositol	2000
FeNa ₂ EDTA·2H ₂ O	40.0	Maltose	50g
Na-Pyruvate	10.0	pH	5.8

따라서 시간당 치상량, 캘러스 유기정도, 및 오염율을 종합적으로 고려하여 치상부위별 약배양 효율을 검토하였다 (Table 3). 시간당 치상 약수 및 이삭 수는 통이삭, 소수, 절편, 약의 순으로 많았다. 캘러스율은 수형에 따라 차이가 컸는데 2조 보리에서는 약이나 소수치상 모두 높았으나 6조 보리에서는 약치상만이 높았다. 두산29호, 올쌀보리 및 두원참쌀보리의 종합적인 약배양 효율은 약치상의 경우 각각 40.8%, 56.6%와 28.6%이었으며 소수치상의 경우는 각각

66.4%, 10.2% 및 149.6%이었다. 이러한 결과는 약배양을 위한 이삭의 치상부위로는 약을 치상하는 것이 배양하기에 가장 유리하나 품종과 이삭형태에 따라서는 소수 배양과 절편 치상의 가능성을 시사한다. 그러나 현재의 소수배양 및 절편치상에 의한 약배양 기술 수준에서의 생력화 정도와 식물체 재분화율은 개선의 여지가 많으므로 약배양의 생력화를 위한 체계적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 특히 보리의 화기구조와 생육특성상 다량의 약배양 계통 육성을 위해

Table 2. Plating efficiency and callus induction on different materials containing anthers

Variety	Parts plated [†]	No. of anthers plated	No. of callus (%)	Contamination (%)	Panicles plated / hour	Index (Plating efficiency) [‡]
Doosan 29	A	3,516	176(5.0)	2.4	7	100
	S	4,176	113(8.1)	6.5	21	300
	WP	22,920	95(24.9)	22.0	32	457
	Total	30,612	384(7.3)	10.3	20	286
Saessalbori	A	3,174	3(0.1)	5.2	5	100
	S	13,965	880(18.9)	12.4	15	300
	WP	38,430	20(5.7)	25.5	25	500
	Total	55,569	903(11.0)	14.4	15	300
Gross total		86,181	1,287(9.5)	12.3	17.5	586

[†]A, anther; S, spikelet; WP, whole panicle

[‡]Index of plating speed comparing to no. of anthers plated

Table 3. Anther culture efficiency of the different panicle parts

Varieties	Parts plated [†]	No. of anthers / panicles	Callus (%) anthers / panicles	Contamination (%)	Efficiency [‡]
Doosan 29	A	1,006 / 17	2.4 / 82.3	0	40.8*
	S	3,393 / 45	1.6 / 62.2	5.6	66.4*
	PP	5,160 / 86	0.1 / 4.7	22.2	0
	WP	3,675 / 49	0.0 / 0.0	26.5	0
Olssalbori	A	1,187 / 16	3.7 / 68.7	2.6	56.6*
	S	414 / 6	1.7 / 50.0	0	10.2
	PP	2,808 / 47	0.3 / 10.6	22.2	0
	WP	2,550 / 34	0.6 / 23.5	31.7	0
Dooweonch-apssalbori	A	1,572 / 26	1.1 / 26.9	0	28.6
	S	3,054 / 41	3.7 / 75.6	2.1	149.6**
	PP	3,000 / 40	0.1 / 2.5	7.7	1.9
	WP	3,600 / 48	0.5 / 27.1	10.4	13.6
Total	A	3,765 / 59	2.3 / 54.2	0.9	134.8
	S	6,861 / 92	2.6 / 67.4	2.6	236.6
	PP	10,968 / 173	0.1 / 5.8	17.4	0
	WP	9,825 / 131	0.3 / 16.0	22.9	16.4

[†] A, anther; S, spikelets; PP, panicle partition; WP, whole panicles

[‡] Efficiency: plating amount (panicles) / hour × callus rate - contamination rate

*,** Significant at 0.05 and 0.01 levels of probability, respectively

서는 대량 치상 방법의 개발이 절실히 요구된다. 대량 치상 방법의 일환으로 통이삭으로부터 소포자를 추출 선별하여 배양하는 방법이 시도된 바 있다 (Lee and Wehr 1993, Datta 1987, Peng and Wolyn 1999).

한편 치상부위별 캘러스 유기기간은 30일 이내에서부터 80일까지도 캘러스가 유기 되었으나 90% 이상 대부분의 캘러스는 30일 전후에서 50일 사이에 유기 되었으며, 캘러스 상태도 양호하여 식물체 재분화율도 높은 경향이였다 (Figure 1). 이삭 부위별로는 품종간 유기 기간에 차이가 있었으며 새쌀보리 경우는 치상 후 30일 이내 캘러스 유기가 되어 쌀보리를 대상으로 검토해 본 결과 캘러스 유기는 25일 이내에 거의 분포하였다.

2. 치상 부위별 기타 배양 효과

쌀보리 약배양에서 1차적으로 부딪히는 배발생적인 캘러스 유기율을 높이기 위해서 약을 포함한 치상 부위별로 저온 전처리, 배지 물리성, 탄소원 종류, 치상방법 등을 고려하여

검토하였다. 저온 전처리 기간을 거치지 않은 소수치상 후 4℃에 0~28일 저온처리 결과 두산29호에서는 21일, 새쌀보리는 무처리 (0일)에서 8.7%, 3.4%로 각각 저온처리가 다른 것으로 보아 최적일수가 품종별로 차이가 있었다(Kweon et al. 1989). 이는 약을 치상한 결과와 쌀보리의 경우 상이하였는데 소수치상에는 전처리 없이 바로 배양하는 방법도 품종에 따라 가능하였지만 이는 부위별 약치상에 있어 화분의 반응에 차이가 있는 것으로 보아 더욱 검토가 요구되었다 (Table 4). 또한 배지 물리성에서의 반응도 차이가 있었는데, 두산29호는 반고체 보다 고체에서 좋았으나 쌀보리는 고체에서는 유기가 되지 않았고 반고체 배지에서 1.5%를 나타내었으며 (Table 5), 탄소원으로는 sucrose 보다 maltose가 맥종에 관계없이 월등히 높아 기존의 보고들과 일치하였다 (Orshinsky et al., 1990; Wenzel et al. 1984) (Table 6).

3. 치상부위별 배양배지 효과

본 실험에서 쌀보리 약배양에 적합 배지로 선정된 CIH₁

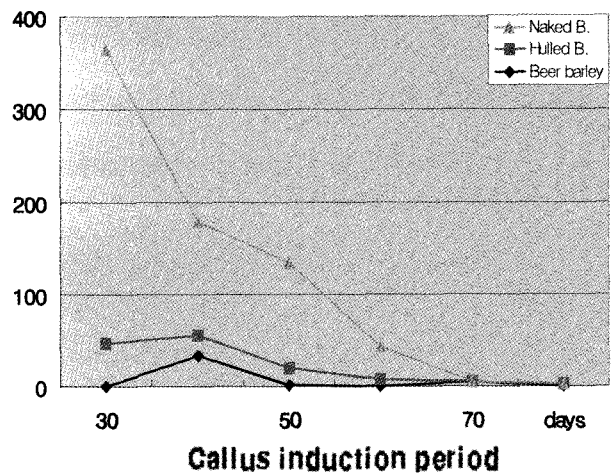
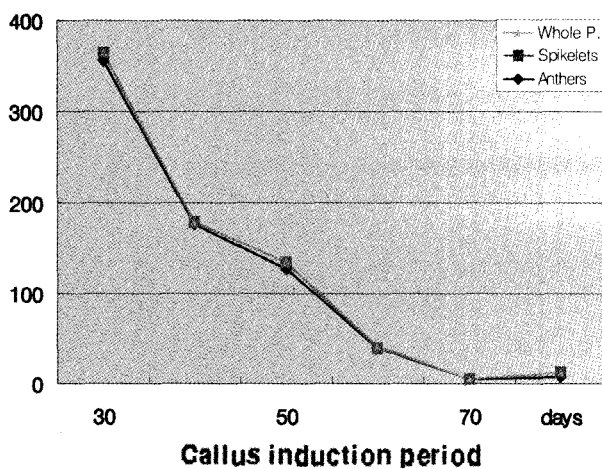


Figure 1. Duration of callus induction after the inoculation of different panicle parts of the barley species

Table 4. Callus induction rates between 4℃ and culturing durations after plating anthers directly without any pretreatment

Plated parts	Duration (days)	Varieties		Total
		Doosan 29	Saessalbori	
Anther	28	2.9	0.8	2.8
Spikelet	0	1.1	3.4	2.6
	7	5.4	0.6	2.2
	14	5.4	0.0	1.9
	21	8.7*	0.0	3.0
	28	0.0	0.0	0.0
Total		4.2	0.7	1.8

을 소수와 통이삭의 치상부위에 따른 배지별 반응을 보기 위하여 검토하였다 (Table 7). 치상후 전처리 전과 후의 배양에 따른 소수와 통이삭 치상의 배지 물리성별 캘러스 유기율은 맥종간 반대의 결과를 얻었는데 매우 흥미로운 결과는 소수치상 배지는 반고체에서 고체로 갈수록 좋았으며, 특히 CIH₁ 배지 고체에서 새쌀보리가 39.9%의 반응을 보여 특이하게 높았다. 통이삭 배양도 고체에서 유기율이 높았지만 액체 배지에서는 배지내 성분이 통이삭으로의 전이율과 상호 관련이 있을 것으로 생각 되었는데 통이삭의 치상 위치별 물질 이동 차이에 따른 캘러스 유기형태를 살펴보기 위하여 Table 7과 같이 배지 물리성별로 통이삭의 위치를 달리 하여 치상하였다. 그동안 이와 같은 결과에 대한 구체적인

언급은 없었지만 배지물리성은 소포자의 반응을 자극하고 영양공급을 도와주는 측면에서 볼 때 고형물질로써 물리성에 따른 스트레스 차이로 여겨졌으며 더 검토가 요구되었다.

통이삭 치상 위치별로는 세워서 치상하는 형태가 공통적으로 캘러스 반응이 좋았으며, 배지 물리성별로는 반고체, 고체, 액체 배지 순으로 좋았는데, 특이 한 것은 통이삭을 누어서 치상한 것은 식물체 분화가 동시에 이루어지는 경향이었고 세워서 치상한 이삭은 배지와 접촉하지 않은 상단부에 캘러스가 유기 되어 배지성분의 이동에 의해서 캘러스가 유도되는 것을 확인할 수 있었다 (Table 8, Figure 2).

교잡육종에서 계통의 신속한 고정과 세대단축을 위한 효율적인 방법으로 약배양을 도입하고 있다. 자연 상태에서의 보리의 약배양은 짧은 생식생장으로 인하여 단기간 내에 많은 량의 약을 치상하여야 되는데 빠른 시간에 다량의 약을 함유한 이삭의 여러 부위를 치상하는 방법은 아직 시도된 바가 없다. 본 실험을 통한 일련의 결과들은 보리 약배양의 전반적인 생력화 정도와 식물체 재분화 등의 효용성을 볼 때 실용화하기에는 어렵지만 맥종 및 수형에 따라서는 가능할 것으로 판단되었다.

Table 5. Callus induction rates spikelets cultured on different media conditions at 4°C for 28 days

Plated part	Media condition	Callus induction (%)		Total
		Doosan 29	Saessalbori	
Spikelets	Semisolid	2.9	1.5	2.2
	Solid	5.2*	0	2.7
Total	-	5.2	1.1	2.5

*,** Significant at 0.05 and 0.01 levels of probability, respectively.

Table 6. Callus induction rates of spikelets cultured on different carbon sources at 4°C for 28 days

Plated part	Carbon source	Callus induction (%)		Total
		Doosan 29	Saessalbori	
Spikelets	Maltose	6.5**	1.5	3.6
	Sucrose	1.7	0.9	1.2
Total	-	5.2	1.7	2.5

*,** Significant at 0.05 and 0.01 levels of probability, respectively

Table 8. Callus induction rate of whole panicles plated at different positions

Condition	Plated methods		
	Flat (%)	Aslant (%)	Erect (%)
Liquid	-	-	15(15.8)
Semisolid	12 (8.6)	12(10.2)	24(24.0)
Solid	17(15.6)	16(15.5)	20(22.7)
Total	29(11.7)	28(12.7)	59(20.8)

Table 7. Callus induction ratios at different plating parts on different solidifying CIH₁ medium

Plated parts	Varieties	No. of anthers plated	Callus induction (%)			Total
			Liquid	Semi solid	Solid	
Spikelets	Saessalbori	800	-	17.3*	39.9**	28.6
	Doosan 29	800	-	0.0	0.0	0.0
	Total	1,600	-	17.3	39.9	28.6
Panicle	Saessalbori	800	4.5	3.3	5.3	4.3
	Doosan 29	800	19.1*	24.7**	7.5	17.1
	Total	1,600	23.6	28.0	12.8	21.4
Gross total		3,200	23.6	45.3	52.7	50.0

*,** Significant at 0.05 and 0.01 levels of probability, respectively

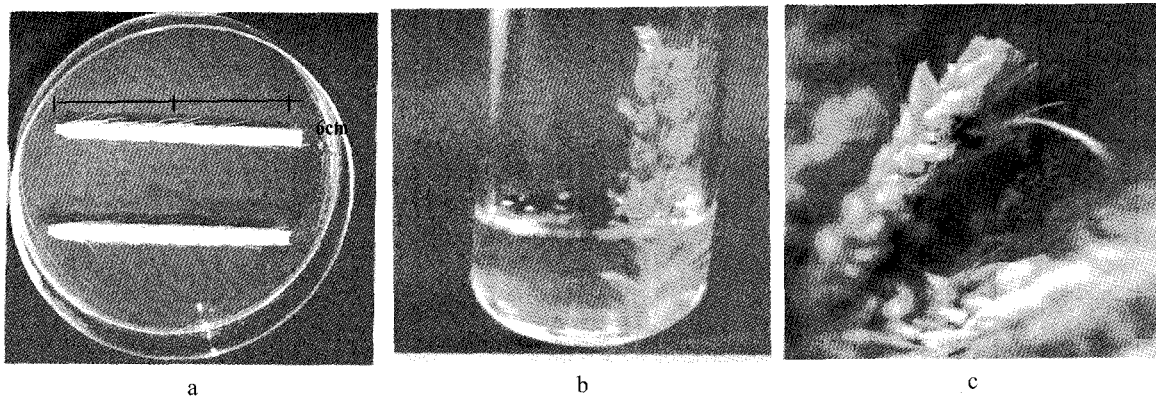


Figure 2. Callus and plant regeneration with whole panicle culture at flat (a), aslant (b) and at erect induction (c).

인용문헌

- Datta, S. K. (1987) Plant regeneration by pollen embryogenesis from cultured whole spikes of barley (*Hordeum vulgare*). *Theor. Appl. Genet.* 74: 121-124
- Foroughi-wehr, B. and W. Friedt (1984) Rapid production of recombinant barley yellow mosaic virus resistant *Hordeum vulgare* Lines by anther culture. *Theor. Appl. Genet.* 67: 377-382
- Gabriela Trejo-Tapia, Uriel Maldonado Amaya, Guadalupe Salcedo Morales, Antonia De Jesus Sanchez, Blanca Martinez Bonfil, Mario Rodriguez-Monroy and Antonio Jimenez Aparicio (2002) The effects of cold-pretreatment, auxins and carbon source on anther culture of rice. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 71: 41-46
- Kweon, Soon-Jong, Duck-Yong Suh, Hyung-Soo Suh and Gun-Sik Chung (1989) Study of anther culture in barley. 1. Difference between varieties, medium phase and type of explant at cold treatment in callus induction. *Res. Rept. RDA(U&I).* 31(2): 40-44
- Lee, J. H., and B. F. Wehr (1993) Microspore selection and callus formation efficiency in Barley (*H. vulgare* L.) Whole Spike Culture. *Crop Production and Improvement Technology in Asia.* 537-541, KSCS, Korea
- Orshinsky, B. R., L. J. McGregor, G. I. E. Johnson, P. Hucl, and K. K. Kartha (1990) Improved embryoid induction and green shoot regeneration from wheat anthers cultured in medium with maltose. *Plant Cell Rep.* 9: 365-369
- Peng, M., and D. J. Wolyn (1999) Improved callus formation and plant regeneration for shed microspore culture in asparagus. *Plant Cell Reports.* 18: 954-958
- Wenzel, G., B. Foroughi-Wehr, W. Friedt, F. Kohler, and T. Oo (1984) Cell and tissue culture as supplementary tool in plant breeding: Exemplified in potato, oilseed rape and barley. *Hereditas Supp Vol.* 3: 15-25

(접수일자 2007년 6월 29일, 수리일자 2007년 7월 16일)