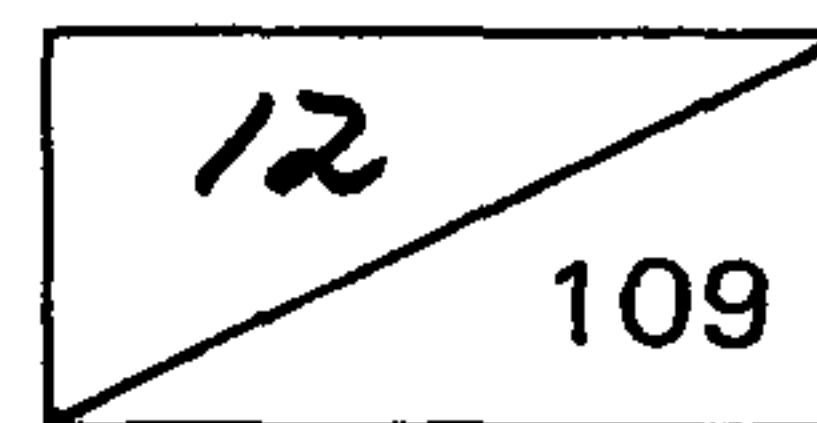


GOVP1199308445



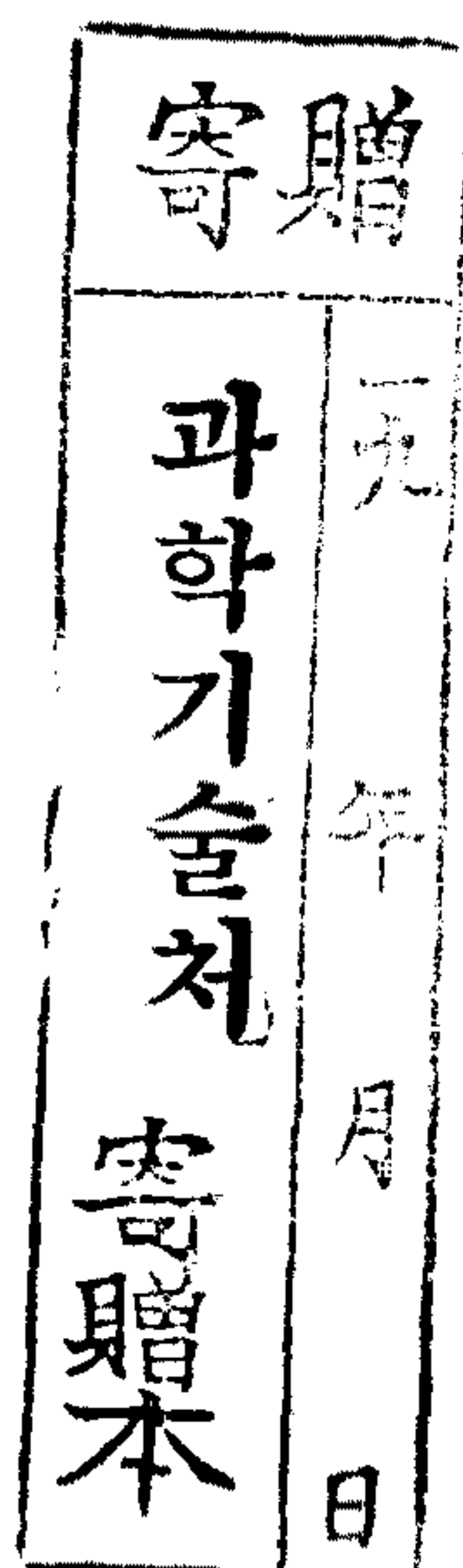
# 單子葉 作物의 人工種子 生産 모델 시스템 開發

Development of Model Systems for Producing Artificial Seeds in  
Monocotyledonous crops

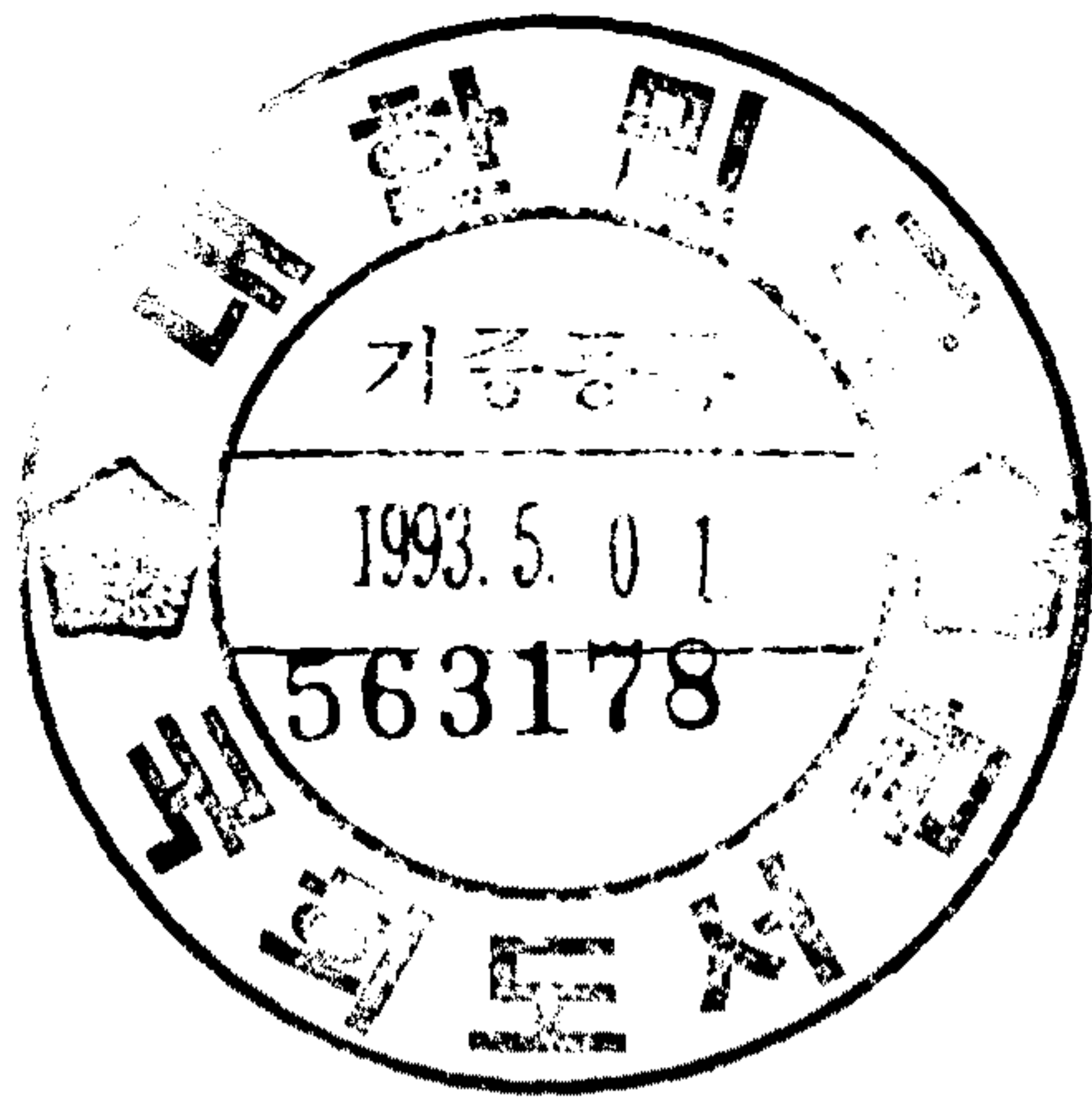
研 究 機 關

韓國科學技術研究院

附設遺傳工學研究所



科 學 技 術 處



# 提出文

科學技術處長官 貴下

본 보고서를 "單子葉 作物의 人工種子 生産 모델 시스템 開發"사업의 최종보고서로 제출합니다.

1992. 6

主管研究機關 : 韓國科學技術研究院 遺傳工學研究所  
總括研究責任者 : 劉長烈 (遺傳工學研究所 責任研究員)  
研究責任者 : 劉長烈 (遺傳工學研究所 責任研究員)  
研究員 : 宋南姬 (遺傳工學研究所 先任研究員)  
鄭元重 (遺傳工學研究所 研究員)  
金明局 (遺傳工學研究所 研究員)  
閔成蘭 (遺傳工學研究所 研究員)  
李幸順 (遺傳工學研究所 研究員)  
委囑研究員 : 崔鳳鎬 (忠南大學校 教授)  
李喜鳳 (忠南大學校 教授)  
金七龍 (嶺南作物試驗場 農業研究官)  
高在哲 (嶺南作物試驗場 農業研究官)

# 요약문

## I. 제목

### 單子葉 作物의 人工種子 生産 모델 시스템 開發

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

식물세포는 완전 개체로의 재생 능력이 있으므로 변이세포를 선발하거나 다른 생명체의 유전물질을 세포에 이입시켜서 새로운 형질을 가진 작물을 창출할 수 있다. 이러한 시도로 기존 육종의 한계를 벗어날 수 있으며 기존 육종에 의한 작물의 품종 개량에 소요되는 시간과 공간 그리고 인력을 획기적으로 단축시킬 수 있다.

한편, 우수한 형질을 보유한 새로운 개체가 만들어지면, 교잡에 의한 형질 변화를 방지하고 영양 번식을 하는 작물에 대해서는 실수요자에게 종자 번식이 주는 번식의 용이성을 살릴 수 있는 체세포배발생 (somatic embryogenesis)을 이용한 인공종자의 개발이 절실히 요구된다. 인공종자란 수정란이 아닌 일반 체세포가 기내에서 성장조절제의 자극에 의해 수정란의 난할과 같은 과정을 거쳐서 발달된 배(somatic embryo)를 천연의 수화겔의 캡슐에 넣은 것으로 미국의 Plant Genetics, Inc.가 이 분야의 선두주자로 알려져 있다. 이들은 셀러리와 알팔파의 체세포를 알진산 캡슐에 넣어 사용하고 있으며 이에 대한 특허를 1986년도에 획득한 바 있다. 그러나 Plant Genetics, Inc.의 인공종자는 수화형(hydrated type)이므로 이를 저장하거나 손으로 다루기가 어려워 결국 시험관내의 식물의 범주를 크게 벗어나지 못하는 결점이 있다. 이러한 결점을 보완하기 위해 최근 본 연구실에서는 당근 체세포배를 대상으로 수화형을 건조형(dry type)으로 발전시켜 보고한 바 있다.

이러한 현재까지의 인공종자 모델 시스템은 쌍자엽 작물을 대상으로 하고 있으나 이를 단자엽 작물 예컨대, 벼, 옥수수, 보리, 밀, 마늘 등으로 확대할 수 있다면 이들에 대한 F<sub>1</sub> 잡종이나 재조합 DNA 기법에 의해 개량된 작물의 종자 생산 단가를 획기적으로 낮출 수 있을 것이다. 옥수수의 F<sub>1</sub> 잡종 종자 생산은 노동 집약적이므로 종자의 단가가 대단히 높으며 벼, 보리, 밀 등의 F<sub>1</sub> 잡종 종자를 상업적으로 생산하는 방식은 아직 개발되어 있지 않다. 그러므로 F<sub>1</sub> 잡종으로부터 생산되는 인공종자가 이들의 적절한 대안이 될 수 있다. 이미 선진국에서는 단자엽을 대상으로 하는 인공종자 생산의 경제적 중요성에 대해 새롭게 인식하고 이에 대한 연구를 수 년전부터 착수하였다.

따라서 본 연구과제에서는 체세포 유전학의 국내 기술을 증진시키고 외국 선진 기술을 도입하여 국내의 주요 식량작물인 벼, 옥수수에 적용하여 단자엽식물에서의 체세포배의 대량 생산 시스템을 확립하고, 유전자 도입에 의해 형질전환된 체세포배를 이용한 단자엽 작물의 건조형 인공종자 생산의 모델 시스템을 만들고자 한다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위 (1991년도)

제3차 연도에는 건조형 인공종자 생산 시스템 개발에 주력하기로 한다.

#### 1. 단자엽 작물의 인공종자 생산 모델 시스템 개발

- 1) 벼 체세포배를 이용한 건조형 인공종자 생산의 조건을 규명하고 발아율을 조사한다.
- 2) NC-311처리에 따른 벼 현탁배양세포의 단백질 패턴변화
- 3) 벼의 체세포배발생을 통한 재분화식물체의 변이조사



#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 관한 건의

##### 1. 단자엽작물의 인공종자 생산 모델 시스템 개발

- 1) 태백벼의 체세포배로부터 수화형 인공종자를 제작한 후 상대습도 24% 이고 시간당 건조속도가 0.1-0.15 g인 clean bench에서 건조하여 건조율 70% 에서 22%의 발아율을 얻었다.
- 2) 태백벼의 현탁배양세포를 1  $\mu$ M NC-311로 처리하여 NC-311과 특이적으로 작용하는 gene products로 추측되는 (32 kDa, pH 5.1), (35 kDa, pH 6.8), (40 kDa, pH 7.3)등의 3개의 polypeptide 증가와 2개의 polypeptide(52 kDa, pH 5.3), (27.5 kDa, pH 6.3)의 양감소가 나타났다.
- 3) 태백벼의 배로부터 재분화된 식물집단(R1) 에서도 형질에 따라 모품종과 상이한 개체가 出穗期와 稈長에서 다소 높은 빈도로 출현되었고 稈實率에서는 불임비율이 높게 나타났다.

여 백

# Summary

## I. Title

Development of Model Systems for Producing Artificial Seeds in Monocotyledonous Crops.

## II. Objectives and Needs of the Projects

It is possible to improve the quality of crops by selecting variants in the cell level and by transferring valuable genes from other organisms to plant cells due to their regenerating capability into whole plants. These novel approaches may allow us to overcome the limit of the conventional breeding and to save time and labor previously required.

On the other hand, when new crops are developed by the approaches, it is necessary to propagate them vegetatively in order to prevent the change of the phenotypes by cross-pollination: the most idealistic way is to develop artificial seeds of the crops for the farmers' convenience. Artificial seeds are produced by encapsulating somatic embryos with natural hydrogel. Plant Genetics, Inc. in the United States is known as the pioneer of this field in the world. They have produced artificial seeds of celery and alfalfa by using sodium alginate as capsule materials for somatic embryos and have got a patent for the production of artificial seeds. However, hydrated artificial seeds are too soft to keep and handle freely. These difficulties in handling and preservation compelled hydrated artificial seeds to be restrained in the test tube.



In order to solve these problems described previously, we have recently established more advanced type of artificial seeds, dry type, which filled up the faults of hydrated type in carrot.

If the artificial seed system already developed in dicots is also able to apply to monocot such as maize, rice, barely, wheat, garlic etc., it will dramatically reduce the cost needed to produce F1 hybrid seeds.

Therefore, the project has aimed to enhance the national level of the technology related to the approaches by introducing the advanced technique from abroad and to develop model systems for improving the quality of food crops and producing desiccated artificial seeds in monocotyledonous crops.

### III. Contents and Scope of the Project

In the third year (1992), the project included :

- 1) Wet type artificial seeds fo Taebaegbyeo subjected to dehydration to 80% water loss on the clean bench(24% R.H. ; dehydration rate 0.1-0.15 g (water)/h ) were capable of germination at a frequency of 20%.
- 2) Cell suspension cultures of Taebaegbyeo were treated with 1 nM NC-311(herbicide). When compared with the control, the amount of polypeptides including 32, 35, and 40 kDa incleased, whereas that of 52 and 27.5 kDa decreased.
- 3) Among the R1 progeny of the above, there were a great degree of variation in traits including the earing season, the length of nodes which occurred at a considerable frequency, and the sterility at a high frequency.

- 4) A high frequency regeneration system through somatic embryogenesis from zygotic embryo-derived callus of F1 hybrid maizes(cv. Ivory 'N gold and Mexico QPM) is established. Typical somatic embryos with distinct scutellum, coleoptile, and coleorhiza were developed from maizes embryogenic callus.
- 5) High frequency plant regeneration from suspension cultures of japonica x indica rice(*Oryza sativa* L. cv. Taebaegbyeon) were established.

여 백

## Contents

Chapter I.	Introduction .....	13
Chapter II.	Production and germination of dry type artificial seeds of rice .....	16
Chapter III.	Two dimensional gel electrophoresis of rice suspension cultured cells treated with NC-311 .....	28
Chapter IV.	Somaclonal variation on plant regeneration from suspension cultured cells of rice .....	36

## Appendices

I.	Confirmation of Dosage Effects by Electrophoresis in Maize .....	47
II.	High frequency somatic embryogenesis in tissue cultures of F1 hybrid maizes ( <i>Zea mays</i> L.) .....	54
III.	High frequency plant regeneration from suspension cultures of japonica x indica rice ( <i>Oryza sativa</i> L. cv Taebaegbyeon) .....	62
IV.	Effects of ABA and the total inorganic nitrogen content on plant regeneration from cultured cells of rice ( <i>Oryza sativa</i> L. cv Taebaegbyeon) .....	70
V.	Effects of growth regulators and osmotica on somatic embryogenesis in rice ( <i>Oryza sativa</i> L. cv Taebaegbyeon) .....	76

여 백



## 목 차

제 1 장	총 론 .....	13
제 2 장	벼의 건조형 인공종자 제조와 발아율 조사 .....	16
제 3 장	NC-311처리에 따른 벼 현탁배양세포의 단백질 패턴변화 ...	28
제 4 장	벼의 체세포배발생을 통한 재분화식물체의 변이조사 .....	36

## 부 록

I.	同位元素分析에 의한 옥수수 胚乳의 遺傳子型 확인 .....	47
II.	F1 잡종 옥수수의 체세포배발생 .....	54
III.	High frequency plant regeneration from suspension cultures of japonica x indica rice ( <i>Oryza sativa</i> L. cv. Taebaegbyeo) .....	62
IV.	벼 배양세포로부터 식물체 재분화에 미치는 Abscisic Acid와 무기질소함량의 영향 .....	70
V.	벼의 체세포배발생에 미치는 성장조절제와 삼투환경의 영향 ...	76

여 백

## 제 1 장 총 론

現代 分子生物學이 급진적 발전을 이룩하게 된 것은 사용하는 細菌이 單細胞이며 核相이 半數體이고 짧은 生活還을 가지고 있으므로 遺傳學的 分析이 용이하다는 잇점 때문이다. 高等植物 또한 細胞 및 組織培養技術에 의해 化분이나 一般組織으로부터 캘러스를 유기한 후, 單細胞 혹은 原形質體로 분리하여 培養하면 微生物培養에 준하는 시스템을 만들 수 있으며 이로부터 일반 高等植物 遺傳學的의 시스템을 완전히 탈피하여 高等植物의 微生物 遺傳學的 접근을 시도할 수 있는바 이를 體細胞 遺傳學이라 한다.

植物細胞는 완전개체로의 再生能力이 있으므로 細胞融合에 의한 雜種植物 생산이나 外部遺傳物質을 細胞에 이식시켜 새로운 종을 창출하는 기술이 개발되고 있다. 이러한 시도로 기존 육종의 한계를 벗어날 수 있으며 기존 육종에 의한 作物의 品種改良에 소요되는 시간과 공간 그리고 인력을 획기적으로 단축시킬 수 있다. 예컨대 한 Petri dish에서 培養할 수 있는 細胞의 수는 한 에이커에 심을 수 있는 植物體의 수에 해당하는데, 細胞群에 자연적으로 존재하거나 人爲적으로 유기된 變異細胞들 중 원하는 形質을 가진 細胞만 생존할 수 있도록 배지를 개발하여 이러한 細胞들을 완전 개체로 재생하면 특정 형질을 가진 개체의 量産을 꾀할 수 있다.

한편, 우수한 형질을 가진 기존의 作物이나 새롭게 창출된 作物은 交雜에 의한 形質變化를 방지하고 영양 번식을 하는 作物에 대해서는 實需要者에게 種子繁殖이 주는 繁殖의 용이성을 살릴 수 있도록 體細胞胚發生 (somatic embryogenesis)을 이용한 人工種子の 개발이 필요하다.

體細胞胚發生이란 수정란이 아닌 一般體細胞가 호르몬의 자극에 의해 수정란의 卵割과 같은 과정을 거쳐 成熟한 胚가 되는 현상을 말한다. 몇몇 고등 식물에서는 이 현상이 자연적으로 이루어져서 모체와 유전적으로 완전

히 동일한 種子가 만들어지지만 다른 植物에서는 器內에 유리된 體細胞 혹은 조직을 培養하여 인위적으로 유기시킬 수도 있다. 이 과정을 적절한 생물반응기 내에서 진행되게 하면 다량의 體細胞胚가 적은 공간과 짧은 시간에 생산될 수 있다. 人工種子란 성숙한 體細胞胚에 종피의 역할을 하는 생분해 polymer를 입혀서 種子 대용으로 사용하도록 고안한 것이다.

歐美 技術 先進國에서는 이와같은 體細胞 遺傳學的 技法에 의한 食糧作物의 品種改良과 人工種子 개발이 활발히 진행 중이며 부분적으로 실용화되었거나 혹은 실용화 단계에 있다. 본 研究室에서도 당근을 대상으로 한 건조형 人工種자를 개발 보고한 바 있다. 그러나 현재까지 개발된 人工種자시스템은 쌍자엽 식물 중심이었다. 수 년전부터 여러 선진국에서는 주요 식량작물인 벼, 밀, 옥수수 등의 단자엽을 대상으로 한 人工種자 생산의 경제적 중요성을 새롭게 인식하기 시작하여 이에 대한 연구를 이미 시작하였다. 그러나 우리나라에서는 다른 분야의 遺傳工學의 발전과 병행하여 적극 발전시켜야 함에도 불구하고 극히 부분적인 연구만이 이루어 지고 있다.

## 약어

2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
KIN	Kinetin
MS	Murashige and Skoog (1962)
NAA	1-Naphthaleneacetic acid
N6	Plant culture medium established by Chu et al. (1975)



## 제 2 장 벼의 건조형 인공종자 제조와 발아율 조사

### 제 1 절 서 론

1978년 Murashige는 체세포배를 캡슐에 넣어 인공종자화할 것을 처음 제안하였다. 이러한 제안이 1980년대에 이르러 여러 그룹에 의해 받아들여져서 이 분야에 대한 연구가 시작되었으며 식물 생명공학에서 가장 관심을 모으고 있는 분야중의 하나가 되었다.

Cantliffe 등(1987)은 종래의 fluid drilling 기술을 이용하여 체세포배를 유동상의 겔과 섞어서 직접 포장에 파종하는 방법을 개발하고 있으며, Kitto와 Janick(1985)은 여러개의 체세포배를 Polyoxyethylene oxide에 혼합한 후 건조하여 얇은 웨이퍼로 만들어 인공종자로 개발하고 있다(최근 체세포배를 웨이퍼에 날개로 넣어 만든 인공종자도 발표(Kim and Janick, 1989)된 바 있음). Gray등(1987)은 나출된 체세포배를 그대로 건조하는 방식을 택하고 있다. 선두주자인 Redenbaugh등(1984, 1985)은 체세포배를 수화겔 캡슐에 날개로 넣어 인공종자로 이용하고 있다. 그러나 지금까지 보고된 인공종자는 대부분 쌍자엽 식물의 체세포배를 대상으로 한 것이며 단자엽 식물에서는 F1잡종벼의 묘조원기(Yoshida et al., 1988)와 보리의 소포자 유래 체세포배를 알진산 캡슐로 식위 종자화(Datta and Potrykus, 1989)하였다는 보고가 있다. 한편 본 연구실에서도 Redenbaugh 등의 시스템을 이용하여 당근의 수화겔 인공종자(Jeon et al., 1986)와 건조형 인공종자(Liu et al., 1989; 1992)를 개발한 바 있는데, 특히 건조형의 경우 이제까지 발표된 여러 인공종자와 비교하여 볼 때 형태나 기능면에서 가장 진정 종자에 접근하는 것이었다. 또한 벼의 수화겔 인공종자(1991)는 단자엽 작물에서 인공종자의 생산이 가능함을 시사하였다.

본 연구에서는 벼의 현탁배양세포괴로부터 유도된 체세포배를 Sodium alginate로 캡슐화하여 건조형 인공종자를 만들었으며 무균상태에서 발아율을 조사하고자 하였다.

## 제 2절 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 연구에 사용한 벼 품종은 한국에서 재배되고 있는 Indica형 태백벼를 공시품종으로 사용하였다. 태백벼(*Oryza sativa* L. cv. Taebaeg byeo)는 충청남도 농촌진흥원에서 수분후 14일째의 미성숙종자를 분양받아 사용하였다. 태백벼의 미성숙종자를 70% 알콜에 5분, 25%로 희석된 상업용표백제(유한락스)에 40분 처리하고 멸균수로 3회 수세하여 표면살균 후 해부 현미경하에서 종피를 제거하였다.

### 2. 캘러스 유도 및 증식

미성숙종자를 해부현미경하에서 미성숙배만 분리하여 2 mg/L 2,4-D와 6 mM proline 및 100 mg/L casein hydrolysate가 첨가된 N6 고체배지(agar 0.8%)에 배축이 접하도록 치상하였다. 유도된 캘러스는 동일조건의 배지에서 2주간격으로 계대배양하여 증식시켰다. 캘러스 유도와 증식은 25 C 암조건에서 행하였다.

### 3. 현탁배양

고체배지에서 2- 3개월간 배양된 캘러스 중 희고 단단한 캘러스를 해부현미경하에서 선별하여, 1 mg/L 2,4-D와 6 mM proline 및 100 mg/L casein hydrolysate가 첨가된 N6 액체배지에서 100 rpm, 25 C 암조건의 gyratory shaker에서 현탁배양하였다. 계대배양은 일주일 간격으로 하였으며, 최소한 18개월이상 현탁배양으로 유지, 증식된 세포괴를 인공종자의 제조에 이용하였다.

#### 4. 체세포배 유도

현탁배양으로 18개월 이상 유지중인 Indica형 태백벼의 배양세포괴를 1 mg/L NAA, 5 mg/L kinetin, 5 mg/L ABA, 100 mM nitrogen content, 6 mM proline 및 100 mg/L casein hydrolysate가 첨가된 N6 고체배지에 치상하여 체세포배를 유도 하였다.

#### 5. 건조형 인공종자 제조 및 발아율 조사

전 등(1986)의 방법에 따라 0.1 mg/L ABA가 첨가된 1/2 N6 기본배양액과 첨가되지 않은 1/2 N6 기본배양액에 알진산(sodium alginate: low viscosity: Sigma)을 2.5% 용해하였다. 15분간 멸균처리한 알진산 용액에 체세포배를 1개씩 넣어 50 mM CaCl<sub>2</sub> 용액에 15-20cm 높이에서 떨어뜨려 5-10분간 교반하고 1/2 N6배지에서 잔존의 CaCl<sub>2</sub>를 제거하여 수화형 인공종자를 제조하였다. 멸균된 흡수지로 수화형 인공종자 표면의 잔존한 물기를 제거한 후 직경 5 cm의 페트리디쉬에 10립씩 넣어 7 반복으로 상대습도 24% 이고 시간당 건조속도 0.1-1.5 g인 clean bench에서 water loss가 60, 70, 80, 90%가 되도록 건조시킨 후 1/2 MS배지에 치상하여 25 C 16시간 명조건에서 일주일간 배양한 후 발아율을 조사하였다.

## 제 3절 결 과

체세포배생산배지에서 30일 이상이 경과하여 생산된 체세포배를 현미경 하에서 분리하여 알진산으로 캡슐화한 결과, 수화형 인공종자의 크기는 직경 약 5 mm, 무게 약 140 mg이었으나 건조율이 90%일때 직경 3 mm이하로 나타났다(Fig. 1). ABA첨가시 건조전에 51%의 발아율을 나타내던 인공종자는 건조율이 높아짐에 따라 발아율이 감소하였다.(Fig. 2). 0.1 mg/l ABA가 첨가된 알진산 캡슐로 제조된 인공종자는 ABA 무첨가와 비교하여 건조전에는 2배, 건조후에도 1.3배 이상 높은 발아율을 나타냈다(Fig. 2)). 또한 건조율이 90%일때의 인공종자의 수분함량은 56%로 나타났다(Fig. 3).



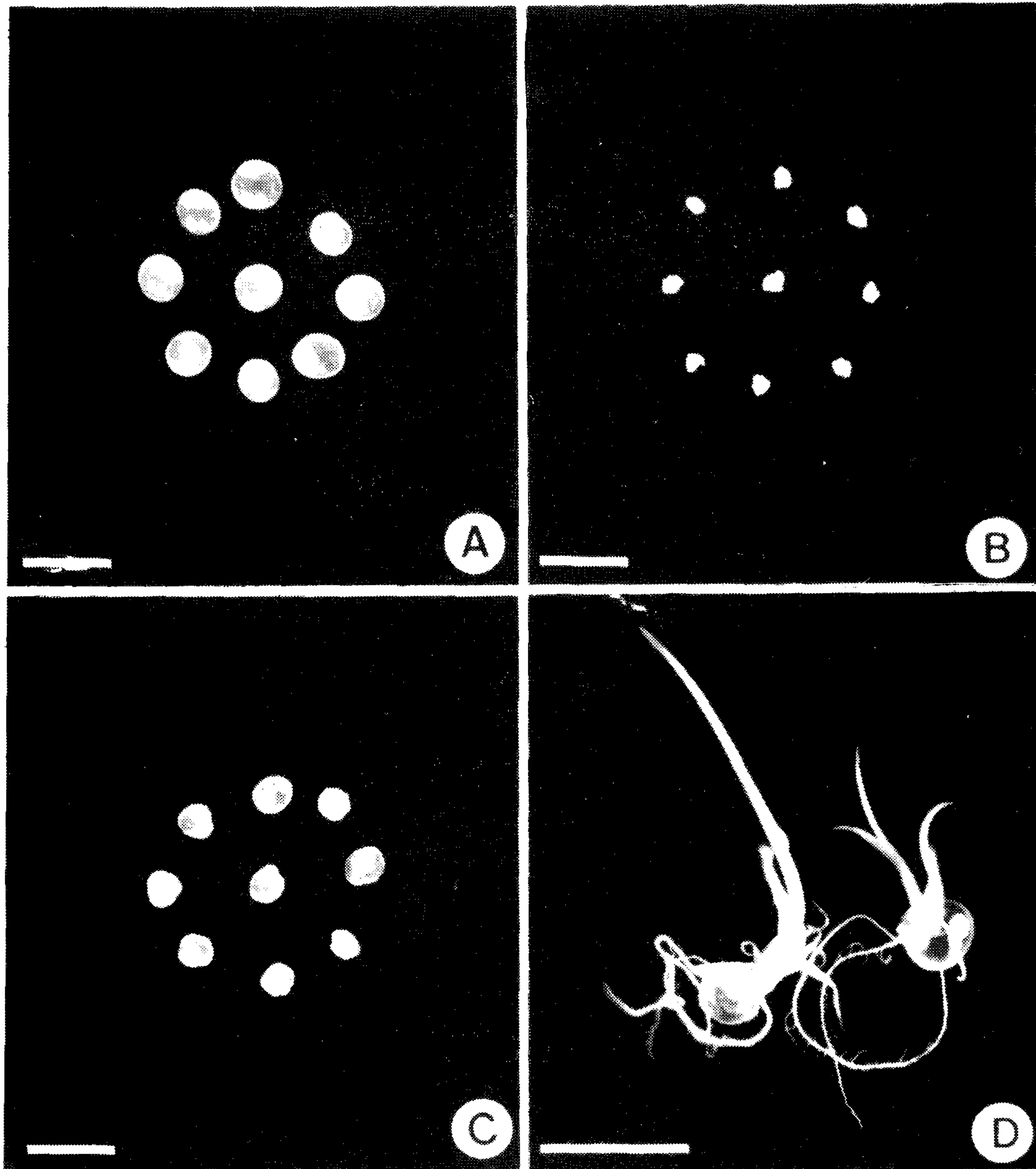


Fig. 1) Encapsulated rice somatic embryos(scale bars = 1 cm)

A) Freshly encapsulated embryos

B) Dehydrated capsules(90% water loss)

C) Rehydrated capsules

D) Germination of encapsulated embryos

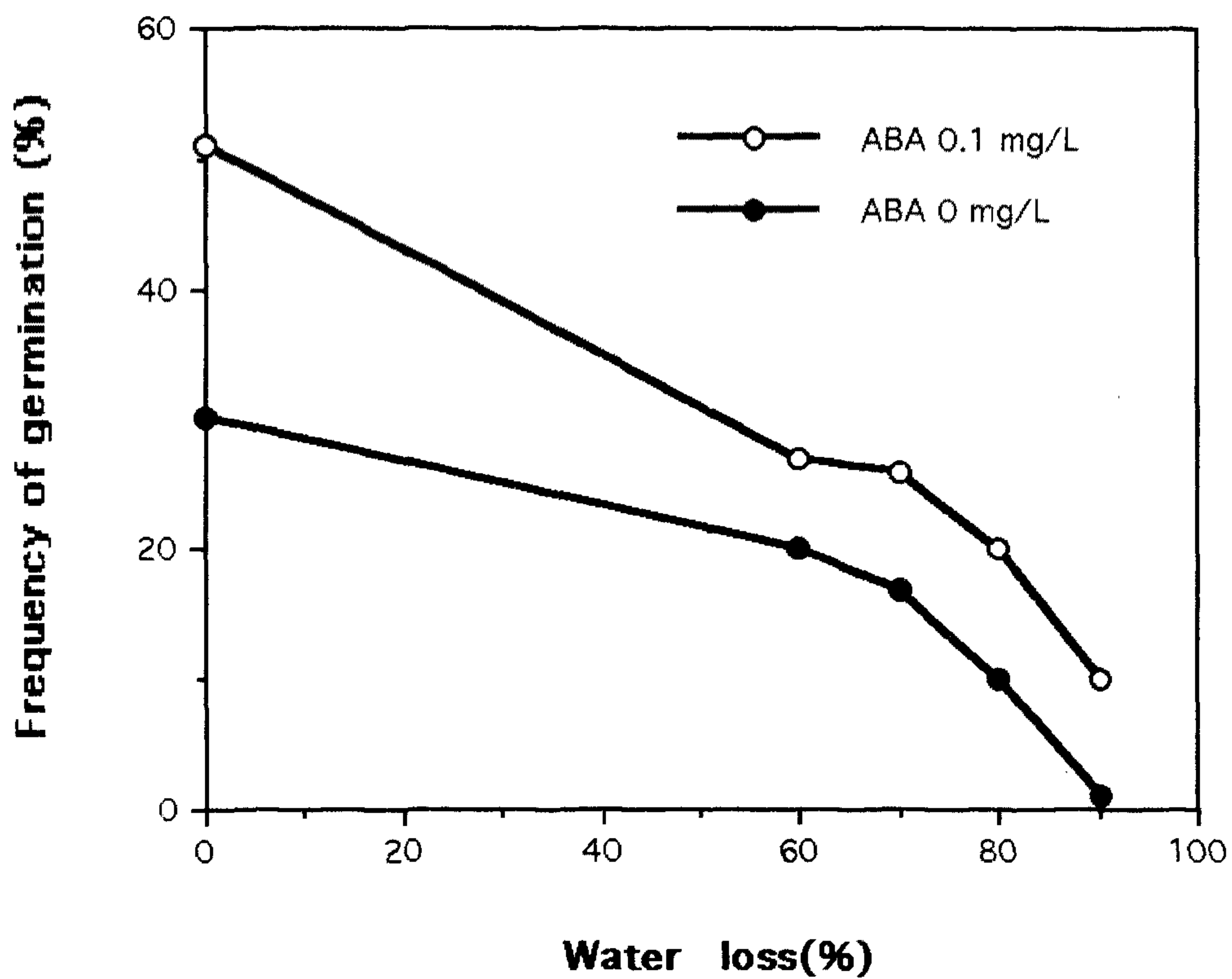


Fig. 2) The frequency of germination from dry-type artificial seeds in rice (*Oryza sativa* L. cv Taebaegbyeon)

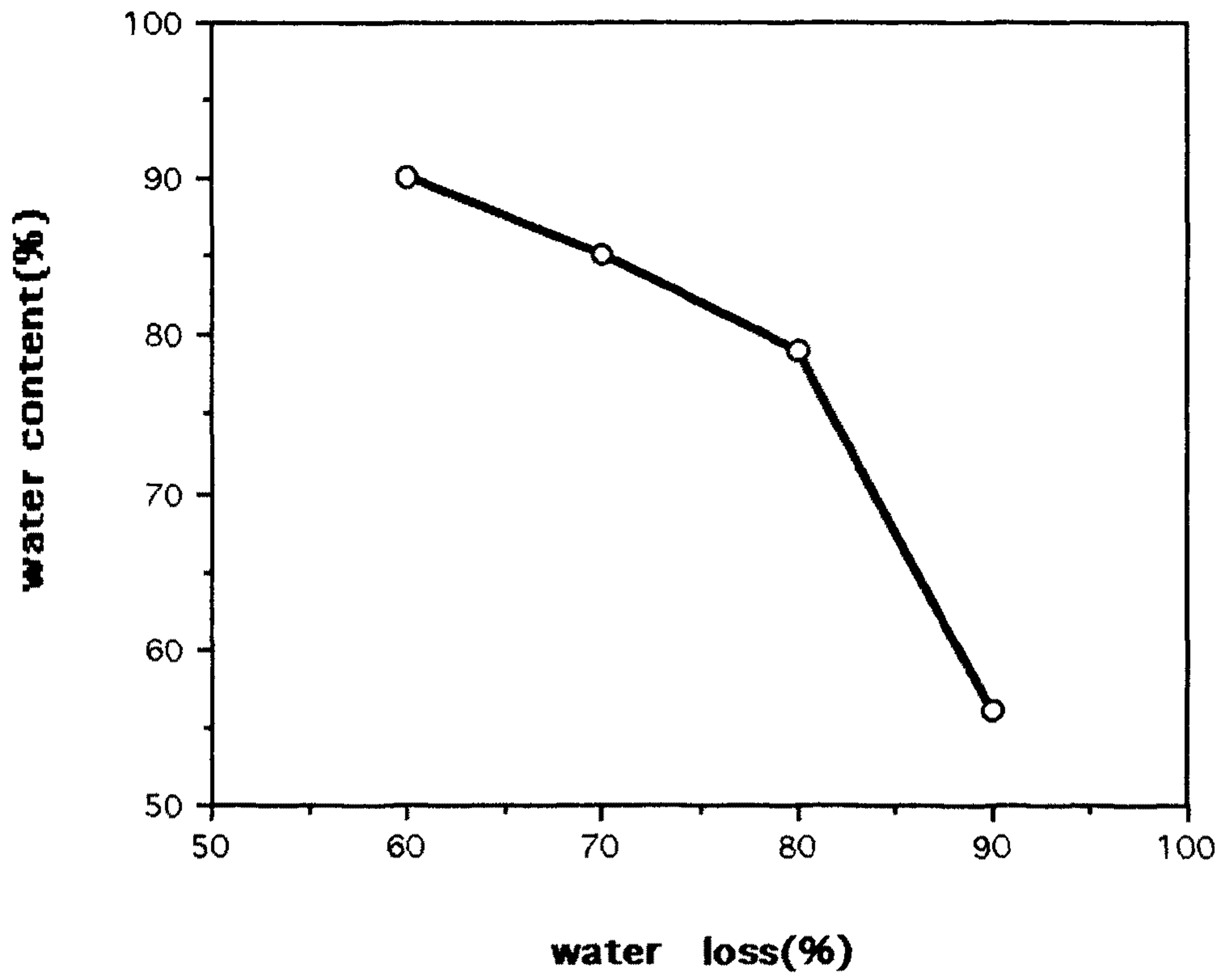


Fig. 3) The water contents of dry-type artificial seeds

## 제 4절 고 찰

지금까지 인공종자에 대한 연구는 주로 쌍자엽 식물을 대상으로 행하여졌다. 그러나 단자엽 작물 특히 곡류에서는 체세포배의 대량생산에 대한 연구결과가 부족하기 때문에 답보상태에 있다. 최근에 와서 보리(*Hordeum vulgare*)의 소포자유래의 체세포배를 이용한 알진산 캡슐결과 최고 80%의 발아율을 나타냈으며(Datta and Potrykus, 1989), 벼에서는 묘조원기법을 이용하여 인공종자화 하였으나 발아율 및 대량생산에 관해서는 언급되지 않았다(Yoshida, 1988). 따라서 지금까지의 곡류에서는 캘러스 및 세포배양계를 통한 체세포배의 대량생산 시스템이 확립되지 않음으로 인해 인공종자에 대한 연구는 미진한 상태였다.

본 연구실에서는 벼의 체세포배를 이용하여 수화형 인공종자를 개발한 바 있으며(1991), 본 연구에서는 18개월 이상 현탁배양계로 유지되면서 안정하게 높은 재분화율을 가지는 태백벼의 배발생세포주로부터 체세포배를 생산하여 건조형 인공종자를 만들었으며, 그 결과 80% 건조율에서 20%의 발아율을 나타냈다(Fig. 2). 또한 ABA를 첨가한 경우는 첨가하지 않은 경우의 1.3배이상의 발아율 향상을 가져왔다. 이러한 결과는 ABA가 체세포배의 osmoticum환경을 높임으로써 건조에 대한 내성을 향상시킨 것으로 볼 수 있을 것이다(Ristic et al., 1992; Dell'aquila 1992). 그러나 건조율과 수분함량을 비교해보면(Fig. 3) 90% 건조율에서도 수분함량이 56%임에도 불구하고 전체적으로 발아율이 저조하였다. 그 이유로는 벼의 체세포배가 직경 2-4 mm로 크기 때문에 캡슐제조시에 캡슐의 한쪽으로 치우친 결과 건조시에 알진산에 의해 보호되지 못하고 직접 건조되었기 때문일 것이다. 따라서 크기가 큰 체세포배의 캡슐화에는 체세포배가 공기중에 직접노출되지 않도록 하는 기술의 개발이 필요할 것이다.

## 제 5절 결 론

체세포배를 사용한 벼의 건조형 인공종자 생산체계를 개발하였다.

1. 체세포배를 1/2 N6배지에 용해한 2.5% 알진산 나트륨(Sigma Type VI)으로 캡슐화 하여 인공종자를 제조하였다.
2. 인공종자를 상대습도 24%이고 시간당 건조속도 0.1-1.5 g인 clean bench에서 water loss 60, 70, 80, 90%로 건조시킨 후 발아시험결과 80%건조율에서 20%의 발아율을 나타냈다.
3. 알진산 용액에 0.1 mg/L ABA를 첨가하여 인공종자를 만든 결과 1.3-2배의 발아율 향상을 나타냈다.



## 제 6절 인용 문헌

- Datta K, Potrykus I (1989) Artificial seeds in barley: encapsulation of microspore-derived embryos. *Theor Appl Genet.* 77:820-824.
- Dell'aquila A (1992) Water uptake and protein synthesis in germinating wheat embryos under the osmotic stress of polyethylene glycol. *Annals Botany* 69:167-171
- Gray DJ, Conger BV Songstad DD (1987) Desiccation quiescent somatic embryos of orchardgrass for use as synthetic seeds. *In Vitro Cellular and Development Biol.* 28:29-38.
- 전재홍, 유장렬, 양승균, 이행순, 정혁, 한문희 (1986) 인공종자 생산의 모델 시스템 개발 : I 체세포배의 알진산에 의한 Encapsulation. *식물조직배양학회지.* 13(2): 119-128
- Kim YH, Janick J (1989) ABA and polyoxencapsulation or high Humidity increases survival of desiccated somatic embryos of celery. *Hort Science.* 24:674-676.
- Kitto SL, Janick J (1985) Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot. *J. Amer. Soc. Hort Sci* 110: 277-282.
- Kitto SL, Janick J (1985) A Citrus embryo assay to screen water-soluble resins as synthetic seed coats. *HortScience* 20:98-100.
- 유장렬, 전재홍, 양승균, 이행순, 정혁, 구정숙 (1989) 인공종자 생산의 모델 시스템 개발 : II 당근(*Daucus carota* L.)의 건조형 인공종자. *식물조직배양학회지.* 16: 165-173.
- Liu JR, Jeon JH, Yang SG, Lee HS, Song NH, Jeong WJ (1992) Dry type of carrot(*Daucus carota* L.) artificial seeds. *Sci Horti* (in press)
- Murashige T (1978) The impact of plant tissue culture on industry and agriculture. In T Thorpe, eds, *Frontiers of Plant Tissue Culture*, The International Association for Plant Tissue Culture 1978, Calgary, Canada pp 22
- Redenbaugh K, Nichol J, Kossler ME, Paasch B (1984) Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production. *In Vitro* 20:256-257(Abstr.).
- Redenbaugh K, Slade D, Viss P, Kossler M (1985) Artificial Seeds : Encapsulation of Somatic Embryo. In F Valertz, eds, *Colloquium on Progress and Prospects in Forest and Crop Biotechnology*, Springer Verlag.

Ristic Z, Gifford DJ, Cass DD (1992) Dehydration, damage to the plasma membrane and thylakoids, and heat-shock proteins in lines of maize differing in endogenous levels of abscisic acid and drought resistance. *J. plant phsiol.* 139:467-473

## 제 3 장 NC-311처리에 따른 벼 현탁배양세포의 단백질 패턴변화

### 제 1절 서 론

식물세포조직배양 기술은 제초제 저항성 개체를 선발하는데 여러가지 잇점을 제공한다. 많은 세포를 빠른 시간에 screening할 수 있고 배양 기간 중에 유전적인 변이를 유발하기도 하여 제초제에 대한 저항성을 지니는 다양한 세포를 선발하게 해준다. Glyphosate(Steinrucken et al., 1986; Dyer et al., 1988), phosphinothricin(Donn et al., 1984), sulfonyleurea (Chaleff and Ray, 1984), imidazolinone(Anderson and Georgeson, 1986; Sexena and King, 1988) 그리고 graminicide(Gronwald et al., 1989)등의 제초제에 대한 저항성세포를 조직배양기법을 이용하여 성공적으로 얻었다. 저항성은 target site효소를 과잉생산하거나 또는 target 효소가 제초제에 의한 피해를 민감하게 받지않게 효소를 변형시킴으로 얻어지게된다.

NC-311은 sulfonyleurea계에 속하는 벼를 위해 새롭게 만들어진 제초제이다. 일년생, 다년생의 광엽 잡초, 사초속식물, barnyard풀에 효과적으로 작용한다. 이 제초제는 뿌리로 흡수되어 식물의 윗부위로 이동된 후 아미노산의 생합성을 차단하여 shoot생장을 억제시킴과 동시에 뿌리의 발달을 지연시켜서 식물을 죽게 만든다.

본 연구의 목적은 NC-311제초제에 대한 저항성을 지닌 벼 배양세포의 선발 일환으로 제초제를 처리한 후 벼 배양세포의 대사과정의 변화를 2차원 전기영동을 실시하여 단백질 수준에서 제초제 내성벼의 생화학적 규명을 시도하였다.

## 제 2절 재료 및 방법

배발생능이 왕성한 태백벼의 현탁배양세포에 세종류의 아미노산인 valine, leucin, isoleucin을 1 mM씩 첨가한 것과 첨가하지 않은 것, 그리고 제초제인 NC-311을 1  $\mu$ M 처리한 것과 처리하지 않은 것의 4처리구를 30 시간 배양한 후 얻어진 벼 현탁배양세포를 단백질 분리를 위한 재료로 사용하였다.

약 500 mg의 시료를 액체질소가 든 막자사발에서 마쇄한 후 1 ml의 TCA acetone(10% trichloroacetic acid + 0.07% mercaptoethanol in acetone)으로 -20°C에서 침윤시켜 12,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하여 얻은 pellet을 다시 0.07% mercaptoethanol + acetone용액에 2번 수세한 후 30분간 건조시켜 단백질 pellet을 얻었다. 이 pellet은 추출완충액(8.5 M urea, 1.6% ampholyte pH 5-8, 0.4% ampholyte pH 3-10, 3% triton, 5% mercaptoethanol)으로 녹여 단백질을 추출하였다.

2차원 겔 전기영동은 O'Farrell의 방법에 따라 준비된 단백질 용액을 IEF(isoelectric focusing) tube gel위에 20  $\mu$ l씩 loading한 다음 양극에 10mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>와 음극에 20 mM NaOH 용액을 채워 400 V에서 14시간, 800 V에서 1시간 동안 분리한 후 tube gel을 꺼내어 SDS sample buffer(10% glycerol, 5% mercaptoethanol, 2.3% SDS, 0.62M Tris-HCl pH 6.8)에 중화하여 SDS slab gel위에 올렸다. SDS slab gel은 전류 25 mA로 약 4-5시간 동안 SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 은염색(silver staining, Bio-Rad제품)을 하여 단백질 spot을 분석하였다.



### 제 3절 결 과 및 고 찰

벼의 현탁배양된 배발생세포를 1  $\mu$ M NC-311로 30시간 처리한 것과 처리하지 않은 것, 아미노산(valine, leucin, isoleucin 각 1 mM)을 첨가한 것과 첨가하지 않은 것들을 4개의 처리구로부터 총단백질을 추출하여 2차원 전기영동을 실시한 결과, 약 400 여개의 spots을 확인 할 수 있었다(Fig. 1). NC-311만 처리한 것으로부터 (32 kDa, pH 5.1), (35 kDa, pH 6.8), (40 kDa, pH 7.3)등의 3개의 polypeptides가 현저히 증가하였으며, 2개의 polypeptides(52 kDa, pH 5.3), (27.5 kDa, pH 6.3)등은 그 양이 감소하였다(Table 1).

제초제에 대한 내성을 지닌 식물세포의 선발은 제초제의 농도를 점차 증가시키면서 살아남은 세포를 선발함으로써 가능해진다. 그러나 식물체와 제초제의 종류에 따라 내성을 지니게 되는 농도가 각기 다르게 나타나며 이런 세포주는 somaclonal variation으로 기인된 것이라 보고된 바 있다(Gronwald et al., 1989).

제초제에 의한 식물생장의 억제는 여러가지 방법에 의해 야기되는데, 아미노산 생합성에 관계된 효소인 ALS(acetolactate synthase)의 활성에 영향을 미치는 sulfonylurea와 imidazolinon이 있다(Chaleff and Mauvais, 1984). 이 두 제초제가 ALS분자와의 반응에는 두가지 설이 있는데 첫째는 ALS분자에 위 두 제초제의 action site가 공동이어서 cross-resistance를 나타내는 경우와 ALS분자에 서로다른 두개의 action site가 존재한다는 연구보고가 있다(Sexena and King, 1988). *Datura*에서 sulfonylurea와 imidazolinon제초제에 대한 내성은 ALS의 형태가 변형되었기 때문에 가능하였다(Sexena and King, 1988). NC-311은 sulfonylurea에 속하는 것으로 이 제초제 역시 벼 배양세포에서 아미노산 생합성의 경로의 효소인 ALS에 영향을 미치게 되어 저항성을 가지게 되는 것으로 본다. ALS의 과잉생산이나



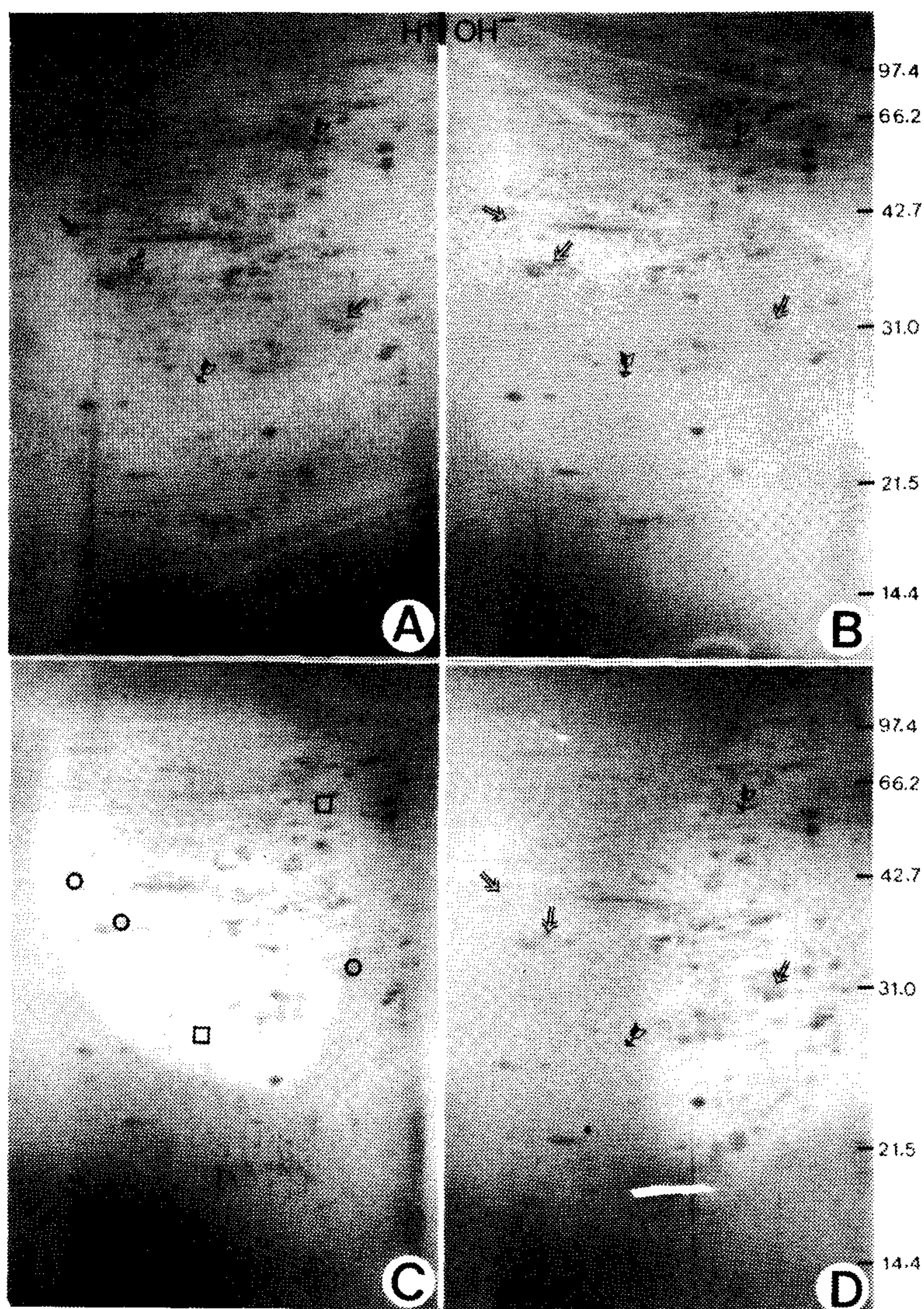


Fig. 1. Two-dimensional gel electrophoresis of the total proteins of rice suspension cultures after 30 hrs of the treatments.

A: The treatment of NC-311 at 1  $\mu$ M; and valine, leucin, and isoleucin at 1 mM each

B: The treatment of valine, leucin, and isoleucin at 1 mM each.

C: The treatment of NC-311 at 1  $\mu$ M.

D: Control

( $\circ$  : Quantitatively increased polypeptides after the treatment of "C";  $\square$  : Polypeptides reduced after the treatment of "C" reduced)



Table 1 Polypeptide spots that show quantitative changes  
after the treatment of NC-311 at 1  $\mu$ M

	MW (kDa)	pH
1	32	5.1
	35	6.8
	40	7.3
2	52.5	5.3
	27.5	6.3

1. polypeptides increased after the treatment of NC-311 at 1  $\mu$ M
2. polypeptides reduced after the treatment of NC-311 at 1  $\mu$ M

ALS가 변형되어 NC-311에 대해 민감하게 반응을 보이지 않는 것으로 사료된다. 또한 *Datura innoxia*의 경우 0.01  $\mu$ M농도에서 제초제에 대한 저항성을 선발(Sexena and King, 1988)할 수 있었던 것에 비해 벼의 현탁배양세포의 경우는 *Datura innoxia*보다 100배 높은 농도인 NC-311을 처리한 후의 단백질 양상의 변화에서 5개정도의 polypeptides가 양적인 증감을 보였는데, 이것이 NC-311과 반응을 하여 변화된 유전자 산물일 것으로 여겨지며 그 단백질의 구조와 기능에 대해서는 계속 연구되어야 할 것이다.

## 제 4절 결 론

벼의 현탁배양된 배발생세포를 1  $\mu$ M NC-311로 30시간 처리한 것과 처리하지 않은 것, 이때 아미노산(valine, leucin, isoleucin 각 1 mM)을 첨가한 것과 첨가하지 않은 것 등의 4개의 처리구로 부터 총단백질을 추출하여 이차원전기영동법으로 비교한 결과 NC-311만 처리한 것으로부터 (32 kDa, pH 5.1), (35 kDa, pH 6.8), (40 kDa, pH 7.3)등의 3개의 polypeptides가 현저히 증가하였으며, 2개의 polypeptides(52 kDa, pH 5.3), (27.5 kDa, pH 6.3)등은 그 양이 감소하였다. 이 spots이 NC-311과 특이적으로 작용하는 gene products인 것으로 추측된다.

## 제 5절 인용문헌

- O'Farrel PH (1975) High resolutional two-dimensional electrophoresis of proteins. J Bio Chem 250 : 4007-4021
- Steinrucken HC, Schulz A, Amrhein N, Porter CA, Fraley RT (1986) Overproduction of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in a glyphosate-tolerant *Petunia hybrida* cell line. Archives of Biochemistry and Biophysics 244 : 169-178
- Dyer WE, Weller SC, Bressan RA, Herrmann KM (1988) Glyphosate tolerance in tobacco(*Nicotiana tabacum* L.) Plant Physiol 88 : 661-666
- Donn G, Tischer E, Simth JA, Goodman HM (1984) Herbicide-resistant alfalfa cells: An example of gene amplification in plants. J of Molecular and Applied Genetics 2 : 621-635
- Chaleff RA, Ray TB (1984) Herbicide-resistant mutants from tobacco cell cultures. Science 223 : 1148-1151
- Anderson PC, Georgeson M (1986) Selection of an imidazolinone tolerant mutant of corn. In: VI International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Somers DA, Gengenbach BG, Biesboer DD, Hackett WP, Green CE (Ed) International Association for Plant Tissue Culture p 437
- Saxena PK, King J (1988) Herbicide resistance in *Datura innoxia* : Cross-resistance of sulfonyurea-resistant cell lines to imidazolinones. Plant Physiol 86 : 863-867
- Gronwald JW, Parker WB, Somers DA, Wyse DL, Gengenbach BG (1989) Selection for tolerance to graminicide herbicide in maize tissue culture. Brighton crop protection Conferance-Weeds. 1217-1224.

## 제 4 장 벼의 體細胞胚發生을 통한 再分化 植物의 變異調查

擔當者 : 嶺南作物試驗場 農業研究官 金七龍, 高在哲

### 제 1 절 서 론

1970년대의 植物組織培養學의 발전과 더불어 1980년대에 들어서 기장, 수수, 벼 小麥, 옥수수 등에서 somatic embryo가 형성된다는 보고가 많은 실정이다. 植物細胞를 집단으로 무한정으로 증식시킨 후 각 세포에서 胚發生을 시켜 종자가 되어지면 이들 胚에 人工으로 만든 종피를 씌워서 시험관에서 배양된 세포에서 人爲操作에 의해 완전한 人工種子가 만들어진다. 그러나 植物細胞나 組織을 기내에서 배양하는 과정 중에서 발생하는 體細胞變異는 大量急速 증식을 위한 組織培養에서 집단의 遺傳的 組成을 변화시켜 집단에서 상이한 個體가 출현한다는 것을 組織培養의 초기부터 알려져 왔다. 禾本科 作物인 벼의 경우에서도 培養된 callus로부터 再分化된 植物體 중에서 형태적으로 母植物과 相異한 個體가 출현된다는 사실은 이미 60년대 후반에 보고된바 있다. 근년까지의 研究結果에 의하면 벼의 藥이나 花粉 培養에서 뿐만 아니라 原型質體 培養에서도 培地내에 mutagen의 첨가 없이도 이러한 變異體가 비교적 높게 출현된다는 것이 알려져 있다. 變異體의 遺傳的 특성이나 變異發生과 기구구명에 대해서는 앞으로 연구되어야 할 과제가 많으며 再分化된 植物體의 활용방안에 대한 연구가 체계적으로 수행되어야 하겠다.

본 연구는 벼의 玄米 胚로부터 유래된 callus 再분화와 植物體에 대한 變異性을 조사하여 人工種子 개발의 기초자료를 얻고자 再分化 個體에 대한 주요 作物學的 特性和 이들의 變異性을 조사 분석하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.



## 제 2절 재료 및 방법

본 研究는 遺傳工學研究所 植物細胞生物學 研究室에서 太白벼의 玄米 胚로부터 유래된 callus에서 再分化된 植物體를 분양받아 공시재료로 이용하였다. 植物體 分化를 위한 再分化 培地로는 N6培地에 NAA 1mg/l, kinetine 5mg/l, nitrogen 100mM가 첨가된 培地(T1)와 T1 基本培地에 ABA 1mg/l가 첨가된 培地(T2)를 사용하였다. 분양받은 植物體는 水耕液에서 19일정도 충분히 馴化시킨 다음 생육이 양호한 個體를 1991년 12월 19일에 嶺南作物 試驗場 冬季溫室 내에서 15x15cm로 주당 1본씩 移秧하였으며 太白벼를 標準品種으로 栽培하였고 施肥量은 N-P205-K20를 5-3-3kg/10a 수준으로 하여 磷酸質 肥料와 加里肥料는 全量期肥로 하였으며 窒素肥料는 期肥 80%, 移秧후 35일 追肥 20%를 2회 分施하였으며 그 외 栽培管理는 嶺南作物試驗場 溫室 栽培法에 준하였다. 出穗期는 農村振興廳 農事試驗研究 調查基準<sup>6)</sup>에 따라 조사하였고 稈長, 穗長, 穗數, 穗當粒數 및 稔實率은 主當 最長稈을 선택하여 조사하였다. 조사형질 중 R1 집단 變異體의 出現率은 모품종인 太白벼의 分散, 信賴限界를 벗어난 것을 變異體로 구분하였다.

가. 供試品種 : 太白벼

나. 再分化 基本培地

- T1 : N6 + 1mg/l NAA + 5mg/l kinetine + 100mM nitrogen

- T2 : T1 基本培地 + 1mg/l ABA

- T3 : 太白벼 (母品種)

다. 植物體 馴化

- 馴化期間 : 12월 1日 - 19日 (19日間)

- 馴化수경액 : 요시다 수경액



라. 栽培法

- 試驗場所 : 嶺南作物試驗場 世代促進 溫室
- 試驗期間 : 1991. 11. 1 - 1992. 5. 31
- 移 秧 期 : 1991年 12月 19日
- 栽植密度 : 15 x 15cm
- 株當苗數 : 1本
- 施肥量 (kg/10a) : N - P205 - K20 = 5 - 3 - 3  
P.K 全량기비 , N : 기비(80%) - 추비(20%)
- 追肥 施用時期 : 移秧후 35日

## 제 3절 결 과

統一型 品種인 "太白벼" 배 유래의 callus로 부터 再分化 基本培地를 달리한 T1 및 T2 처리에서 再分化된 植物體 R1 개체를 水耕液 中에서 馴化 시킨후 冬季에 嶺南作物試驗場 世代促進 溫室에서 栽培하면서 出穗期調査와 成熟期에 稈長을 비롯한 穗長, 穗數, 穗當粒數, 稔實率 등의 주요 形質別 變異性을 모 품종인 太白벼와 비교 검토하면서 조사한 결과는 表 1 및 그림 1에서 보는 바와 같다. 出穗日數는 재분화 식물인 T1 집단에서 가장 긴 118 일 부터 가장 짧은 85일 까지 分布되었으며 平均值는 93.1cm 였고 모품종인 太白벼는 96-90cm 범위였으며 平均值는 93.1cm로 再分化 식물집단의 平均值 와 같았으나 早晚生 개체의 出現頻度가 높아 出穗日數의 변이폭은 太白벼보 다 크게 나타났으며 再分化 처리간 비교에서 T1 집단의 平均出穗日數는 모 품종과 비슷하며 T2 집단에서는 94.2일로 모품종보다 1일정도 낮은 것으로 나타났다. 稈長은 모품종이 最高 48.2cm 에서 最低 32.5cm에 分布 되었으며 平均值는 41.3cm로 나타났으나 再分化 식물체 집단의 稈長은 最長 45.8cm 에서 最短 15.0cm에 分布하였으며 平均 32cm 로 모품종보다 9cm 정도 짧았 으며 모품종 보다 단간화된 개체의 出現頻度는 T1 집단에서 31% 에 해당하는 60개체가 T2 집단에서는 35%에 해당하는 72개체가 短稈 방향으로 나타났 다. 再分化 식물집단의 穗長은 最大 26cm 에서 最小7.2cm 에 分布하였으며 穗長이 20cm인 太白벼보다 6cm 나 더 큰 장수개체가 2개체 출현되었으며 변 이 정도는 모품종보다 짧은 것과 긴것이 약간씩 발현되었으나 대부분의 개 체는 모품종과 비슷한 경향이였다. 穗數는 再分化 식물집단에서 1.0-11.0개 까지 分布하였으며 전체의 약 70% 정도가 4-6개에 해당하였고 再分化 집단 의 변이 정도는 모품종과 비슷한 경향이였다. 穗當粒數에서는 다른 형질에 비해 변이의 폭이 넓은 편으로 再分化 식물집단은 最小 12립에서 最大 103 립 까지 分布하였으며 모품종은 52-105립 까지 이며 平均值도 모품종 80.8 개에 비해 T1 집단에서 61개 T2 집단에서 58.6개로 再分化 식물 집단이 20-22개 적게 나타났고 평균 穗當粒數는 줄어 드는 경향이였으며 변이정도

는 모품종보다 적은 방향으로 出現頻度가 높아 穗當粒數의 변이폭은 太白벼보다 적은 방향으로 크게 나타났다. 稔實比率에 있어서는 모품종인 太白벼는 대부분의 개체가 74-95%의 稔實率을 나타내었으나 再分化 개체 집단에서는 50% 以下の 낮은 稔實率을 보여 不稔率이 50% 以上인 것을 稔性의 변이체로 분류할때 再分化 식물집단의 모든개체는 임성 변이체로 분류되며 不稔개체의 出現頻度에서도 T1 집단에서 27%, T2 집단에서는 40%에 해당하는 81개체가 완전 不稔 개체로 나타났다. 한편 表 1에서 변이 계수를 모품종과 비교 했을때 변이계수가 높게 나타난 形質은 稔實比率, 穗當粒數, 穗數, 稈長, 穗長, 出穗日穗 순으로 높게 나타났다. 공시된 再分化 식물집단의 出穗期 등 7가지 形質에 대한 변이성의 發生頻度を 조사했을때(表 3) 조사된 形質중 稔實率에서 가장 변이가 심하여 모품종인 太白벼보다 모두 낮은 稔實率을 나타내었으며 다음으로 변이개체 出現率이 높은 形質은 稈長으로 變異個體 出現頻度は 35.5%로 72 개체가 短稈 혹은 長稈으로 나타났고 出穗日數에서는 27.6%에 해당하는 56개체가 모품종보다 早晚生으로 출수하였으며 穗數에서는 變異가 적은것으로 나타났다. 한편 再分化 기본배지를 달리한 T1 및 T2 배지에서 再分化된 식물집단의 변이개체출현 빈도는 T1 배지보다 ABA가 첨가된 T2 배지에서 변이체 발생율이 약간 많게 나타나는 경향이였다.

표 1. 體細胞胚發生을 통한 R1 식물체 主要 形質比較

區 分	出 穗 日 數 (日)			稈 長 (cm)		
	T1	T2	太白벼	T1	T2	太白벼
最 大	118	117	96	45.8	43.2	48.2
最 小	85	88	90	20.0	15.0	32.5
平 均	93.1	94.2	93.1	32.3	31.8	41.3
分 散	4.0	3.2	1.9	5.0	5.7	3.5
CV (%)	4.3	3.4	2.0	15.4	17.9	8.6

區 分	稈 長 (cm)			穗 數 (個)		
	T1	T2	太白벼	T1	T2	太白벼
最 大	26.2	26.4	20.2	9.0	11.0	9.0
最 小	9.4	7.2	14.5	1.0	1.0	2.0
平 均	16.5	15.9	17.0	4.3	4.5	5.5
分 散	2.5	2.6	2.2	1.7	2.1	1.5
CV (%)	15.3	16.2	13.2	39.3	45.8	27.8

區 分	穗 當 粒 數 (個)			稈 實 比 率 (%)		
	T1	T2	太白벼	T1	T2	太白벼
最 大	103	102	105	47	46	95
最 小	13	12	52	0	0	74
平 均	61.0	58.6	80.8	15.6	15.3	86.5
分 散	14.7	14.6	13.9	11.1	10.8	6.1
CV (%)	24.1	24.9	17.2	71.1	70.6	7.0

T1 : 재분화 기본배지 (N6 + 1 mg/l NAA + 5 mg/l kinetine + 100 m M nitrogen)

T2 : T1 기본배지 + 1 mg/l ABA



표 2. 벼 體細胞胚로부터 再分化된 R1 植物에서의 主要形質 變異體의 出現

變異形質	處 理	系 統 數	出 現 率 <sup>c)</sup> (%)
出 穗 期	T1 a)	63	32.6
	T2 b)	56	27.6
稈 長	T1	61	31.6
	T2	72	35.5
穗 長	T1	15	7.8
	T2	25	12.3
穗 數	T1	6	3.1
	T2	12	5.9
穗當粒數	T1	20	10.4
	T2	42	20.7
稈 實 率	T1	193	100
	T2	203	100
計	T1	193	100
	T2	203	100

a) T1 : 再分化 基本培地 N6 + 1mg/l NAA + 5mg/l kinetin + 100 mM nitrogen

b) T2 : T1 基本培地 + 1mg/l ABA

c) 出現率은 R1 集團의 變異中 母品種인 太白벼의 分散 信賴限界를 벗어난 個體 數의 比率

## 제 4 절 고 찰

禾本科 作物의 callus 培養에서 再分化된 식물체에 대한 형질변이 조사 연구는 Oono(1983, 1984), Sun(1983), Zhao(1988), Son(1991), 밀에서 Larkin(1984, 1986), Maddock(1986), Chen(1987), 보리에서 Singh(1986)등에 의해서 보고된 바 있으며 식물세포를 기내에서 培養하는 과정에서 발생하는 體細胞 變異는 유전적 순도를 유지하는 대량 급속증식을 위한 組織培養에서 유전적 조성을 변화 시킨다는 점에서 불리한 요소로 취급되어져 왔으나 벼에서 培養된 callus로부터 再分化된 植物體에는 형태적으로 母植物과 유사한 개체가 대부분이나 相異한 개체도 발생한다는 것을 Nishi(1968) 등이 보고한 바 있다. 보고자들은 callus로부터 再分化된 R1 개체로부터 채종된 R2 세대를 포장에 계통재배하여 주요 형질별 특성을 외부 형태적으로 모품종과 비교검토 한 결과가 많았으며 R1의 특성을 집단별로 조사 보고한 것은 미미한 것으로 이는 R1 개체의 再分化 시기가 일정하지 않아 집단의 동시 비교가 곤란한데 기인된것 같다. R2 집단에 대한 보고에서 Oono(1983, 1984)는 벼 callus 培養에서 再分化된 계통을 栽培하여 變異性을 조사한바 조사된 6가지 형질에서 모품종과 같은 正常계통은 28% 이었으며, Sun(1983)등은 인디카 callus 로 부터 再分化된 후대계통에 대한 出穗期, 稔實率 등 6가지 형질을 조사한바 전체의 24% 만이 모품종과 같은 계통이었으며 形質別 變異의 폭은 품종에 따라 多少間의 차이가 있다고 하였고 Son(1991)은 "秋靑벼" 培養에서 再分化된 196 계통을 圃場에 계통재배하면서 出穗期등 6형질의 변이양상을 조사한바 외부형태적으로 모품종과 유사한 계통은 전체의 24%에 불과하였고 50%는 몇가지 형질에서 계통간 변이를 보이면서 계통내 분리는 인정되지 않았다고 하였다. 본실험에서는 R1 집단을 대상으로 冬季 온실내에서 出穗期, 稈長, 穗長, 穗數, 穗當粒數, 稔實率 등에 대한 變異性 정도를 조사한바 형질에 따라 변이성의 정도는 외부형태적으로 稔實率을 제외한 형질에서 모품종과 차이가 적은 개체가 많았으나 稔實率에서는 0-47%의 분포를 보여 모품종인 太白벼의 平均 稔實率 86% 보다



낮은 稔實率을 보여 Oono(1983, 1984), Son(1991)등의 결과와 相異한 것은 callus의 培養條件 등이 다른데서 비롯된 결과로 생각된다.

“太白벼”의 R1 집단을 대상으로 조사된 각 형질별 變異體의 발생 頻度에서 (表2) 出穗期 變異를 보인 개체가 T1 처리에서 32.6% T2처리에서 27.6% 이며, 稈長에서 變異를 보인 개체는 T2 처리에서 35.5% 해당하는 72 개체가 變異性을 나타내었고 再分化 培地에 따라 穗長의 變利率 分布는 7.8-12.3% 穗當粒數에서의 變利率은 10.4-20.7% 의 分布를 보였다. 이러한 결과는 出穗期, 稈長, 穗當粒數 등에서 變異體의 발생 빈도 分布는 Oono(1983, 1984) 와 Sun(1983)등의 연구결과와 유사한 경향이였다. Zhao(1988)등은 벼의 callus 培養에서 再分化된 R2 집단의 變異性을 조사한바 初長은 짧아지고, 穗數는 증가하였으며, Sun(1983)등도 再分化된 체세포 變異體는 初長은 짧아지고 有效경수는 증가하였으며 出穗期和 稔實率에서 變異係數는 높지만 그 平均值는 모품종과 같은 경향이였다고 하였으며 Son(1991)등의 결과에서도 秋靑벼 체세포에서 再分化된 집단의 형질별 平均值를 모품종과 비교했을 때 稈長과 穗長은 짧아지고 株當穗數는 감소하였으며 穗當粒數는 증가하였으나 出穗期는 큰차이가 없었다고 하였다. 벼 체세포 배로부터 再分化된 R1 집단의 평균 稈長은 짧아지고 株當穗數와 穗當粒數는 감소하였으며 出穗期和 穗長은 모품종과 비슷하였으며 이러한 결과는 Son(1991) 등의 결과와 비슷한 경향이였다. 이상의 연구결과에서 “太白벼” 의 배로부터 再分化된 再分化 식물집단(R1) 에서도 형질에 따라 모품종과 相異한 개체가 出穗期和 稈長에서 다소 높은 빈도로 출현되었고 稔實率에서는 불임比率이 높게 나타났으므로 이러한 變異의 발생 원인이나 그 기구를 밝히기 위해서는 그들의 후대들을 夏季에 R1 집단과 R2 집단을 竝行栽培하여 조사하고 시간을 두고서 여러세대 경과 시키면서 주요특성에 대한 遺傳양식을 밝혀 나가야 될 것으로 생각된다.

## 제 6절 인용문헌

- Chen THH, Lazar MD, Scoles GJ, Gusta LV, and Kartha KK (1987) Somaclonal variation in a population of winter wheat. *J Plant Phyiol* 130:27-36.
- Larkin PJ (1986) Case histories of genetic variability in vitro wheat and triticale, In IK Vasil(ed.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants Vol. 3*, Academic Press, Orlando, Florida, pp.367-383.
- Larkin PJ, Ryan SA, Brettel RIS, and Scowcroft WR (1984) Heritable somaclonal variation in wheat. *Theor Appl Genet* 67:443-455.
- Maddock SE, Semple JT (1986) Field assessment of somaclonal variation in wheat. *J Exp Bot* 37:1065-1078.
- Nishi T, Yamada Y, and Takahashi E (1968) Organ redifferentiation and plant restoration in rice callus. *Nature* 219:508-509.
- 농사시험연구 조사기준 (1983) 농촌진흥청 34-66.
- Oono K (1983) Genetic variability in rice plants regenerated from cell culture, In *Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement*. Science Press, Beijing/Int. Rice Res. Inst., P.O.Box 933, Manila, Philippines, pp.95-104.
- Oono K (1984) Tissue culture and genetic engineering in rice, In S. Tsunoda and N. Takahashi(eds.), *Biology of Rice*, Japan Sci, Soc. Press, Tokyo/Elsevier, Amsterdam, pp339-358.
- Singh RJ (1986) Chromosomal variation in immature embryo derived calluses of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 72:710-716.
- Son JK, Kwon OH, Cheong ST, and Rhee IK (1991) Variation of Agronomic Characters in regenerated Plants from Callus Culture of rice. *Korea J Breed* 23(3):181-187.
- Sun ZX, Zhao CZ, Zheng KL, Qi XF, and Fu YP (1983) Somaclonal genetics of rice, *Oryza sativa* L. *Theor Appl Genet* 67:67-73.
- Zhao CZ, Zheng KL, Sun ZX, and Qi XF (1988) Somaclonal variation and rice improvement, In IRRI(eds.), *Genetic Manipulation in Crops, Natural Resources and the Environment Series, Vol. 22*, IRRI, P.O.Box 933, Manila, Philippines, pp115-116.

여 백



# 同位酵素分析에 의한 옥수수 胚乳의 遺傳子型 확인

崔鳳鎭 · 李喜鳳

## Confirmation of Dosage Effects by Electrophoresis in Maize

Choe, B.H. and H.B. Lee

### Abstract

Isoelectric focusing technique was applied to confirm the genotypes of maize endosperm and embryo. The isozyme analyzed was esterase. The genotypes of maize endosperm were SuSuSu (dose=0), SuSusu (dose=1), Sususu (dose=2), sususu (dose=3), WxWxWx, WxWxwx, Wxwxwx, wxwxwx, ShShSh, ShShsh, Shshsh and shshsh. The genotypes of embryo used were O2-(either normal or heterozygote for opaque-2 gene), o2o2, Su-, susu, Wx-, wxwx, Sh-, shsh. From the analysis of maize endosperm, it was observed that each genotype(dosage effect) had very unique isozyme(esterase) bands. The isozymic bands were not only different among the same allelic genes, but also they were different between non-allelic genes. In general, su, wx and sh genes showed recessive dosage effects in the esterase activities.

Secondly the genotypes of maize embryo showed different isozymic band patterns all responding to their normal or recessive genotypes.

### 結 論

옥수수의 交雜種 育成에 필요한 自殖系統의 選拔은 주로 組合能力 檢定에 의존하지 만 自殖系統의 系統育成 과정중에는 주로 系統의 植物學的 表現型에 의존할 때가 많다. 예로써 옥수수의 葉型이나 雄穗出現期, 耐病性 등과 같은것은 遺傳力이 높아 表現型에 의한 選拔을 하며 그 效果 또한 크다. 그러나 表現型에 의한 選拔은 遺傳子型에 의한 選拔보다 效果가 크지 못하다. 따라서 육종가는 가능한 한 植物의 遺傳子型에 의한 選拔을 하려고 노력하고 있다.

그러나 自殖系統 육성과정중 옥수수 植物의 遺傳的 特性을 확인하는 것은 특별한 質的形質(예. 葉色, 葉型, 雄穗出現期)에 대해서는 비교적 쉽지만 量的形質에 대해서는 어려운데 특히 옥수수 粒의 遺傳的 特性(單因자의 경우 遺傳子型)을 확인하는 것은 쉽지 않다. Schwartz 8)은 옥수수粒의 胚乳는 3N으로 dosage효과가 있을것으로 보고한 바 있다. 이와같이 옥수수 胚乳에 대해 한개의 遺傳因子가 關與하는 경우 적어도 3가지 遺傳子型이 있을 수 있으므로 이들의 遺傳子型을 구분하기는 쉽지않다. 따라서 이와같은 胚乳의 遺傳子型을 알기 위해서는 戻交配를 통해 分離하는 遺傳子型을 알고자 할 때와 또는 檢定交配에 의해 植物體의 遺傳子型을 알고자 할 때 매우 필요하다. 과거의 옥수수 育種에서는 植物體나 胚乳의 遺傳子型을 알고자 할 때에는 흔히 檢定交配 方法에 의존하였다. 그러기 위해서는 반드시 두 兩親을 播種한 다음 交配하여야 하기 때문에 최소한 1년이 소요되고 포장에서의 檢定交配 역시 쉽지가 않다. 따라서 植物體나 옥수수 胚乳의 遺傳子型을 보다 經濟的이고 效果的으로 알 수 있는 方法이 필요하다. 과거 옥수수의 植物體나 옥수수 粒의 遺傳的 特性을 알기위한 方法으로 電氣泳動分析法을 이용하여 왔다. 1, 2, 4) 그러나 電氣泳動分析에서는 단순히 植物體의 遺傳的 特性이 表現型과 어떤 관계가 있는지를 알고자 한 것이 아니라 단순히 植物體의 同位酵素 패턴을 통해 雜種後代에서의 遺傳的 分離樣相을 비롯한 옥수수 生育段階別 植物體 部位의 酵素의 活性間의 관계를 나타냈기 때문에 실제로 옥수수의 育種에 이용하는데는 어려운 점이 있었다. 3, 5, 7) 그러나 최근 들어 電氣泳動에서 얻어진 有用遺傳子인 同位酵素를 이용한 새로운 育種技術인 RFLP기법이 개발되어 育種方法에 크게 기여하게 되었다. 이와같은 育種成果의 效率를 높이기 위해서는 植物體내의 有用遺傳因자의 存在가 확인 되었을 경우에 가능하다.

따라서 本 研究에서는 기히 遺傳子의 조성과 表現型이 알려진 옥수수粒을 이용하여 이들이 보여주는 電氣泳動(IEF)적 特性을 同位酵素因子에 의한 밴드유형을 비교, 분석하고자 하였다. 2, 4) 本 研究에서 얻어진 基礎情報은 실제로 옥수수의 育種過程이나 胚培養에서 얻어진 植物體의 遺傳的 特性을 아는데 應用할 수 있을것으로 믿어진다. 세부적인 研究目的으로는 첫째로 胚乳의 dosage 별 둘째로 효과에 대한 分析과 遺傳子型 별 IEF의 밴드 特性을 확인하는데 있다.

## 材 料 및 方 法

本 實驗의 첫번째 研究目的인 胚乳의 dosage별 밴드의 差異를 구명하기 위하여 공시된 재료는 遺傳子型이 알려진 다음의 材料를 利用하였다.

두번째 研究目的을 위해서는 위의 각 遺傳因子(sugary, waxy, opaque-2, shrunken-2)에 대하여 同質接合體인 遺傳因子型和 정상적인 (normal) 表現型을 가지는 옥수수粒으로서 Wx- 對 wxwx, Su- 對 susu, Sh- 對 shsh을 이용하였으며 opaque-2 因子에 대해 O<sub>2</sub>- 인것과 o<sub>2</sub>o<sub>2</sub>인 것을 추가하였다.



Genotype	Phenotype	Degree of dose
WxWxWx	normal	dose 0
WxWxwx	normal	dose 1
Wxwxwx	normal	dose 2
wxwxwx	waxy	dose 3
-----		
SuSuSu	normal	dose 0
SuSusu	normal	dose 1
Sususu	normal	dose 2
sususu	sugary	dose 3
-----		
ShShSh	normal	dose 0
ShShsh	normal	dose 1
Shshsh	normal	dose 2
shshsh	shrunken	dose 3

以上과 같이 供試된 옥수수粒은 모두 胚를 분리한 후 胚乳만을 60 mesh로 粉碎하여 酵素抽出 buffer(ampholyte 40%(1) + 증류수(15))로 抽出한 다음 遠心分離(5,000 rpm 에서 20분)한 후 上등액에 glycerol을 첨가한 다음 電氣泳動장치(model:SE 250 Mighty Small II;HOEFER Co.)에서 실시하였다. gel은 ampholyte pH 3.5 - 10를 사용하였고, gel의 조성은 30%의 acrylamide stock(acrylamide 29.2g + Bis 0.8g)에 ampholyte 0.72 ml, TEMED 23 micro liter, 10%-ammonium persulphate 50 micro liter 과 50%의 glycerol 1.2 mili liter를 혼합하여 4°C에서 24시간 경과 시킨 후 사용하였다. chamber 내 buffer 용액은 +극에 0.1M - H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 그리고 -극에 0.1M -NaOH를 사용하였다. 泳動時間은 10-15mA(약 70V)에서 시작하여 암페어(A)가 일정할 때 까지 약 4-5시간정도 계속하였고 냉각수로 chamber를 저온 유지하였다. 電氣泳動 후 esterase 染色은 0.1M의 phosphate buffer 용액에 fast blue RR 염 0.1g을 용해하여 여과 후 알파 naphthyl acetate(1%)을 첨가하여 37°C 에서 약 1시간 동안 染色하였다. 각 試料에 대한 band의 패턴과 관련된 同位酵素의 活性度を 比較하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 對立因子內 dosage 效果比較

#### 가. sugary 遺傳因子

Su因子와 su因자의 組合에 의해서 가능한 4가지 遺傳子型의 胚乳가 보여주는 esterase의 밴드패턴을 보면 그림 1과 같다. 총 9개의 밴드가운데 su의 dose가 0인 SuSuSu와 dose가 1인 SuSusu인 胚乳는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7번 밴드가 결여(null) 되어 고른 pH범위에서 동위효소가 존재하였고 dose가 2인 Sususu인것은 1번, 2번, 5번 및 9번 위치에서 밴드를 보여주고 있다.



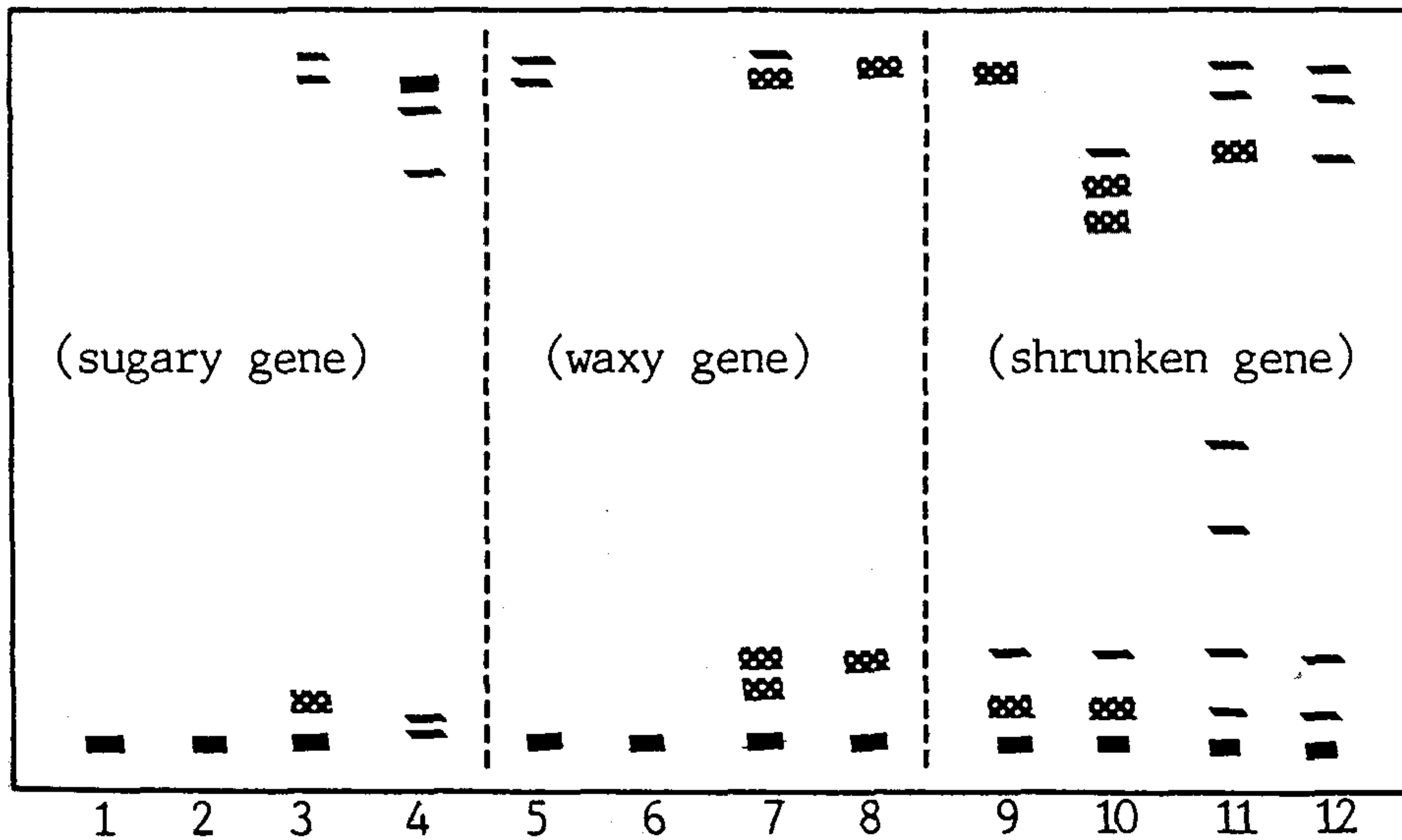


Fig. 1. Esterase isozyme patterns of maize endosperm with different genotypes. 1. SuSuSu, 2. SuSusu, 3. Sususu, 4. sususu, 5. WxWxWx, 6. WxWxwx, 7. Wxwxwx, 8. wxwxwx, 9. ShShSh, 10. ShShsh, 11. Shshsh, 12. shshsh

dose가 3인 sususu 인 것은 2, 3, 4, 5, 7, 8번 밴드를 보여주었는데 이 가운데 5번 밴드의 esterase의 활성은 매우 약한것으로 나타났다. 이와같이 옥수수粒의 胚乳는 sugary 因子에 의해서 표현될 수 있으며 dosage 效果가 esterase의 밴드패턴을 구별하는데 주요 지표(marker)라고 생각되었다.

#### 나. waxy 遺傳因子

wx因子와 열성 對立因子인 wx가 보여주는 옥수수粒 胚乳의 4가지 遺傳因子型이 esterase의 동위효소 밴드패턴으로 나타난 것을 보면 그림1과 같다. 총 7개의 밴드가운데 wx의 dose가 0인 wxwxwx의 경우에는 1번, 3번, 그리고 7번째 위치에서 동위효소 밴드를 보여주었으나 wx의 dose가 1인 WxWxwx의 옥수수粒은 1, 2, 3, 4, 5, 6번의 밴드가 없고 다만 7번의 밴드만 보여주었다. 이처럼 wx의 dose가 1인 경우 맨끝의 밴드만 보여준것은 PH가 높은 쪽에서 위치하는 것으로 나타나 위의 su因子가 dose 1일 때 보여주는 경우와 매우 같았다. 즉 dose가 1 경우에는 거의 胚乳의 遺傳因子型 구별이 어렵다는 것을 알 수 있었다. wx의 dose가 2인 경우에는 1, 2, 4, 5, 6, 7번 밴드가 모두나 이 역시 위의 su인자의 dose가 2인 경우에서와 같이 많은 수의 밴드를 보여주고 있다는 점에서 su나 wx가 같은 dosage 效果를 보여주고 있다고 할 수 있다. 그러나 각 밴드의 위치는 두 遺傳因子間에 큰 差異가 있음을 알 수 있었다. 끝으로 wx의 dose가 3인 wxwxwx 경우의 esterase 밴드패턴을 보면 1, 4, 6번 밴드가 존재하였고 2, 3, 5, 7 밴드는 결여되어 있었다. 이와같은 사실은 쌀 胚乳의 아밀로스 含量變化에 따라 dosage 效果가 있다는 보고와 일치하였으나 밴드의 수와는 비교할 수는 없었다.

#### 다. shrunken 遺傳因子

shrunken 因子가 옥수수粒 胚乳에서 보여주는 4가지 遺傳因子型의 esterase의 밴

드 패턴을 보면 그림 1의 9,10,11,12와 같다. 총 10개의 밴드가 가운데서 dose가 0인 것은 1,8,9,10번 밴드를 보여주었고 dose가 1인것은 3,4,5,8,9,10번 밴드를 보여주었으며 dose가 2인 Shshsh는 10개의 밴드 모두를 보였다. 그러나 10개의 밴드 가운데 6,7번의 밴드가 매우 약하게 나타난 것으로 보아 이들의 esterase 활성은 낮은것으로 추측된다.

이상의 3가지 형태의 옥수수 遺傳因子가 관여하는 여러가지 胚乳의 遺傳子型이 보여주는 esterase의 밴드수는 많고 또 그 위치가 다양할 뿐 아니라 esterase의 活性度가 遺傳子型의 dose에 따라 크게 다르다는것을 확인함으로써 옥수수粒의 esterase 活性에 큰 變異가 있음을 알 수 있었다. 本 研究를 통하여 크게 확인한 사실은 옥수수 胚乳의 dosage 效果를 單因子가 관여하는 경우 쉽게 그리고 확실히 확인할 수 있었다는 점이다.

## 2. 非對立因子間 比較

su, wx, sh因子들이 각각 보여주는 3 dose 상태의 胚乳와 정상적인 胚乳사이의 esterase同位酵素의 變異 내지 활성을 비교하면 그림2와 같다. dose가 0인 즉 정상인 경우에는 그림2의 1,2번에서와 같이 esterase의 밴드가 결여된 null 상태로서(그림1과 거의 동일) 5,6번의 wxwxwx와 밴드수에 있어서 동일하였으나 pH가 높은 말단(끝) 부위의 밴드 위치는 다른 것으로 나타났다. 다음 sususu인 경우에도 정상적인 경우 (dose가 0인것)나, wxwxwx나, shshsh와는 다른것으로 나타났다. 또한 shshsh 역시 독특한 밴드패턴을 보여주고 있어 다른 遺傳因子와의 dose효과를 구별하기가 용이 하였다.

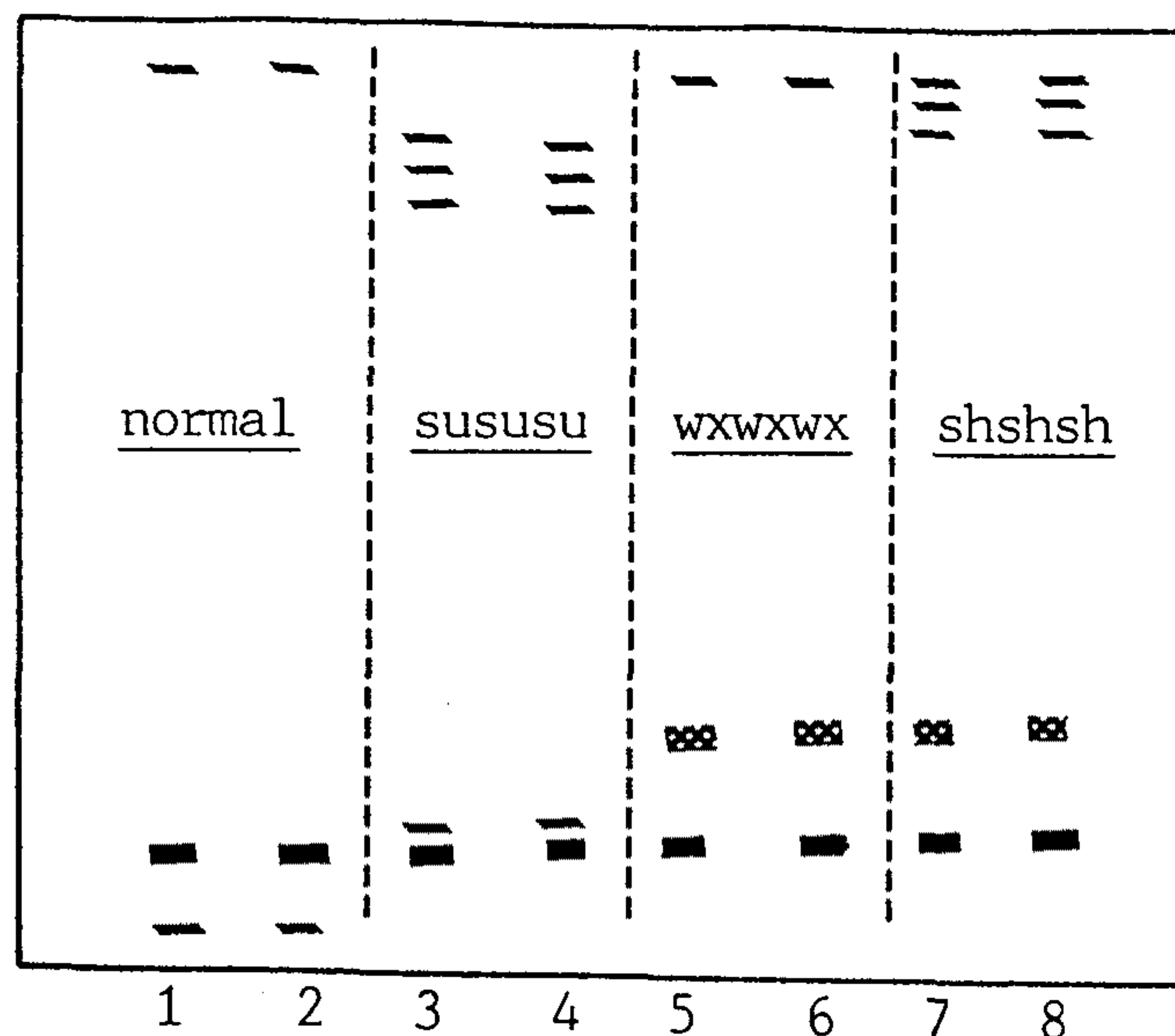


Fig.2. Comparison of esterase patterns among normal, sususu, wxwxwx and shshsh endosperm of maize.



### 3. 옥수수粒의 表現型에 따른 esterase 比較

한 이삭에서 表現型的으로 分離하는 옥수수粒에 대해 각각 esterase 同位酵素의 패턴을 比較한 結果는 그림 3과 같다. 그림 3에서 3번, 5번, 7번은 정상적인 表現型의 옥수수粒이었고 2, 4, 6, 8번은 각각 오페이크-2 옥수수, 단옥수수(쭈글쭈글함), 초당옥수수(매우 쭈글쭈글함), 찰옥수수(불투명)粒으로 이들은 각각 1과 2, 3과 4, 5와 6, 7과 8을 조합으로 하여 비교하면 다음과 같다. 우선 오페이크-2 옥수수에 관여하는 esterase 밴드 하나는 보통 옥수수에서 나타나지 않았다. 그리고 sugary 因子에 경우에는 오히려 susu 遺傳子型에서 보다 많은 esterase 밴드를 보였다. 초당옥수수의 遺傳子型인 shsh 역시 劣性同質接合體인 경우 정상적인 것 보다 많은 수의 esterase 밴드를 보였다. 비록 수는 적지만 찰옥수수(wxwx)에 있어서도 메옥수수(7번)에서 보다 2개의 esterase 밴드가 더 보여 本 研究에 공시하였던 정상적인 옥수수粒과 突然變異 粒은 esterase 패턴으로 확실히 구별 확인 할 수 있었다. 이와같은 사실은 Schwartz 8)의 研究報告된 바 있는 옥수수 배유내 E2 동위효소에 대한 dosage 효과와 일치하였으며, 本 實驗에서 얻어진 한가지 특이한 것은 전술한 옥수수 胚乳에서와 마찬가지로 劣性同質接合體가 되거나 아니면 胚乳의 경우 劣性遺傳因子의 조성에서 dose가 증가함에 따라 同位酵素 밴드수가 크게 증가한 반면에 정상적인 옥수수粒(wild type)이 되거나 dose 정도가 감소함에 따라 esterase의 同位酵素의 밴드수가 감소하였다는 것이다.

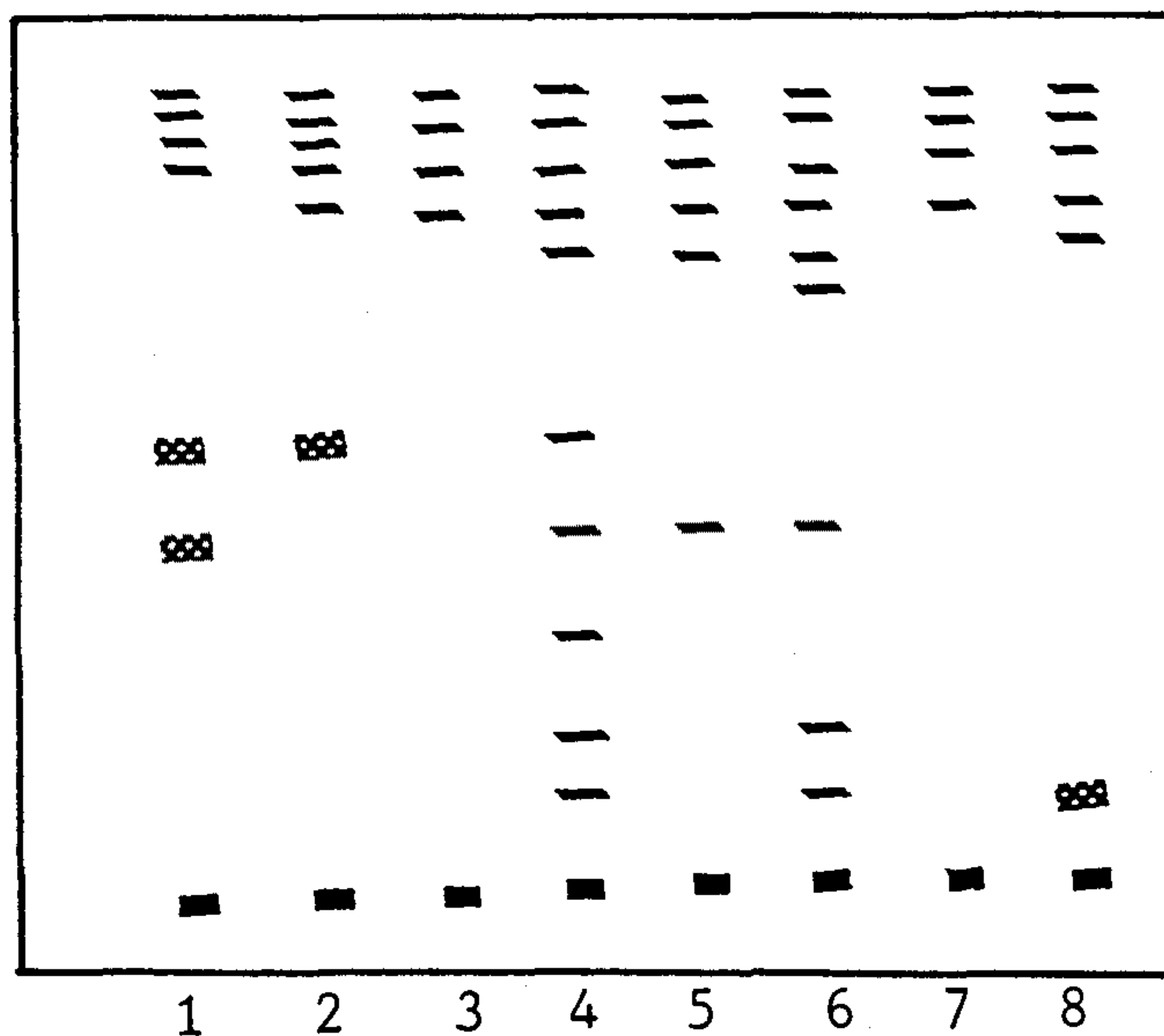


Fig.3. Esterase isozyme patterns of maize embryo with different genotypes. 1.  $O_2^-$ , 2.  $o_2o_2$ , 3.  $Su^-$ , 4.  $susu$ , 5.  $Sh^-$ , 6.  $shsh$ , 7.  $Wx^-$ , 8.  $wxwx$

## 引用文獻

1. Brewbaker, M. D. Upadhyya, Mahesh. et al. 1968. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. III. Gel electrophoretic methods and application *physiol. plant.* 21: 930 - 940.
2. Castimpools, N. and Drysdale(eds). 1977. *Biological and Biomedical Applications of Isoelectric Focusing.* Plenum Press, New York.
3. 崔鳳鎬. 李喜鳳. 1989. 分藥性 옥수수에 대한 peroxidase 同位酵素의 遺傳分析. *韓育誌.* 21(3): 176 - 182.
4. Giulian, G. G., R. L. Moss and M. Greaser. 1984. Analytical isoelectric focusing using a high-voltage vertical slab polyacrylamide gel system. *Anal. Biochem.* 142: 421 - 436.
5. 李喜鳳. 1990. 分藥性 옥수수에 대한 esterase 同位酵素의 遺傳分析. *韓育誌* 35(2): 146 -150.
6. Macdonald, T., and J. L. Brewbaker., 1974. Isoenzyme polymorphism in flowering plant. IX. The E5,6,7,8,9,10 esterase loci of maize. *J. Heredity.* 65: 37 - 42.
7. Scandalios, J. G. 1964. Tissue-specific isoenzyme variations in maize. *J. Heridity.* 55: 281 - 285
8. Schwartz , D., 1964. A second hybrid enzyme in maize. *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 51: 602 - 604.



# F1 잡종 옥수수(玉黍)의 체세포배발생을 통한 식물체 재분화

송남희, 정원중, 김명국, 민성란, 유장렬

한국과학기술연구원 유전공학연구소 식물세포생물학연구실

## High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue culture of F1 hybrid maize(*Zea mays* L.)

Nam H. SONG, Won J. JEONG, Myoung K. KIM, Sung R. MIN, and Jang R. LIU\*

Plant Cell Biology Laboratory, Genetic Engineering Research Institute,  
KIST, P. O. Box 17, Taedok Science Town, Taejon 305-606

### ABSTRACT

High frequency plant regeneration somatic embryogenesis from zygotic embryo-derived callus of F1 hybrid maize(cv. Ivory 'N gold and Mexico QPM) is described. Embryogenic callus was induced from over 95% of the scutella of immature zygotic embryos on N6 medium supplemented with 6 mM proline, 100 mg/L casein hydrolysate, and 1 mg/L 2,4-D, which subsequently developed into numerous somatic embryos. Upon transfer onto the basal medium, about 90% of them regenerated into plantlets. Over one thousand plantlets were prepared for transplantation to potting soil.

Key words : Maize(*Zea mays* L.), somatic embryogenesis, F1 hybrids

옥수수, 수수, 사탕수수, 벼, 밀, 진주조, Napier grass, *Panicum maximum* 등의 화본과 작물의 기내재분화는 주로 체세포배발생 경로로 이루어진다(Vasil, 1982). 옥수수의 식물체재분화는 Green과 Philips(1975)에 의해 처음 보고된 이후 주로 inbred line인 A188(Armstrong and Green, 1985)과 B73(Lowe et al., 1985)을 중심으로 체세포배발생에 대한 연구가 되었다. 그러나 제 농가에서 재배되고 있는 F1 hybrid에 대한 보고는 별로 없다(Hodges et al., 1986).

옥수수에서 유용한 형질이란 대표적으로 당도의 유지증가 및 높은 함량의 라이신을 가지는 고단백품종이면서 다수확종이어야한다. 그런데 식용으로 많이 사용되는 단옥수수의 경우 수확후 수시간내에 당도가 떨어지며, opaque 형(Choe, 1968)의 경우는 고단백품종이나 수량이 적은 단점을 가지고 있다. 따라서 우수한 형질을 가진 기존품종을 유전적으로 안정하게 대량 증식시키거나 유용유전자를 도입하여 새로운 품종을 개발하려면 배양세포로부터 재분화기술을 확립할 필요가 있다.

본 연구는 F1 hybrid인 단옥수수계통의 Ivory 'N gold와 opaque형의 Mexico QPM 등의 2품종을 재료로하여 체세포배발생에 의한 식물체 재분화 시스템을 확립하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 연구에 사용한 옥수수(*Zea mays* L.) 품종은 수분후 10일째 된 Mexico QPM, ivory 'N gold의 미성숙종자를 충남대학교 최봉호교수로부터 분양받아 사용하였다. 미성숙종자를 70% alcohol에 5분, 25%로 희석된 상업용 표백제(유한락스)에 20분 처리한 후 멸균수로 3회 수세하여 표면살균하였다. 살균된 미성숙종자는 해부현미경하에서 종피와 배유를 제거하고 미성숙배만 분리하였다.

### 캘러스 배양 및 체세포배발생

캘러스 유도를 위해 미성숙배를 1 mg/L 2,4-D와 6 mM proline 및 100 mg/L casein hydrolysate가 첨가된 N6(Chu et al., 1975)고체배지(agar 0.8%)와 1 mg/L 2,4-D와 100 mg/L asparagine이 첨가된 MS(Murashige and Skoog, 1962)에 배축이 접하도록 치상하였다. 유도된 캘러스는 동일조건의 배지에서 2주 간격으로 계대배양하여 증식시켰다. 캘러스의 유도와 증식은 25°C 에서 행하였다. 배양중에 발달한 체세포배를 현미경하에서 분리하여 N6기본배지에서 발아를 유도하였다.

## 결 과

### 캘러스 유도 및 증식

N6배지에서 2주 경과후부터 대부분의 배반으로부터 돌기모양의 캘러스와 투명하고 부서지기 쉬운 캘러스가 형성되었다. 또한 캘러스의 발생과 더불어 미성숙배는 발아하여 shoot와 뿌리가 신장하였다. shoot와 뿌리는 제거하고 캘러스만을 분리하여 계대배양 하였다. 그러나 투명하고 부서지기 쉬운 캘러스는 잘 증식되지 않았으며 분화된 식물체도 전혀 관찰할 수 없었다. 한편 비교적 단단하고 희고 노란색의 캘러스는 증식속도가 빠르고 체세포배를 발생하였기에 선별하여 계대배양을 계속하였다. 배발생캘러스의 외부 형태는 잘 부서지지 않고 약간 organized된 상태로 유지 되었다. 액체배지에서는 캘러스의 크기증가만 있었을 뿐 잘게 부서지지 않았다. MS배지에서는 역시 2주 경과후부터 캘러스가 형성되었으나 대부분의 캘러스는 계속적으로 증식되기 보다는 초기에 재분화되어 2개월 이상 유지가 어려웠다. 이러한 재분화 개체는 기관발생에 의한 것인지 체세포배발생에 의한 것인지는 확인되지 않았다. 따라서 체세포배의 발생 및 발달은 proline 및 casein hydrolysate가 첨가된 N6배지에서 유도된 캘러스에서 확인하였다.

### 체세포배의 발생 및 발달

Ivory 'N gold, Mexico QPM 두 품종 모두에서 유도된 배발생캘러스의 대부분(90%)에서 체세포배를 관찰되었다(Fig 1). 체세포배는 진정종자의 배와 외형적으로 유사한 뚜렷한 자엽초와 배반 및 coleorhiza를 가지는 완전한 성숙배로 발달하였다.



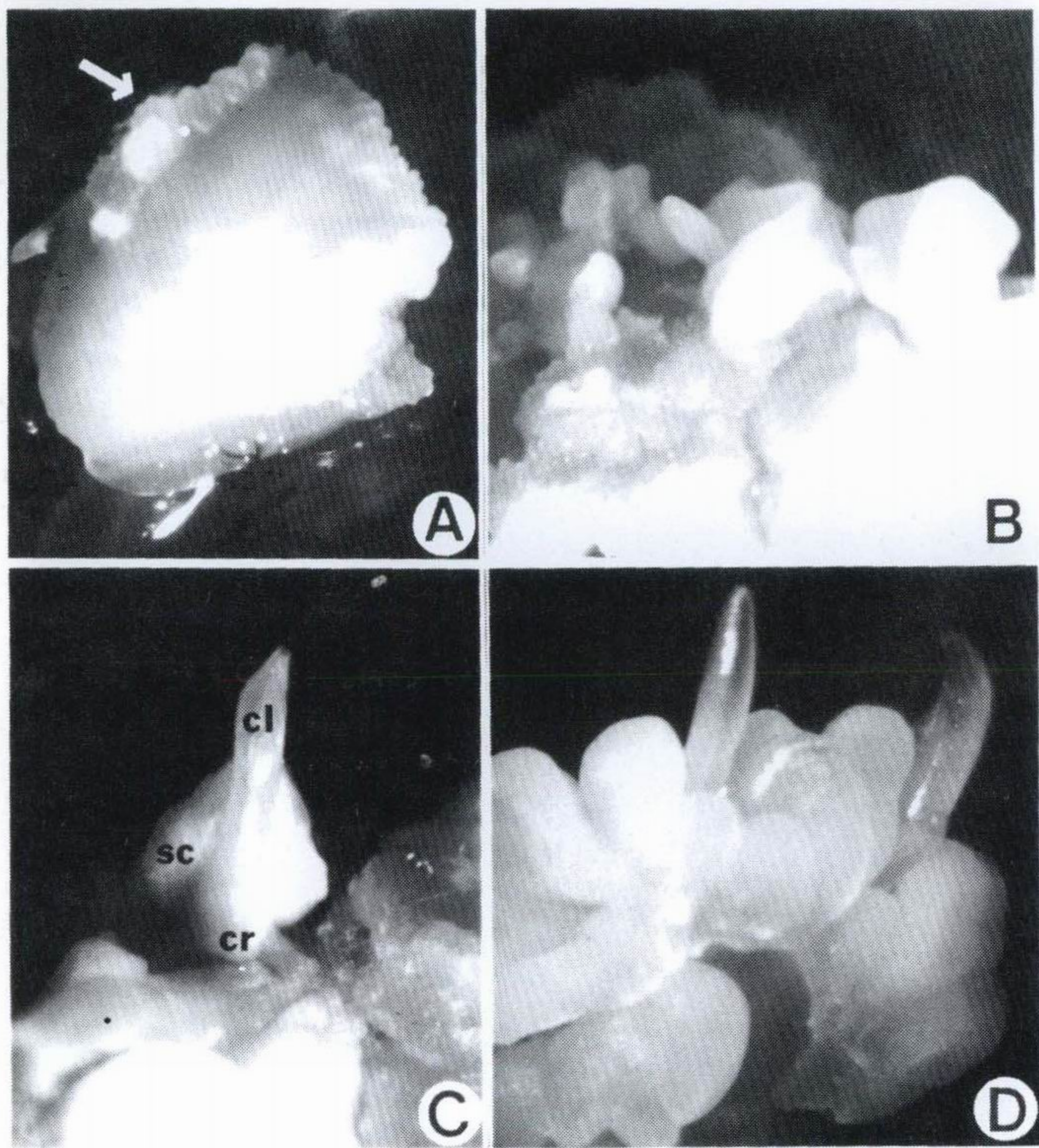


Fig. 1. Somatic embryogenesis of maize(*Zea mays* L. ).

A: Embryogenic callus induced from zygotic immature embryo

B: Embryogenic organized callus with somatic embryo

C: A typical somatic embryo(sc: scutellum; cl: coleoptile; cr: coleorhiza)

D: Germinating embryos.



## 고 찰

옥수수에는 주로 inbred line인 A188을 중심으로 체세포배발생의 연구가 많이 되어 있다(Green, 1982). 그러나 아직까지 대부분의 품종, F1 hybrid에서는 체세포배생산에 대한 연구가 부족하여, F1 hybrid에서 나타난 우수 품종을 대량으로 유지하거나 유용한 유전자를 도입하기 위해서는 조직배양의 재분화시스템을 기존의 재배품종에서도 가능하도록 하여야 할 것이다. 본 연구에서는 F1 Hybrid로서 농가에서 재배하는 Ivory 'N gold와 Mexico QPM의 두 품종을 이용하여 미숙배유래 배발생캘러스로부터 배발생 캘러스를 유도하였으며, 유도된 배발생캘러스는 전형적인 체세포배로 발달하였다. 그러나 배발생캘러스는 액체배지에서 잘게 부서지지 않고 크기만 커지면서 증식하여 현탁배양계로 확립되지는 못하였다. 캘러스 유도 후 5개월 이상이 경과한 후에는 더 이상의 체세포배의 발달이나 재분화가 일어나지 않았다. 결과적으로 단옥수수 계통의 Ivory 'N gold와 opaque형의 고단백품종인 Mexico QPM에서 체세포배발생을 관찰할 수 있었으며 이 체세포배는 배반과 자엽초 및 coleorhiza를 가지는 진정종자와 형태적으로 같은 완전한 성숙배로 발달하였다.

## 적 요

단옥수수 계통의 Ivory 'N gold, opaque형의 Mexico QPM의 미숙배를 이용하여 체세포배발생을 통한 식물체재분화를 유도하였다. 배반으로부터 배발생캘러스가 유도되었으며, 배발생캘러스로부터 유도된 체세포배는 진정종자와 형태적으로 같은 배반과 자엽초 및 coleorhiza를 가지고 있었다.

## 참고 문헌

- Armstrong CL, Green CE (1985) Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and involvement of L-proline. *Planta* 164:207-214
- Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY, Bi FY (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin.* 18:659-668
- Choe BH (1968) Some aspects of high lysine maize breeding using opaque-2 gene. M. S. thesis, Univ. of Hawaii
- Green CE (1982) Somatic embryogenesis and plant regeneration from the friable callus of *Zea mays*. In *Plant tissue culture 1982*. 5th international congress of plant tissue and cell culture(A. fujiwara eds), pp 107-108
- Green CE, Phillips RL (1975) Plant regeneration from tissue culture of maize. *Crop Sci.* 15:417-421
- Hodges TK, Kamo KK, Imbrie CW, and Becwar MR (1986) Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. *Bio/Technology* 4:219-223
- Lowe K, Taylor DB, Ryan P, and Peterson KE (1985) Plant regeneration via organogenesis and embryogenesis in the maize inbred line B73. *Plant Science* 41:125-132
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:478-497
- Steward FC, Mapes MO, Mears K (1958) Growth and organize development of cultured cells. II Organization in cultures grown from free suspended cells. *Amer. J. Bot.* 45:705-708
- Vasil IK (1982) Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereal In *Plant tissue culture 1982*. 5th international congress of plant tissue and cell culture(A. fujiwara eds), pp 101-104



# High frequency plant regeneration from suspension cultures of japonica x indica rice (*Oryza sativa* L. cv Taebaegbyeon)

Myoung Kug Kim, Sung Ran Min, Won Joong Jeong, Nam Hi Song, and Jang Ryol Liu

Plant Cell Biology Laboratory, Genetic Engineering Research Institute, KIST,  
P.O. Box 17, Taedok Science Town, Taejon, 305-606, Korea

**Abstract :** A system for high frequency plant regeneration from suspension cultures of japonica x indica rice (*Oryza sativa* L. cv Taebaegbyeon) was established. White compact callus clumps derived from immature embryos were placed in N6 medium containing casein hydrolysate (100 mg/l) and L-proline (6 mM) supplemented with 2,4-D (1 mg/l), and were subcultured every 7 days for over 6 months. Thereafter, uniformly fine cell-clusters (about 1 mm in diameter) in white compact appearance were dominant over friable cell aggregates in suspension cultures. Upon transfer onto the solidified medium supplemented with NAA (1 mg/l) and kinetin (5 mg/l), 90% of the clusters regenerated into plantlets via somatic embryogenesis. Moreover, when the proliferating clusters on the regeneration medium were separated into smaller ones (about 1 mm in diameter) every 10 days up to 3 times, the total number of plantlets developed from the initial cluster increased about 5 times in the same culture period.

**Key words :** Cell cluster; Japonica x indica rice; *Oryza sativa* L.;  
Plant regeneration; Somatic embryogenesis

## Introduction

A number of research efforts have been focused on the somatic embryogenesis of rice since Ling et al. (1983) first succeeded in regeneration of F<sub>1</sub> hybrid rice via somatic embryogenesis. However, the frequency of regeneration has been low, and the cells have tended to lose the potential for embryogenesis during the subculture (Bhattacharya and Sen, 1980 ; Tamura, 1968). Besides, there are large variabilities in the potential of plant regeneration among the various cultivars (Abe and Futsuhara, 1986 ; Seong and Sohn, 1986). Among the cultivars cultivated in Korea, the japonica X indica types are considered to be more difficult to regenerate when compared with others. Thus we have attempted to establish a system for high frequency plant regeneration from suspension cultures of a japonica X indica cultivar, Taebaegbyeo, previously reported as a difficult-to-regenerate type.

## Materials and Methods

### *Initiation and maintenance of calli*

Kernels were obtained from rice plants (*Oryza sativa* L. cv. Taebaegbyeo ; japonica X indica) grown in the paddy field between 13 and 16 days after pollination. They were sterilized in 70% ethanol for 5 min and then 25% Clorox for 40 min. After 3 times of rinsing in sterilized water, they were dehusked to excise the immature embryos under a dissecting microscope, and then subsequently placed on MS (Murashige and Skoog, 1962) medium supplemented with proline (6 mg/l), casein hydrolysate (100 mg/l), and 2,4-D (2 mg/l). The cultures were incubated in the dark and subcultured every 2 weeks. Throughout the experiment, all cultures were maintained at 27°C.

### *Suspension culture*

Typical embryogenic calli in smooth, white, knobby calli (Reghava-Ram and Nabors, 1984) arisen from the immature embryos were teased apart under a dissecting microscope and transferred to 100 ml Erlenmeyer flasks containing 20 ml of N6 medium (Chu et al., 1975) supplemented with casein hydrolysate (100 mg/l), L-proline (6 mM), and 2,4-D (1 mg/l). The cultures were placed on a gyratory shaker at 100 rpm in the dark and subcultured every 7 days.

### *Plant Regeneration*

Cell clusters (about 1 mm in diameter) were obtained from suspension cultures by sieving calli through stainless mesh with pore sizes of 0.7, 1.5, and 2.5 mm. They were washed three times with N6 medium and plated onto various regeneration media (Table 1): 20 clusters per petridish (87 X 15 mm) containing 25 ml of medium. All cultures were incubated under 16 hours of



daylength at 2000 lux of cool-white fluorescence. The frequency of regeneration was counted after 4 weeks of culture. In order to increase plant regeneration efficiency, those clusters enlarged at the early stage of regeneration were separated into smaller ones (about 1 mm in diameter) every 10 days up to 3 times. The regeneration frequency was calculated from five clusters per petridish. All experiments were independently repeated at least 3 times.

Table 1. Regeneration media for plant regeneration from suspension-cultured cells of rice

Designation of medium	Culture period (week)	Composition
N6BM	4	N6 + 6 mM proline + 100 mg/l casein hydrolysate (Sigma) + 0.6% Gelrite
N61N5K	4	N6 + 6 mM proline + 100 mg/l casein hydrolysate + 1 mg/l NAA + kinetin + 0.6% Gelrite
DMS → REG (Matsuno et al, 1990)	2 → 2	DMS + 2% sucrose + 9% sorbitol + 0.44 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l kinetin + 2g/l casein hydrolysate + 2 mg/l ABA + 5 mM MES + 0.6% Gelrite (DMS = 1/2 dilution of inorganic salts except $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{H}_3\text{BO}_3$ , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ . $\text{FeSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ in Murashige and Skoog medium)
REG	4	MS + 2% sucrose + 5.4% sorbitol + 2 mg/l ABA + 1 mg/l BA + 300 mg/l $\text{NH}_4\text{Cl}$ + 2g/l casein hydrolysate + 5 mM MES + 0.6% Gelrite

## Results and Discussion

### *Initiation of embryogenic calli and establishment of suspension culture*

After one week of culture, about 40% of the immature embryos began to form callus on the periphery of the scutellum contacted with the medium. After that, smooth, white, knobby callus, friable, translucent callus, and wet, yellow callus proliferated all over the surface of the scutellum. The first one was recognized as embryogenic callus due to its potential to develop into somatic embryos when transferred onto the regeneration media in a preliminary experiment, whereas the others as nonembryogenic calli because they did not undergo regeneration on whatever medium they were cultured. Initial growth of embryogenic callus was much slower than that of the nonembryogenic ones. However, vigorously growing embryogenic callus was able to be selected at the end of the first or second subculture. After 2 months of subculture, embryogenic calli were teased into clumps and were transferred into liquid medium. After over 6 months of subculture, uniformly fine cell clusters were

dominant over friable, nonembryogenic cell aggregates. Ozawa and Komamine (1989) reported that when cells were subcultured every 7 days, they did not undergo regeneration, whereas cells subcultured every 3 days were able to develop into plantlets at a frequency of 90% in an indica type. In this study, a high frequency of regeneration was obtained from clusters maintained by subcultures of 7-day intervals (Fig. 1).

#### ***Selection of plant regeneration medium***

On N61N5K, the highest frequency of plant regeneration was obtained (Fig. 1). However, on N6BM, most of the cell clusters turned dark brown and degenerated eventually to death, with only a few clusters undergoing regeneration. These results indicate that the frequency of plant regeneration is significantly improved by the addition of NAA and kinetin to the regeneration medium. Further details were reported previously (Min et al., 1991). On REG, the clusters regenerated more slowly than those on N61N5K, whereas on DMS→REG (Table 1), most cell-clusters developed into globular embryos but did not undergo further development.

#### ***Effects of cell-cluster size on plant regeneration***

The middle-sized cell-clusters showed the highest frequency of differentiation among the three different sizes (Fig. 1). However, Ozawa and Komamine (1989) reported that the larger the clusters are, the higher the frequency is in indica type, and Peterson and Smith (1991) reported that the smaller ones produced more plantlets in japonica x indica type.

Some of the small-sized ones turned dark brown and degenerated eventually to death, whereas the large-sized cell-clusters proliferated with an increase in volume for a few days. The large-sized ones, probably retaining higher amount of 2,4-D residue than the small-sized ones, were seemingly arrested in the mitotic cell cycle. Besides, these large-sized ones seemed to have less chance to secrete the inhibitory substances that were released by surrounding embryos or regenerating plants as suggested by Peterson and Smith (1991).

#### ***Increase of plant regeneration efficiency by separating individuals of daughter cell-clusters***

Each cluster at the early stage of regeneration underwent proliferation, producing five to six aggregated daughter clusters. Each of the daughter clusters was almost the same size as the initial cell-clusters. After 10 days of culture, only one or two of them began to differentiate (Fig. 2). If rest of them had competence of regeneration and were probably inhibited by the substance(s) released by the surrounding embryos or regenerating plants (Peterson and Smith, 1991), the individuals would differentiate unless they were aggregated together. This assumption may be strengthened by our



results in which frequency of the plant regeneration from cell clusters was markedly enhanced by separating the clusters into smaller ones (Fig. 2), which support the suggestion of Peterson and Smith (1991) on a role of inhibitory substance on embryogenesis. When the proliferated daughter ones were individually separated ( about 1mm in diameter ) every 10 days up to 3 times, the total number of plantlets developed from the initial cluster increased about 5 times in the same culture period (Fig. 2). These cell clusters seemed to have more chance to absorb NAA and kinetin in the medium and to secrete inhibitory substances.

Peterson and Smith (1991) had obtained about twenty two plants from ten 10 mg pieces of callus precultured on ABA containing medium in japonica x indica type. In our experiment, about one hundred plants per ten 0.1 mg cell clusters were obtained [ The weight of one middle size cell-cluster =  $(1/10) \times (1.09 \pm 0.15 \text{ mg})$ : Mean  $\pm$  SD of ten replicates of ten cell-clusters)]. The total number of daughter ones increased up to twenty two from one cluster. However, only about half of them developed into normal plantlets (data not shown).

In summary, we established a system for high frequency plant regeneration with uniformly fine cell-clusters via suspension cultures of japonica x indica rice, Taebaegbyeo. The potential of plant regeneration in the culture did not diminish even after over 6 months of subculture. The number of regenerants from cell clusters per weight increased when the middle sized cells were planted and teased into smaller ones every 10 days on medium containing NAA and kinetin.

### Acknowledgements

This research was supported by a grant (N80410) from the Korean Ministry of Science & Technology to J. R. Liu. We thank Chung-Nam Provincial Rural Development Administration for the kind supply of developing kernels of Taebaegbyeo, and Drs. Hyouk Joung and Sang S. Kwak for their critical reading of the manuscript.

### Literature Cited

- Abe, T. and Y. Futsuhara. 1986. Genotypic variability and plant regeneration or callus formation in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 72: 3-10.
- Bhattacharya, P. and S. K. Sen. 1981. Potentiality of leaf sheath cells for regeneration of rice (*Oryza sativa*) plants. *Theor. Appl. Genet.* 58: 87-90.
- Chu, C. C., C.C. Wang, C. S. Sun, C. Hsu, K. C. Yin, C. Y. Chu, F. Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *SciSin.* 18: 659-668.

- Jeong, W. J., N. H. Song, S. R. Min, M. K. Kim, and J. R. Liu. 1991. Effect of ABA and the total inorganic nitrogen content on plant regeneration from cultured cells of rice (*Oryza sativa* L. cv Taebaegbyeon). Korean J Plant Tissue Culture 18: 209-214.
- Kamada, H. and H. Harada. 1981. Change in the endogenous level and effects of abscisic acid during somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. Plant cell physiol. 22: 1423-1429.
- Ling, D. H., M. Y. Chen, and Z. R. Ma. 1983. Somatic embryogenesis and plant regeneration in an interspecific hybrid of *Oryza*. Plant Cell Rep. 2: 169-171.
- Matsuno, T., K. Ishizaki, and M. E. Horn. 1990. SE productivity of several varieties with Scutellum E callus method in rice. In 2nd Plant Tissue Culture Colloquium. The Japanese Associ. for Plant Tissue Culture. p. 100-101
- Min, S. R., W. J. Jeong, M. K. Kim, N. H. Song, and J. R. Liu. 1991. Effects of growth regulators and osmotica on somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa* L.). Korean J Plant Tissue Culture 18: 331-335.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant. 15: 473-497.
- Oard, J. H. and J. N. Rutger. 1988. Callus induction and plant regeneration in elite U.S. rice lines. Crop Sci. 28: 565-567.
- Ozawa, K., and A. Komamine. 1989. Establishment of a system of high-frequency embryogenesis from long-term cell suspension cultures of rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet. 77: 205-211.
- Peterson, G. and R. Smith. 1991. Effect of abscisic acid and callus size on regeneration of american and international rice varieties. Plant Cell Reports 10: 35-38.
- Reghava-Ram, N. V. and M. W. Nabors. 1984. Cytokinin mediated long-term, high-frequency plant regeneration in rice tissue cultures. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 113. s. : 315-323.
- Seong, K. and J. Sohn. 1990. Some factors affecting callus formation and plant regeneration in the seed culture of rice (*Oryza sativa* L.). Korean J. Plant Tissue Culture 17: 23-32.
- Tamura, S. 1968. Shoot formation in calli originated from rice embryo. Proe Jan Acad. 44: 97-99.

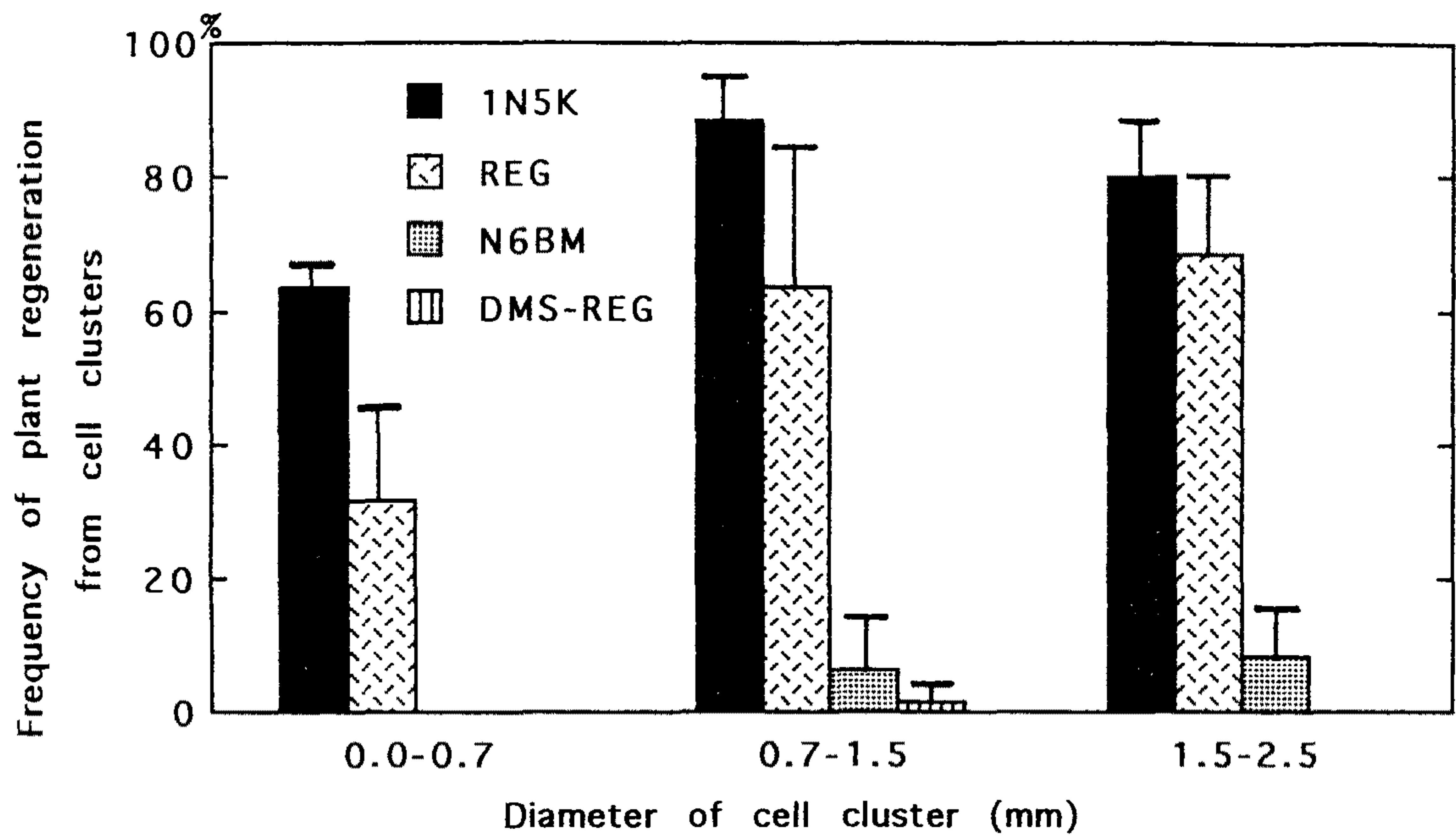


Fig. 1. Effect of cell-cluster size on plant regeneration. The cells were cultured on different regeneration medium for 30 days. Vertical lines represent S.E..



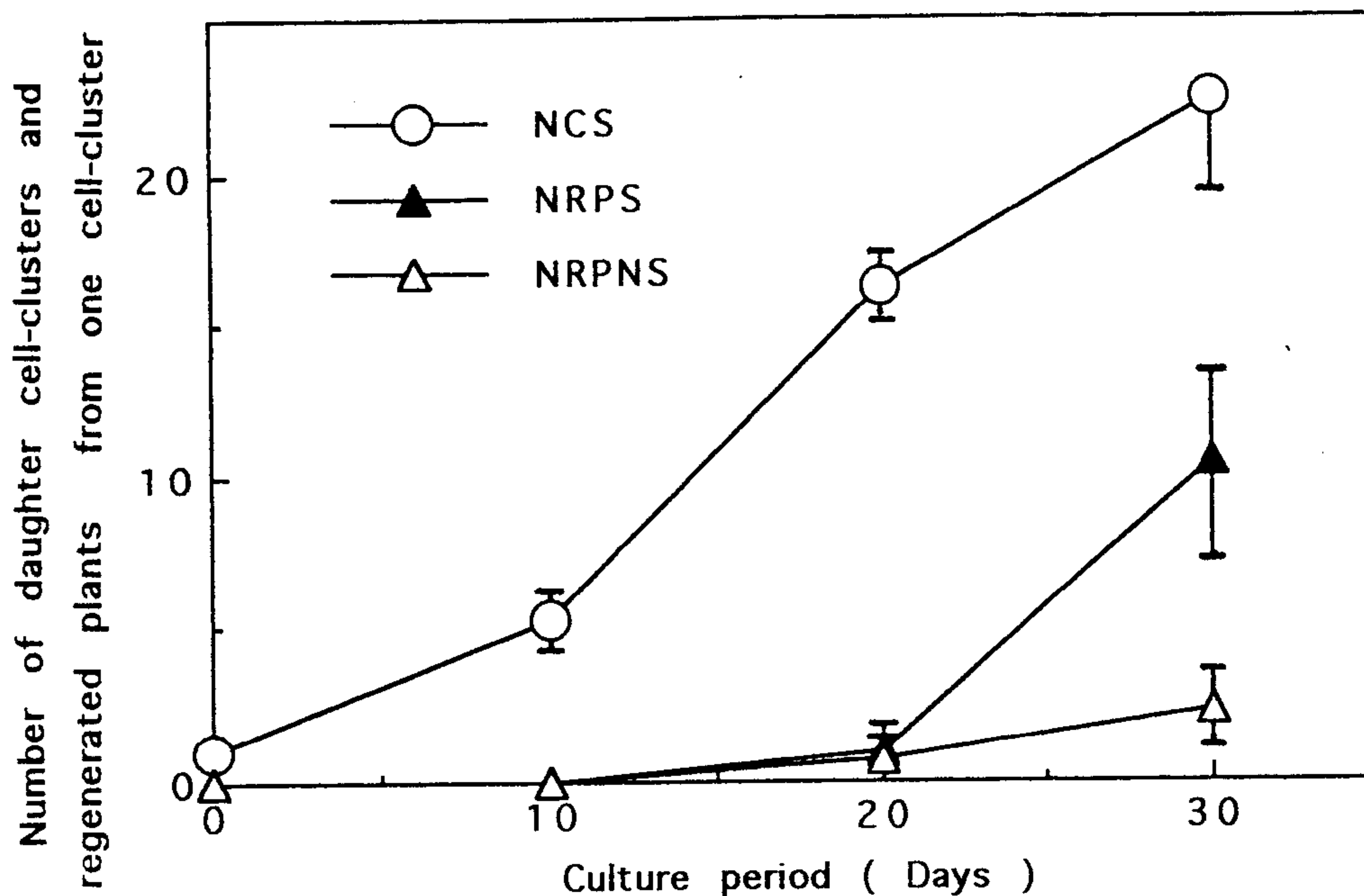


Fig. 2. Increase of plant regeneration efficiency in japonica x indica rice (*Oryza sativa* L. cv Taebaegbyeon) by separating individuals of daughter cell-clusters from the initial one cell-cluster of 0.7-1.5 mm in diameter. The daughter ones were separated every 10 days for 30 days of culture. Vertical lines represent S.E.. NCS : Total Number of daughter cell-clusters that had been individually separated every 10 days from initial one cell-cluster; NRPS : Number of plants regenerated from the one cell-cluster whose daughter cell-clusters were separated individually every 10 days; NRPNS : Number of plants regenerated from the one cell-cluster of which daughter ones were not separated.

## 벼 배 배양세포로부터 식물체 재분화에 미치는 Abscisic Acid와 무기질소함량의 영향

정원중 · 송남희 · 민성란 · 김명국 · 유장렬\*  
한국과학기술연구원 유전공학연구소 식물세포생물학연구실

### Effects of ABA and the Total Inorganic Nitrogen Content on Plant Regeneration from Cultured Cells of Rice (*Oryza sativa* L. cv Taebaegbyeo)

Won J. JEONG, Nam H. SONG, Sung R. MIN, Myoung K. KIM, and Jang R. LIU\*

Plant Cell Biology Laboratory, Genetic Engineering Research Institute, KIST,  
P. O. Box 17, Taedok Science Town, Taejon, 305-606

#### ABSTRACT

A plant regeneration system was established from immature zygotic embryo-derived suspension cultures of rice (*Oryza sativa* L. cv Taebaegbyeo) and effects of ABA concentrations and the total inorganic nitrogen content ( $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+ = 3 : 1$ ) in N6 solid medium supplemented with 1 mg/L NAA and 5 mg/L kinetin on plant regeneration were investigated. When microcalli (0.7-1.5 mm in diameter) from suspension cultures were plated on the medium containing 0-1 mg/L ABA, 90% of them gave rise to plantlets through somatic embryogenesis after 6 weeks of culture. Likewise, on the medium containing 100-200 mM inorganic nitrogen compounds, 95% of them regenerated into plantlets. Plantlets grew more vigorously on the medium with ABA compared with those without ABA. However, there was no prominent interaction between ABA concentrations and the total nitrogen content in terms of the plant regeneration frequency, suggesting that the two factors act independently of each other in the promotion of plant regeneration from cultured cells.

**Key words :** abscisic acid, inorganic nitrogen content, *Oryza sativa* L., plant regeneration, somatic embryogenesis

우수한 형질을 가진 기존품종을 유전적으로 안정하게 대량증식시키거나 유용유전자를 도입하여 새로운 품종을 개발하려면 배양세포로부터의 식물체 재분화 기술을 확립할 필요가 있다. 벼의 재분화는 주로 체세포배발생을 통하여 이루어지는데 Ling등(1983)의 보고를 필두로 하여 최근 어런이삭(Chen et al., 1985; Wang et al., 1987), 뿌리(Abe and Futsuhara, 1986), 성숙배(Wang et al., 1987; Kim and Sohn, 1991)와 미성숙배(Ozawa and Komamine, 1989) 등을 재료로하여 이에 관하여 보고하였다. 그러나

다른 화분과 작물에서처럼 벼도 일반적으로 재분화율이 낮으며 품종간에 상당한 차이가 있다(Peterson and Smith, 1991). 더우기 배양기간이 길어짐에 따라 체세포배발생 빈도가 현저히 감소하는 경향이 있다(Abe and Futsuhara, 1986; Kim and Sohn, 1991).

쌍자엽식물의 체세포배발생에서 ABA는 조기발아를 억제하고 형태적으로 전형적인 체세포배의 형성을 유도하는 효과가 있다(Ammirato, 1971, 1974, 1987). 당근의 체세포배의 발달과정에서 내성 ABA의 함량이 증가하는 현상은 이



과정에 ABA가 관여함을 시사한다(Kamada and Harada, 1981). 또한 목본인 *Picea abies*의 배발생캘러스에 ABA를 처리하면 재분화율이 향상되며 이때의 체세포배는 진정종자의 배와 형태적으로 더욱 유사하게 된다(Arnold and Hakman, 1981). 화본과인 pearl millet(Vasil and Vasil, 1982), *Pennisetum purpureum*(Rajasekaran et al., 1987), 옥수수(Close and Ludeman, 1987) 등에서도 ABA가 체세포배발생을 촉진한다. 또한 벼의 Taipei 309 품종의 약배양시 ABA의 처리로 재분화능이 높은 캘러스의 빈도가 증가되었으며(Torrizo and Zapata, 1986), 고농도의 ABA(26 mg/L) 처리로 Texas 벼품종과 Taipei 309 품종의 성숙종자에서 유래한 캘러스로부터 재분화율이 3-10배 증가되었다(Peterson and Smith, 1991).

한편 배지중의 무기질소원인 질산염의 구성비율이 암모늄염에 대해 상대적으로 낮을 때(e.g. 3:1) IR54 벼품종의 미성숙배에서 유래된 일차 캘러스로부터 식물체로의 재분화율이 향상되고 기간이 단축되며 재분화된 개체의 생장도 왕성하게 되었다(Grimes and Hodges, 1990).

그러므로 본 연구에서는 이제까지 재분화가 어려운 것으로 알려진 태백벼를 재료로하여 재분화능이 안정적으로 높은 세포주를 확립하고 이들 세포주로부터 ABA와 무기질소원으로서  $\text{KNO}_3$ 와  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 함량변화가 벼의 체세포배발생을 통한 식물체 재분화에 미치는 영향을 규명코자 한다.

## 재료 및 방법

### 캘러스 유도 및 현탁배양

충청남도 농촌진흥원 포장에서 재배된 受粉 후 14일째의 태백벼(*Oryza sativa* L. cv. Taebaegbyeon)의 미성숙종자를 70% 알콜에 5분, 25%로 희석된 상업용표백제(4% sodium hypochlorite)에 40분 처리하여 표면살균하였다. 멸균수로 3회 수세한 후 해부현미경 하에서 미성숙배만 분리하여 2 mg/L 2,4-D, 6 mM proline, 100 mg/L casein hydrolysate (Sigma), 2 mg/L glycine이 첨가된 N6(Chu et al., 1975) 고체배지(0.8% Bacto-Agar)에 배축이 접하도록 치상하였다. 25°C의 암조건에서 배양하여 캘러스를 유도한 후 동일조건인 배지에서 2주간격으로 계대배양하였다. 고체배지에서 2-3개월간 배양된 캘러스 중 회고 단단한 캘러스를 해부현미경하에서 선별하여, 1 mg/L 2,4-D, 6 mM proline, 100 mg/L casein hydrolysate(Sigma), 2 mg/L glycine이 첨가된 N6 액체배지에서 100 rpm, 25°C 암조건인 gyratory shaker에서 현탁배양하였다. 계대배양은 일주일 간격으로 하였으며, 최소한 6개월이상 현탁배양으로 유지, 증식

된 세포괴를 재분화율 조사에 이용하였다.

### 재분화에 미치는 ABA와 무기질소원의 영향

현탁배양으로 6개월 이상 유지중인 배양세포를 stainless mesh로 걸러 직경 0.7-1.5 mm 크기의 세포괴를 선별한 후 페트리디시(90 × 15 mm)당 20개씩 치상하였다. 사용된 배지는 1 mg/L NAA와 5 mg/L kinetin이 첨가된 N6 배지(N61N5K)의  $\text{KNO}_3$ 와  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로  $\text{NO}_3^-$ 와  $\text{NH}_4^+$ 의 함량비를 3:1(Grimes and Hodges, 1990)로 고정하고 총 함량을 10 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM과 ABA를 0, 1, 5, 10, 50 mg/L의 조합으로 처리하였다. 각 처리구는 3반복으로 하였으며, 배양은 28°C, 16시간 명조건으로 실시하였다. 재분화율은 배양 4주와 6주 후 다음과 같은 방식으로 구하였다:

$$(\%) \text{재분화율} = \frac{2 \text{ mm 이상의 shoot를 발생시킨 세포괴 수}}{\text{치상한 세포괴 수}} \times 100$$

### 체세포배의 발아

ABA와 무기질소원의 함량에 따른 재분화율 조사 처리구 중 10 mg/L 이상의 ABA와 50 mM 이상의 무기질소원이 복합처리된 처리구로부터 배양 6주 후 해부현미경하에서 체세포배만 분리하여 성장조절제를 첨가하지 않은 N6 고체배지에 치상하여 2주 후 발아율을 조사하였다. 뿌리와 1 cm 이상의 shoot가 함께 발생된 체세포배를 발아한 것으로 간주하였으며 발아율은 치상한 체세포배 수에 대한 발아한 체세포배 수를 백분율로 나타내었다.

### 조직학적 관찰

해부현미경으로 선별한 체세포배를 FAA(formalin: acetic acid: ethyl alcohol)에 고정한 후 1시간 간격으로 ethyl alcohol 30%부터 tertiary butyl alcohol 시리즈로 탈수하여 paraffin에 embedding하였다. Microtome으로 7 μm 두께의 조직절편으로 자른 후 Delafield's hematoxylin으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

배양 7일째부터 벼의 배반조직에서 캘러스가 형성되었으며, 2주 간격으로 계대배양하여 2개월 경과 후 회고 단단한 캘러스만 분리하여 현탁배양을 시작하였다. 현탁배양과정 중에 뿌리의 발생과 함께 갈변하여 죽어가는 캘러스가 많았으나, 새로이 회고 단단한 캘러스가 나타났다. 이 캘러스는 계대배양시 육안으로 선별되었는데 계대배양을 거듭



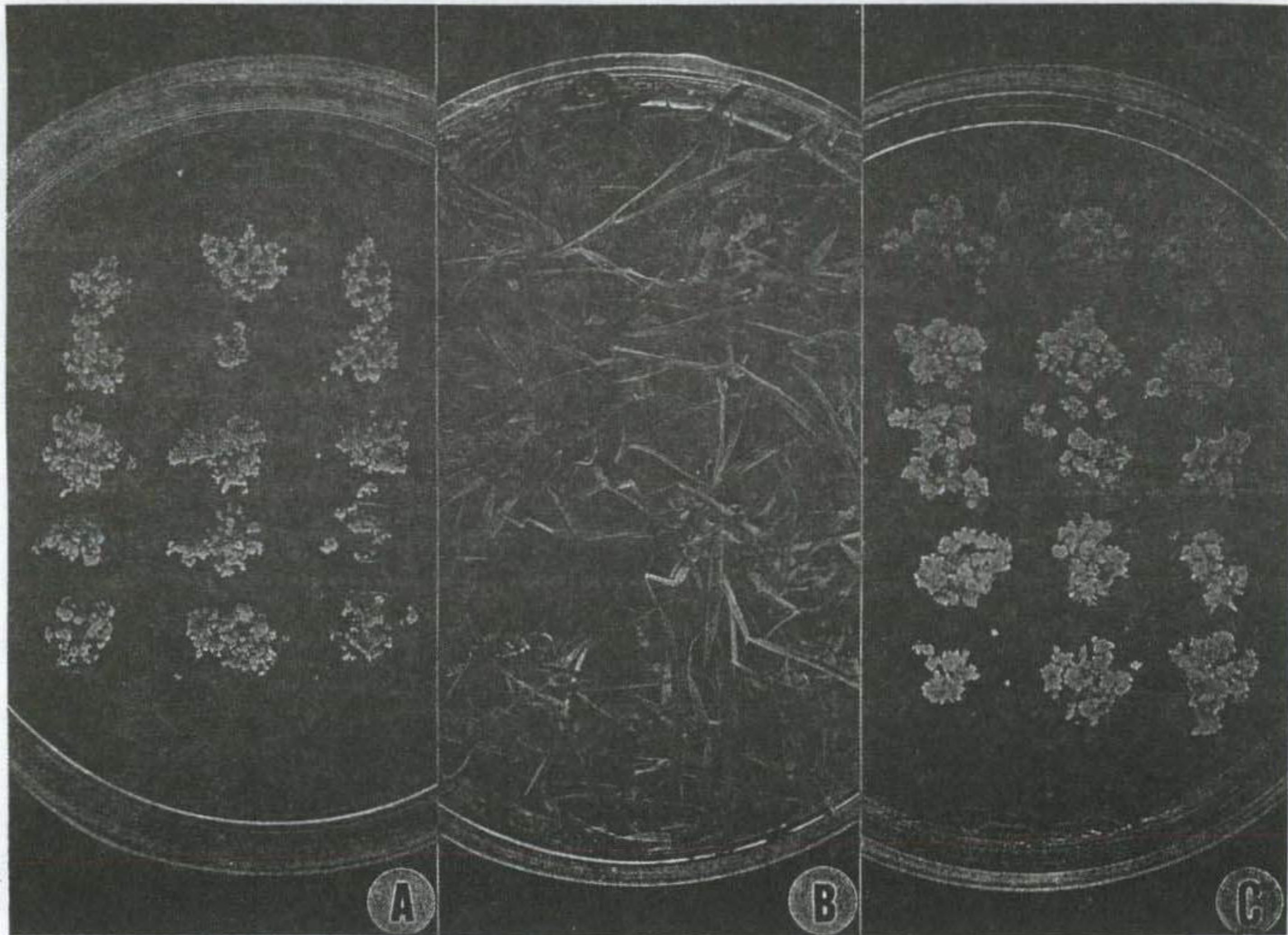
함에 따라 잘게 부서지고 증식 속도가 증가되었다. 배반조직으로부터 유도된 회고 단단한 캘러스가 액체배지에서 현탁배양을 통해 형태적으로 균일한 세포로 안정화되기까지는 2-3개월 이상의 기간이 소요되었다. 이렇게하여 안정화된 세포들은 현탁배양 개시 6개월 경과 후에도 높은 재분화율을 유지하였다.

재분화율은 재분화배지내의 ABA 농도와 무기질소원의 총합량에 따라 큰 변화를 보였으며 대체로 ABA의 농도가 낮고, 무기질소원의 총합량이 높은 처리구에서 높게 나타났다(Fig. 1, 2). 배양 4주 후 최고 90% 이상의 높은 재분화율이 1 mg/L ABA가 첨가된 처리구에서 나타났는데 이는 처리하지 않은 경우에 비해 12%까지 증가된 것이다. 그리고 5 mg/L 이상의 고농도에서는 재분화가 극히 저조하였다. 배양기간이 길어짐에 따라 전반적으로 재분화율도 증가하였는데 6주 후 특히 1 mg/L에서는 100%를 나타냈으며 이는 ABA를 첨가하지 않은 경우보다 23%까지 증가된 것이다. 또한 ABA를 처리한 조건에서는 처리하지 않은 조건에서 보다 재분화식물체가 더욱 왕성하게 성장하였으며 분

화되지 않은 캘러스도 갈변되지 않았으며 시간이 경과함에 따라 하나의 세포괴에서 보다 많은 수의 개체를 얻을 수 있었다.

ABA를 첨가하지 않았을 때에는 형태적으로 뚜렷한 체세포배를 관찰하기 어려웠으나 첨가하였을 때에는 세포괴는 다수의 구형으로 발달한 후 배반과 자엽초가 발달하는 일련의 배발생과정을 관찰할 수 있었으며, 또한 조직학적인 관찰을 통하여 진정종자의 배와 유사하게 자엽초와 배반이 잘 발달되어 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). ABA를 10 mg/L 이상 첨가하였을 때에는 재분화율은 10% 이하로 매우 낮았으나 6주이상 경과후에는 거의 대부분의 캘러스로부터 발아하지 않은 채 성숙과정 중에 있는 체세포배를 해부현미경하에서 관찰할 수 있었다. 이들을 선발하여 성장 조절제를 첨가하지 않은 N6 고체배지에서 2주 배양한 결과 총 74 개의 체세포배 중 약 85%가 발아하여 왕성한 성장을 하였다.

일반적으로 당근등의 쌍자엽 식물의 체세포배발생에서 ABA는 조기발아를 억제하고 형태적으로 완전한 체세포배



**Figure 1.** Plant regeneration from suspension-cultured cells of rice. The cells were cultured on regeneration medium (N61N5K) containing different concentrations of ABA and nitrogen content for 6 weeks.

A : Medium containing 10 mM nitrogen content without ABA ; B : 100 mM nitrogen content and 1 mg/L ABA (note that the frequency of plant regeneration was 100%) ; C : 100 mM nitrogen content and 50 mg/L ABA.



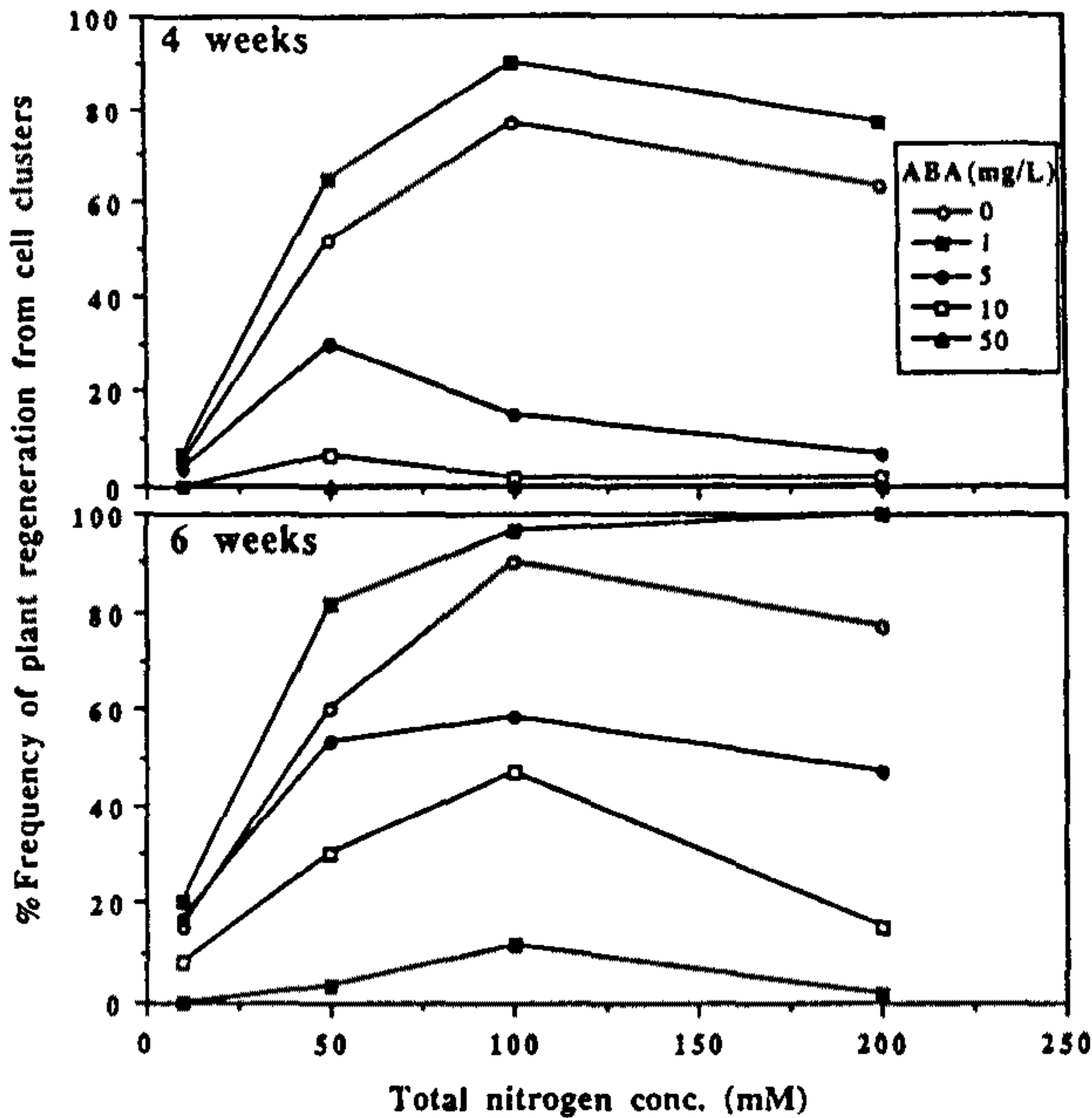


Figure 2. Effect of ABA and the total nitrogen content in N6 medium on plant regeneration from suspension-cultured cells of rice. The ratio of  $\text{NO}_3^-$  to  $\text{NH}_4^+$  in N6 medium was modified 3 to 1.

의 형성을 유도하는 효과가 있다(Ammirato, 1971, 1974, 1987). 단자엽식물에서도 밀의 캘러스배양에서 0.1-1.0 mg/L ABA를 첨가할 경우 배발생이 증가하며(Brown et al., 1989), 벼의 캘러스 유도시에도 ABA를 첨가함으로써 첨가하지 않을 때 보다 높은 빈도의 배발생캘러스를 얻을 수 있다(Kang et al., 1986). 또한 벼의 현탁배양세포괴를 재분화배지로 옮기기 전에 1-2주 정도 저농도의 ABA가 함유된 액체배지에 前培養함으로써 현탁배양된 세포괴의 식물체재분화 능력을 향상시킬 수도 있다(Kim and Sohn, 1991). *Pennisetum purpureum*의 체세포배발생에서 ABA는 비배발생 캘러스의 형성을 억제하고 체세포배를 유도하며 체세포배의 조기발아를 억제하여 체세포배를 성숙시킨다(Rajasekaran et al., 1987). 본 연구에서도 배지에 ABA를 첨가하지 않았을 때는 태백벼의 현탁배양 세포괴로부터의 뚜렷한 체세포배발생 과정을 관찰하기 어려웠으나, 첨가하였을 때는 재분화되는 기간은 더 걸리지만 여러 발생단계의 전형적인 체세포배를 확인할 수 있었던 것은 체세포배가 성숙되기 이전에 조기발아하여 식물체로 전환되었기 때문으로 생각된다. 그리고 고농도의 ABA 처리구에서 배양 4주와 6주간에 재분화율이 급격히 상승한 것은 뒤늦게 발생된 미성숙 체세포배가 ABA에 의해 조기발아가 억제되고 성숙배로 발달하는 시간이 요구된 것으로 보인다. 이때에 재분화율뿐만 아니라 세포괴당 재분화개체수도 급격히 증가되었다. 따라서 ABA는 태백벼의 현탁배양 세포괴로부터

체세포배를 유도하고 조기발아를 억제하여 체세포배를 성숙시키는 것으로 생각되며 이는 당근등의 쌍자엽 식물이나 다른 화분과 식물에 대한 이전의 보고와 대체로 일치한다.

재분화 배지내의 무기질소원의 농도 역시 재분화에 큰 영향을 미쳐 배양 6주 후 100 mM 이상 처리구에서 재분화율이 10-20% 증가하는 현상이 나타났다. 최대의 재분화율(100%)은 무기질소함량이 200 mM인 처리구에서 나타났으나 전반적으로 재분화율은 100 mM까지 급격히 증가하여 최대치를 나타내고 그이상에서는 다소 감소하였다(Fig. 2). 무기질소원을 50 mM이하로 첨가한 조건에서는 캘러스가 갈변이 되었는데, 특히 10 mM에서는 갈변이 심하여 6주경과 후에는 거의 모든 캘러스가 고사하였다.

무기질소원은 체세포배발생에서 가장 중요한 배지성분들 중 하나인 것으로 알려져 있다. Kamada와 Harada(1984)는 당근의 체세포배의 발달과정중의 아미노산의 함량변화에 대한 조사로부터 80% 에탄올 가용성분획에서 모든 아미노산의 양이 증가함을 관찰하고, 이것은 배지로부터 공급된 질소원의 대사결과로 보아 외부에서 공급된 환원형 질소원이 단백질 합성의 질소원이고, 효소의 활성증가에 의해 질소대사가 활발해지며 그 결과 빠른 세포증식에 의해 체세포배발생이 일어난다고 하였다. 즉, 외부에서 공급된 질소원이 체세포배발생의 선결조건인 활발한 질소대사의 공급원으로 사용된다는 것이다. 그리고 지금까지의 많은 보고에서 캘러스로부터의 식물체의 재분화에는 배지에 첨가된  $\text{NO}_3^-$ 와  $\text{NH}_4^+$ 의 비율이 3:1-8:1, 즉  $\text{NH}_4^+$ 의 비율이 상대적으로 낮은 경우에 재분화 및 체세포배발생이 잘 일어나므로 무기질소원으로서  $\text{NO}_3^-$ 와  $\text{NH}_4^+$ 의 비율이 체세포배발생에 중요하며 질소의 총합량은 영향을 주지 않는다고 하였다(Armstrong and Green, 1985; Grimes and Hodges, 1990; Talwar and Rashid, 1989). 그러나 이러한 보고들은 고정된 질소함량내에서 또는 25 mM-45 mM까지의 좁은 농도 범위내에서의 변화만을 본 것이다. 본 연구에서는 무기질소원으로서  $\text{NO}_3^-$ : $\text{NH}_4^+$ 의 비율을 3:1로 하고 총합량을 10 mM-200 mM까지 처리한 결과 무기질소원의 농도에 따라 뚜렷한 재분화율의 차이가 나타났고 캘러스의 유도과 증식시 사용되는 N6 배지내의 무기질소원의 함량보다 3배나 많은 100 mM에서 최대의 재분화율을 나타냈다는 것은 체세포배발생시의 신속한 질소대사를 뒷받침하는 것으로 보인다. 한편 10 mM에서는 많은 세포괴가 재분화가 되지않고 갈변하여 고사한 것은 체세포배발생시 요구되는 질소원의 절대량이 부족하였기 때문으로 추정된다. 그러므로 재분화 배지내의 무기질소원의 총합량 역시 태백벼 배양세포괴로부터의 체세포배발생에 중요한 영향을 미치는 것으로 생각된다. 그러나 처리된 ABA와 무기질소원의 총합량 사이에는 재분화율에 있어서 뚜렷한 상호작용(interaction)이 나타나지 않았으므로 이들 두 요소는 각각



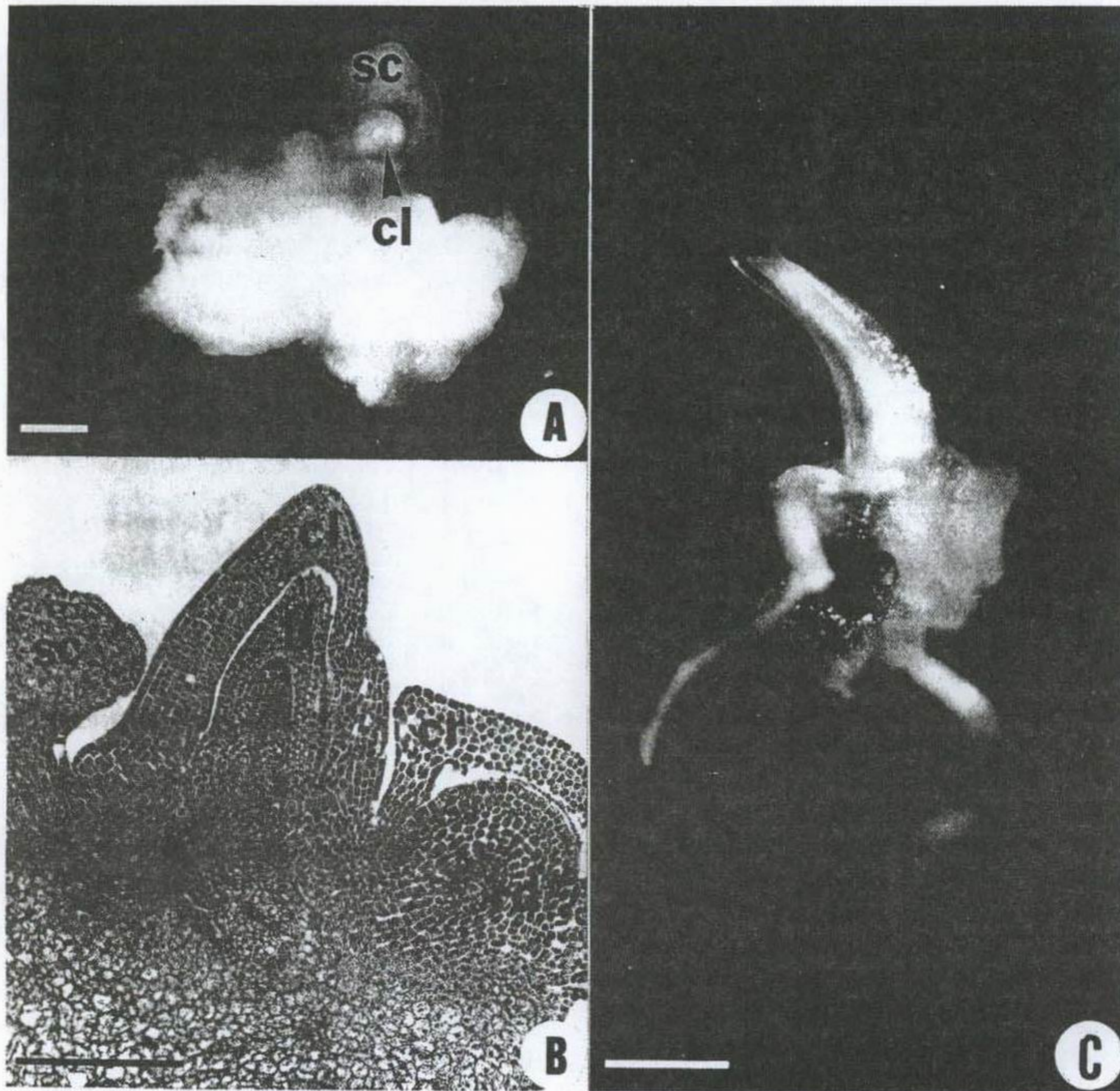


Figure 3. Somatic embryogenesis of rice (cl : coleoptile ; cr : coleorhiza ; fl : foliage leaf ; rd : radicle ; sc : scutellum).  
 A : Somatic embryo at early developmental stage (scale bar=1 mm) ; B : Longitudinal section of somatic embryo (scale bar=500  $\mu$ m) ;  
 C : Rice plantlet converted from somatic embryo (scale bar=10 mm).

독립적으로 재분화율 향상에 작용하는 것으로 사료된다. 태백벼의 현탁배양세포로부터 유리된 원형질체를 배양하여 얻은 캘러스의 재분화율은 단순히 Murashige와 Skoog(1962) 배지만 사용하였을 때 12-37%에 지나지 않았는데(Lee and Kim, 1991), 본 연구의 시스템을 이용할 경우 재분화율이 향상될 것으로 전망되며 이에 대한 실험이 현재 진행 중에 있다.

본 연구에서 태백벼의 현탁배양 세포피로부터 재분화에 대한 배지의 최적조건은 1 mg/L ABA와  $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ 가 3:1인 무기질소원의 총 함량을 100 mM로 한 것으로 나타났다. 이때 배양 6주 후 재분화율은 약 97%에 이르렀

다. 또한 이 조건에서 보다 생장이 왕성한 체세포배를 생산해낼 수 있었는데, 이러한 체세포배로부터 진정종자와 같은 종자강세(seed vigor)를 갖춘 인공종자 혹은 육묘생산도 가능할 것으로 전망된다.

### 적 요

태백벼의 미성숙배에서 유래한 현탁배양세포피로부터 체세포배발생을 통한 식물체 재분화체계를 확립하였으며 1 mg/L NAA와 5 mg/L kinetin이 첨가된  $\text{N}_6$  고체배지에서 재분화에 미치는 ABA 농도와 무기질소원( $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ ) =



3:1)의 총합량의 영향에 대해서 조사하였다. 0-1 mg/L ABA의 처리구에서 현탁배양세포괴(직경 0.7-1.5 mm)는 배양 6주후에 90% 이상이 재분화되었으며 ABA를 처리함으로써 보다 생장이 왕성한 개체가 분화되었다. 또한 무기질소원의 총합량이 100-200 mM일 때 95% 이상의 재분화율을 나타내었다. 그러나 처리된 ABA 농도와 무기질소원 총합량 사이에는 재분화율에 대한 뚜렷한 상호작용은 나타나지 않은 것으로 보아 이들 두 요소는 각각 독립적으로 재분화율 증진에 기여하는 것 같다.

## 사 사

본 논문은 과학기술처 특정과제(N80210)의 연구결과이다. 실험재료인 태백벼의 미성숙종자를 제공해준 충청남도 농촌진흥원 시험국 답작계 직원 여러분과 원고에 대해 세심한 논평과 수정을 가해준 객상수 박사에게 감사한다.

## 參 考 文 獻

- Abe T, Futsuhara Y (1986) Plant regeneration from suspension culture of rice (*Oryza sativa* L.). Japan J Breed 36 : 1-6
- Ammirato PV, Steward FC (1971) Some effects of the environment on the development of embryos from cultured free cell. Bot Gaz 132 : 149-158
- Ammirato PV (1974) The effects of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells caraway(*Carum carvi* L.). Bot Gaz 135 : 328-337
- Ammirato PV (1987) Organizational events during somatic embryogenesis. In CE Green, DA Somers, WP Hackett, DD Biesboer, eds, Plant Tissue and Cell Culture, Alan R. Liss, New York, pp 57-81
- Armstrong CL, Green CE (1985) Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. Planta 164 : 207-214
- Arnold SV, Hakman I (1988) Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA). J Plant Physiol 132 : 164-169
- Brown C, Brooks FJ, Pearson D, Mathias RJ (1989) Control of embryogenesis and organogenesis in immature wheat embryo callus using increased medium osmolarity and abscisic acid. J Plant Physiol 133 : 727-733
- Chen TH, Lam L, Chen SC (1985) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured young inflorescences of *Oryza sativa* L. (rice). Plant Cell Tissue and Organ Culture 4 : 51-54
- Close KR, Ludeman IA (1987) The effect of auxin-like plant growth regulators and osmotic regulation on induction of somatic embryogenesis from elite maize inbreds. Plant Science 52 : 81-89
- Grimes HD, Hodges TK (1990) The inorganic  $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$  ratio influences plant regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of indica rice (*Oryza sativa* L.). J Plant Physiol. 136 : 362-367
- Kamada H, Harada H (1981) Changes in the endogenous level and effects of abscisic acid during somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. Plant Cell Physiol 22 : 1423-1429
- Kamada H, Harada H (1984) Changes in endogenous amino acid compositions during somatic embryogenesis in *Daucus carota* L. Plant and Cell Physiol 25 : 27-38
- Kang KH, Kim KH, Chung TY (1986) Studies on somatic embryogenesis in rice. Korea J Plant Tissue Culture 13 : 149-159
- Kim KM, Sohn JK (1991) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.). Korean J Plant Tissue Culture 18 : 1-6
- Lee YH, Kim HI (1991) Plant regeneration from the protoplast of tong-il type rice (*Oryza sativa* L.) variety Taebaegbyeon. Korea J Plant Tissue Culture 18 : 7-15
- Ling DH, Chen WY, Chen MF, Ma ZR (1983) Somatic embryogenesis and plant regeneration in an interspecific hybrid of *Oryza*. Plant Cell Reports 2 : 169-171
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15 : 478-497
- Ozawa K, Komamine A (1989) Establishment of a system of high-frequency embryogenesis from long-term cell suspension cultures of rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet 77 : 205-211
- Peterson G, Smith R (1991) Effect of abscisic acid and callus size on regeneration of american and international rice varieties. Plant Cell Reports 10 : 35-38
- Rajasekaran K, Hein MB, Vasil IK (1987) Endogenous abscisic acid and indol-3-acetic acid and somatic embryogenesis in cultured leaf explants of *Pennisetum purpureum* Schum. Plant Physiol. 84 : 47-51
- Talwar M, Rashid A (1990) Factors affecting formation of somatic embryos and embryogenic callus from unemerged inflorescences of a graminaceous crop *Pennisetum*. Ann Bot 66 : 17-21
- Toranzo LB, Zapata FJ (1986) Anther culture in rice : IV. The effect of abscisic acid on plant regeneration. Plant Cell Reports 5 : 136-139
- Vasil V, Vasil IK (1982) Characterization of an embryogenic cell suspension culture derived from cultured inflorescences of *Pennisetum americanum* (Pearl millet, gramineae). Amer J Bot 69 : 1441-1449
- Wang MS, Zapata FJ, De Castro DC (1987) Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature seed and young inflorescence of wild rice (*Oryza perennis* Moench). Plant Cell Reports 6 : 294-296

(1991년 8월 31일 접수)



## 벼의 체세포배발생에 미치는 성장조절제와 삼투환경의 영향

민성란 · 정원중 · 김명국 · 송남희 · 유장렬\*

한국과학기술연구원 유전공학연구소 식물세포생물학연구실

### Effects of Growth Regulators and Osmotica on Somatic Embryogenesis in Rice (*Oryza sativa* L.)

Sung R. MIN, Won J. JEONG, Myoung K. KIM, Nam H. SONG, and Jang R. LIU\*

Plant Cell Biology Laboratory, Genetic Engineering Research Institute, KIST,

P. O. Box 17, Taedok Science Town, Taejeon 305-606

#### ABSTRACT

A high frequency plant regeneration system through somatic embryogenesis from zygotic embryo-derived suspension cultures of two Korean cultivars of rice (*Oryza sativa* L.) is described. The optimum levels of growth regulators in solid medium were 0.1-1.0 mg/L NAA and 5-10 mg/L kinetin. The frequency was enhanced even higher when the osmolarity of medium was adjusted with 0.1-0.3 M sorbitol, 3-6% sucrose, and 0.4-0.6% Gelrite: up to 95 and 85% of suspension-cultured microcalli of cultivars Taebaegbyeon and Hwacheongbyeon, respectively, plated on the medium gave rise to plantlets. Typical somatic embryos with distinct scutellum, coleoptile, and coleorhiza developed more frequently on media containing high concentrations of osmotica, suggesting that the previously reported same effect by ABA is mediated through osmotic regulation.

Key words: *Oryza sativa* L., osmoticum, plant regeneration, rice somatic embryogenesis

우수한 형질을 가진 기존의 벼 품종을 유전적으로 안정하게 대량 증식시키거나 유용유전자를 도입하여 새로운 품종을 개발하려면 배양세포로부터 식물체 재분화 체계를 확립할 필요가 있다. 벼의 재분화는 Ling 등(1983)의 보고를 필두로 하여 여러 조직에서 연구되어 왔으나 다른 화본과 작물에서처럼 일반적으로 재분화율이 낮고 품종간에 상당한 차이가 있으며, 배양기간이 길어짐에 따라 재분화 빈도가 현저히 감소하는 경향이 있다(Peterson and Smith, 1991; Abe and Futsuhara, 1986; Kim and Sohn, 1991). 따라서 배양된 세포의 재분화율을 안정적으로 유지할 수 있는 방법에 대한 연구가 계속되어 왔으며 그 결과 배발생

능이 높은 캘러스를 선별하여 동질화(homogenization)한 후, 성장조절물질의 농도 및 종류를 조절하는 방법이 제시되었다(Peterson and Smith, 1991; Ozawa and Komamine, 1989). 벼의 재분화는 주로 체세포배발생을 거친다는 많은 보고(Ozawa and Komamine, 1989; Siriwardana and Nabors, 1983; Wang et al., 1987)에서 체세포배를 형태적으로 명확하게 증명한 예는 거의 없었으나 최근 Jeong 등(1991)이 체세포배발생의 조직학적 증거를 제시하였다.

삼투환경이 높은 조건에서 진정종자의 배발생이 이루어지는 것처럼, 셀러리, 옥수수 등에서 배지내의 삼투조절제

농도를 변화시키고(Ammirato and Steward, 1971; Green et al., 1982) ABA를 첨가하면 체세포배발생이 향상되며(Ammirato, 1971, 1974) 또한 벼에서도 배지에 ABA를 첨가함으로써 전형적인 체세포배의 발생빈도가 향상된다(Jeong et al., 1991). 이것은 옥수수의 경우와 같이, ABA가 세포내의 osmolarity를 간접적으로 높임으로써 배발생능이 왕성한 세포의 분화를 촉진하는 삼투조절작용(Close and Ludeman, 1987)에 의한 것으로 볼 수 있다.

따라서 본 연구에서는 국내에서 재배되고 있는 재분화능이 안정적으로 높은 태백벼의 세포주(Jeong et al., 1991)와 화청벼의 세포주를 이용하여 최적의 재분화율을 나타내는 NAA와 kinetin의 농도를 결정한 후 osmolarity에 직접 영향을 주는 sorbitol, sucrose, Gelrite(agar) 등이 체세포배발생을 통한 벼의 재분화에 미치는 영향을 규명하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 캘러스 유도 및 현탁배양

태백벼(*Oryza sativa* L. cv Taebaegbyeo)의 세포주는 수분후 14일째의 미성숙배에서 유도한 것(Jeong et al., 1991)을 사용하였다. 화청벼(*O. sativa* L. cv Hwacheongbyeo)의 세포주는 성숙종자의 종피를 제거한 후 70% alcohol에 5분, 25%로 희석된 상업용 표백제(4% sodium hypochlorite)에 40분 처리한 후 멸균수로 3회 수세하여 표면 살균하고, 2 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS(Murashige and Skoog, 1962) 고체배지(0.8% Bacto-agar)에 치상하여 유도된 캘러스를 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 N6 액체배지에서 현탁배양(100 rpm, gyratory shaker)하여 얻었다. 계대배양은 일주일 간격으로 하였으며, 최소한 6개월이상 현탁배양으로 유지, 증식된 세포괴를 재분화를 조사에 이용하였다. 캘러스 유도 및 현탁배양은 25°C 암조건에서 행하였다.

#### 재분화에 미치는 성장조절물질의 영향

6개월 이상 현탁배양된 태백벼와 화청벼의 세포괴를 직경이 0.7-1.5 mm 크기의 stainless mesh로 걸러 N6 기본배지로 수세한 후 0, 0.1, 1.0, 10.0 mg/L NAA와 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 mg/L kinetin을 조합처리한 N6 배지(Gelrite 0.6%)에 페트리디쉬(90×15 mm)당 20개씩의 세포괴를 치상하였다. 각 처리구는 3반복으로 하여 28°C, 16시간 명조건(약 1000 lux)으로 배양하였으며 6주 경과후 재분화율을 조사하였다. 식물체 재분화율은 2 mm 이상의 shoot를 1개 이상 발생시킨 세포괴 수를 치상한 세포괴 수의 백분율로 구하였다.

#### 재분화에 미치는 삼투조절제의 영향

6개월 이상 계대배양된 태백벼와 화청벼의 세포를 stainless mesh로 걸러 직경 0.7-1.5 mm 크기의 세포괴를 페트리디쉬 당 20개씩 치상하였다. 사용된 배지는 1 mg/L NAA와 5 mg/L kinetin이 첨가된 N6배지(N61N5K)에 0.0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 M sorbitol, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8% Gelrite, 1, 3, 6, 9% sucrose를 조합 처리하였다. 처리당 반복수, 배양조건 및 재분화율 산출방법은 전술한 바와 같다.

### 결 과

#### 재분화에 미치는 NAA와 Kinetin의 영향

계대배양 6개월 후에는 비교적 동질의 세포괴로 구성된 현탁배양이 이루어지면서 증식이 더 빨라졌다. 태백벼와 화청벼의 세포괴는 NAA와 kinetin에 대한 재분화 경향은 유사하였으나 화청벼는 태백벼에 비해 재분화되는 속도가 느렸으며 재분화율도 전반적으로 훨씬 낮았다(Fig. 1). 두 품종 모두 kinetin 농도가 10 mg/L까지 증가함에 따라 재분화율도 높아졌으나 5 mg/L보다 높아지면 배양 4주경부터 캘러스에 갈변이 심하게 나타났으며 이미 발생된 식물체의 성장을 저해하였다. NAA가 첨가되지 않은 처리구에서는 배양초기에 캘러스가 갈변, 고사하는 현상이 두드러졌고

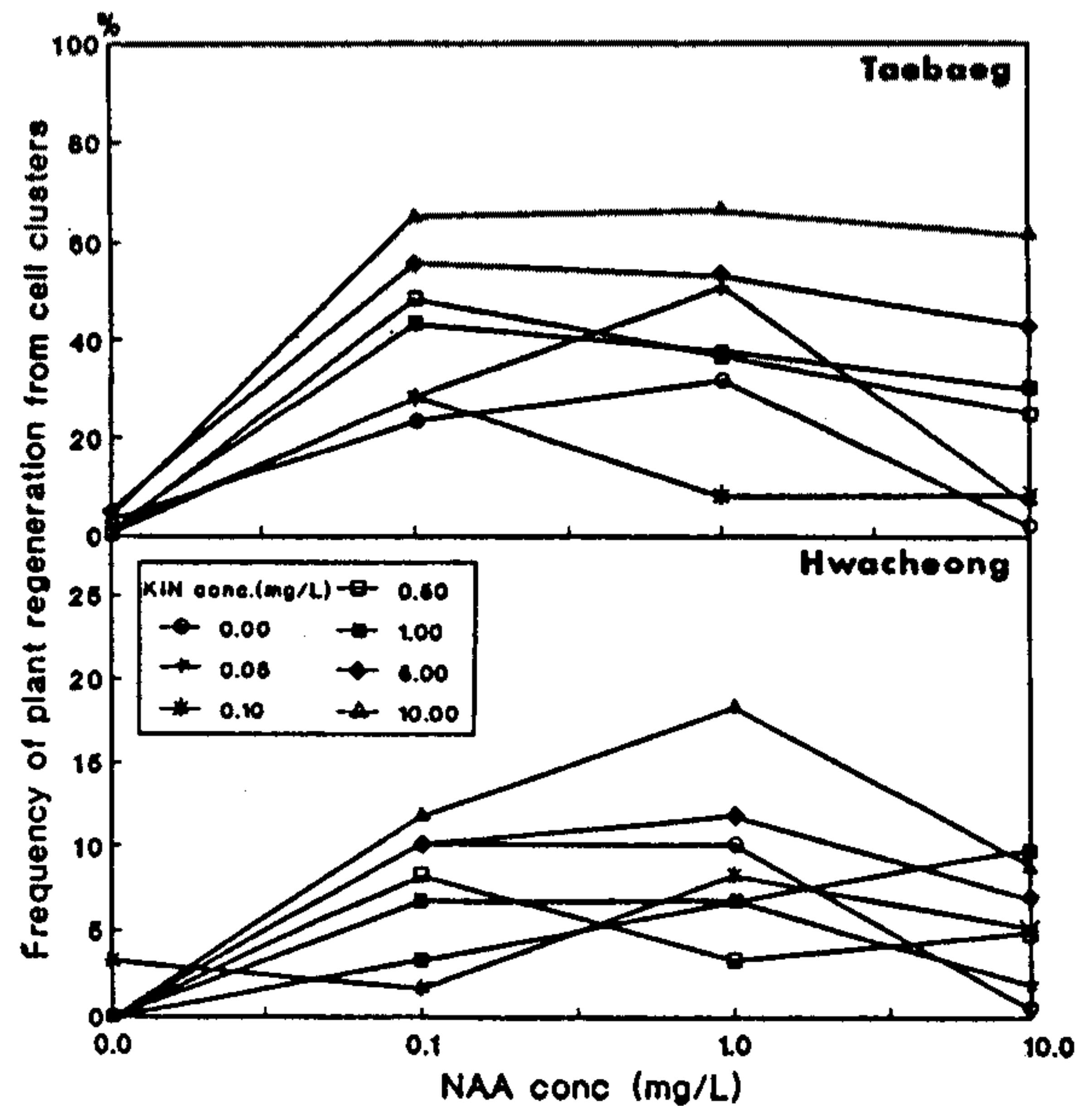


Figure 1. Effects of NAA and kinetin in N6 medium on plant regeneration from suspension-cultured cells of rice(*O. sativa* L. cv Taebaegbyeo and Hwacheongbyeo). The cells were cultured on N6 medium containing 6 mM proline, 100 mg/L casein hydrolysate, 0.6% Gelrite, and various concentrations of NAA and kinetin for 6 weeks.



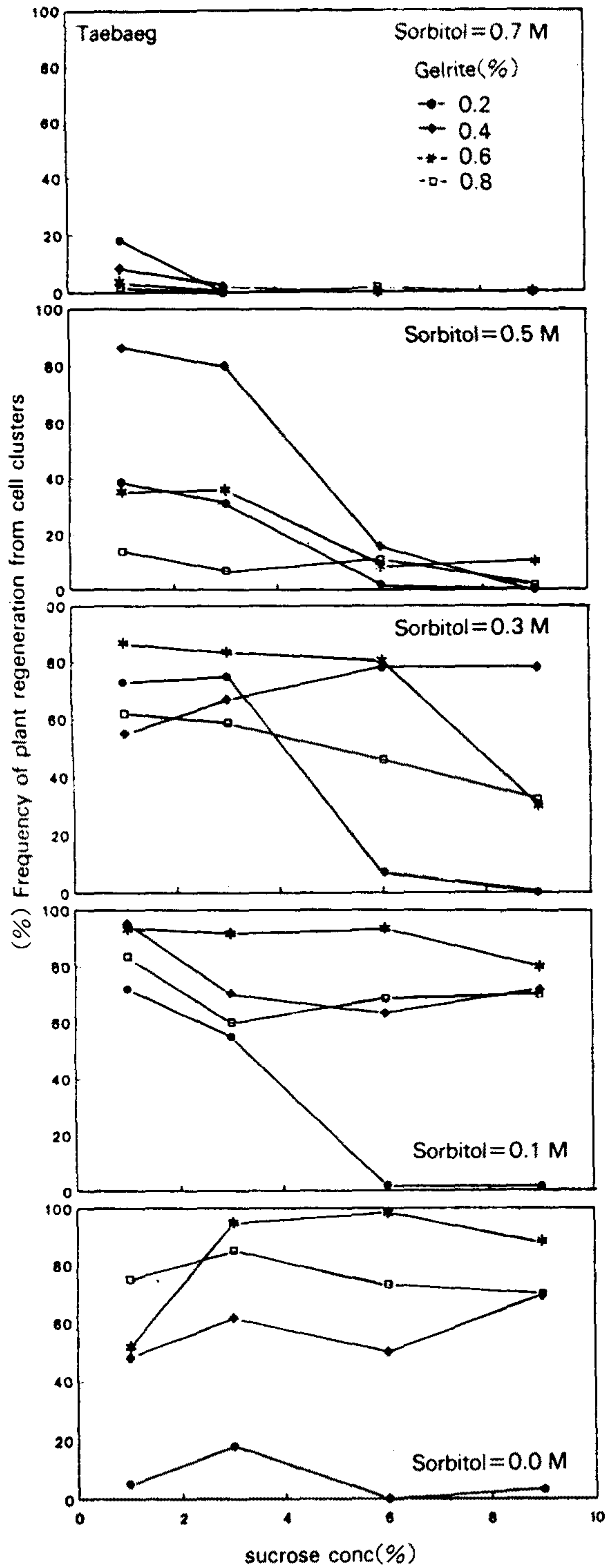


Figure 2. Effects of sorbitol, sucrose, and Gelrite on plant regeneration from suspension-cultured cells of rice (*O. sativa* L. cv Taebaegyeo).

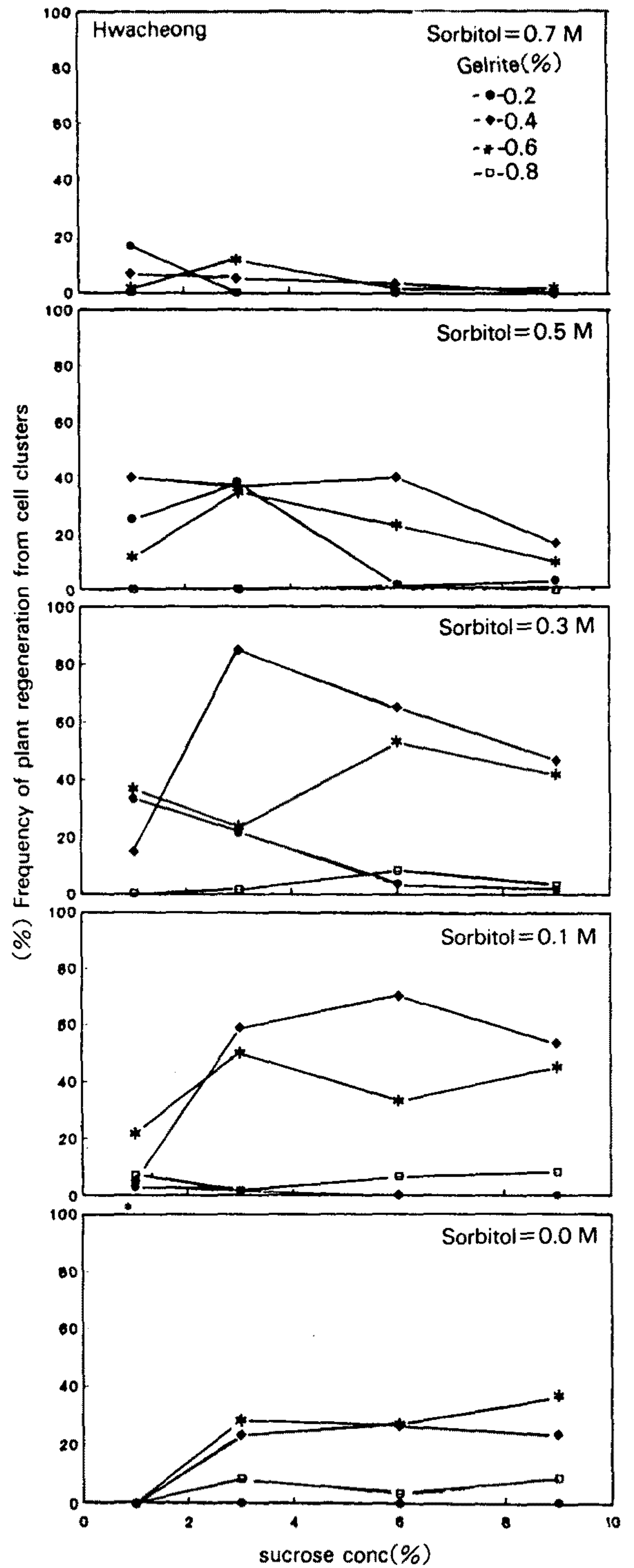


Figure 3. Effects of sorbitol, sucrose, and Gelrite on plant regeneration from suspension-cultured cells of rice (*O. sativa* L. cv Hwacheongbyeo).



NAA의 농도가 높아질수록 캘러스의 생장이 왕성하였다. 그러므로 태백 및 화청벼의 재분화를 최적화할 수 있는 NAA와 kinetin의 농도는 각각 0.1-1 mg/L와 5-10 mg/L였다. 그러나 NAA와 kinetin만의 조절로는 체세포배를 관찰하기 어려웠다.

#### 재분화에 미치는 삼투조절제의 영향

재분화율은 sorbitol의 농도가 0.1-0.3 M, sucrose 농도가 3-6%, Gelrite 농도는 0.4-0.6%에서 높고 이후 감소하였다. 태백벼의 가장 높은 재분화율은 95%였으며(Fig. 2) 화청벼는 85%로 나타났다(Fig. 3). 태백벼 및 화청벼의 현탁배양 세포괴로부터의 재분화과정이 체세포배발생과정을 거친다는 증거는 삼투조절물질의 농도를 높임으로써 확인할 수 있었는데(Fig. 4), 이는 배지에 삼투조절제 농도를 각각 sorbitol 0.1 M 이상, sucrose 6% 이상, Gelrite 0.4% 이상 높임으로써 뚜렷한 체세포배를 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 식물체 재분화는 세포괴로부터 다량의 구상구조 또는 organized structure로 발달한 후 배반과 자엽초를 가지는 일련의 배 발생 과정을 거치는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 낮은 Gelrite 농도, 특히 0.2%에서는 재분화 개체가 외형적으로 약하고 캘러스의 표면에 물기가 많아 friable하였다. 그러나 Gelrite 0.4%이상에서는 캘러스의 표면이 비교적 건조하였고 organized되어 초기단계의 구상형 체세포배 또는 배반의 외형을 나타냈다. 낮은 삼투조절제의 농도에 의한 낮은 체세포배발생 및 재분화율은 다른 삼투조절제의 농도를 높

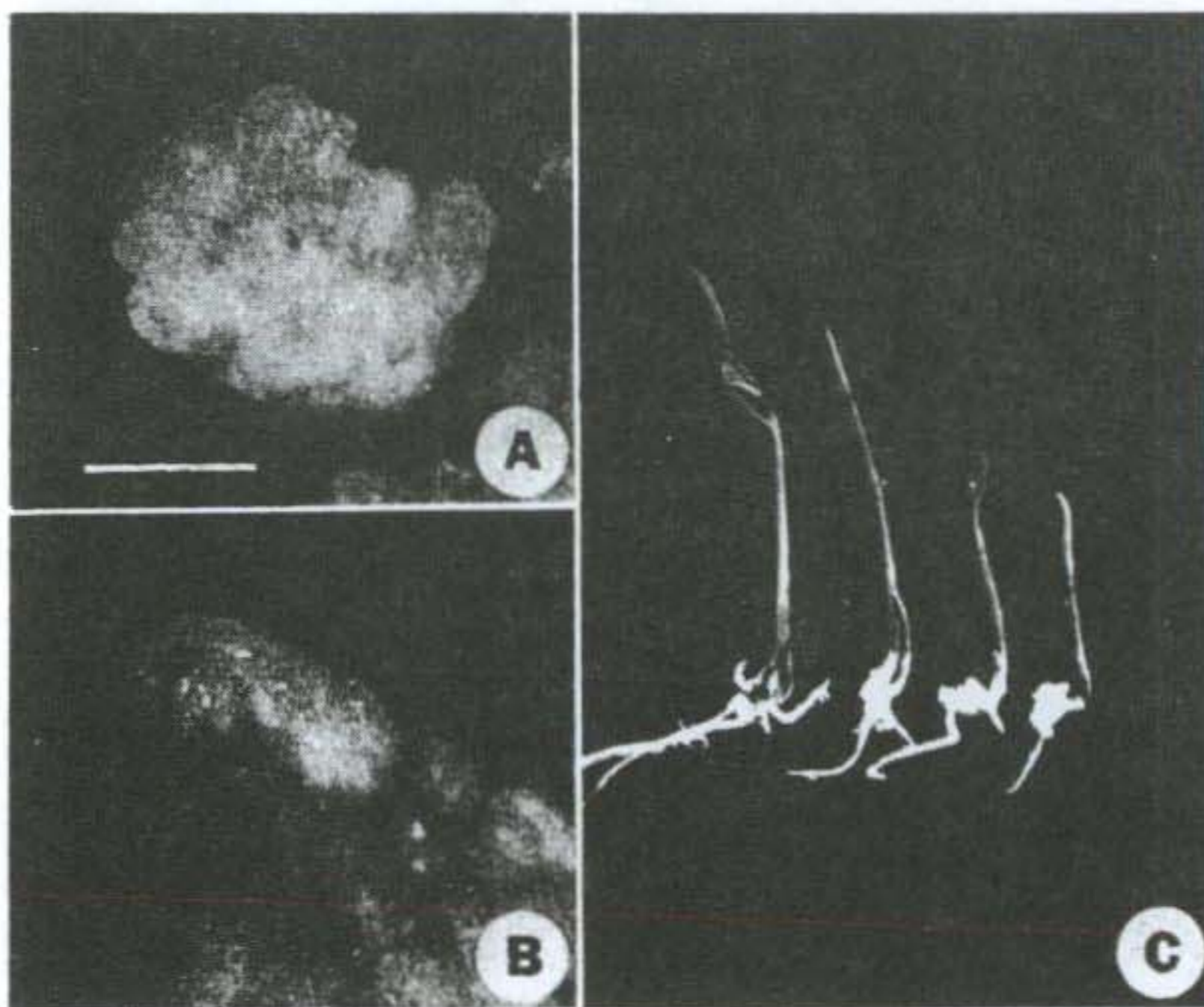


Figure 4. Plant regeneration through somatic embryogenesis from suspension-cultured cells of rice(*O. sativa* L. cv Taebaegbyeo).

A: Globular and organized structure; B: Somatic embryo; C: Rice plantlets converted from somatic embryos. Scale bar = 1 mm.

임으로써 보상될 수 있었다.

## 고찰

식물체 재분화에 대한 호르몬의 영향, 특히 cytokinin은 거의 모든 식물의 재분화에 영향을 주는 성장조절물질이다. 벼 등의 단자엽식물의 경우 auxin만으로는 재분화율이 낮아 cytokinin의 첨가로 보다 높은 재분화율을 얻을 수 있어 cytokinin의 중요성이 강조되었다(Kim and Sohn, 1991; Nayak and Sen, 1989; Raghava Ram and Nabors, 1984). 본 실험의 결과 NAA가 첨가되지 않았거나 10 mg/L의 kinetin에서는 갈변이 심하여 캘러스 및 식물체의 생장에 저해되었다. 따라서 태백벼 및 화청벼의 재분화에는 NAA와 10 mg/L 이하의 kinetin이 요구된다. 또한 삼투조절제의 농도가 높은 조건에서 재분화율이 낮은 이유는 2 mm 이상의 shoot를 발생시킨 세포괴의 수로 재분화율을 구함으로써 해부현미경하에서 쉽게 구별될 수 없는, 아직 발아하지 않은 극히 초기의 체세포배는 재분화율 조사에서 제외되었기 때문일 것이다. 6주이상 배양이 계속되었을 때 삼투조절제의 농도가 높은 처리구에서는 새로운 체세포배의 발아와 하나의 캘러스로부터 보다 많은 개체가 발생하였다.

본 연구에서 벼 체세포배발생에 있어서 삼투조절의 중요성을 밝힐 수 있었다. NAA와 kinetin의 조절만으로는 체세포배를 관찰하기 어려웠고 삼투조절제의 농도를 높임으로써 캘러스로부터 체세포배의 발달과정을 관찰할 수 있었는데, 그 이유는 Vasil(1982)에 의해 추정된 것과 같이 벼를 포함한 화본과에서 체세포배가 성숙되기 전에 발아하여 뚜렷한 체세포배의 관찰이 어렵거나 비정상적으로 발아하기 때문일 것이다. 따라서 진정종자의 배발달과정에서 배주위의 삼투환경이 높은 것처럼 배지에 삼투조절제를 처리하면 체세포배의 조기발아를 억제하고 정상적 배발달이 가능할 것이다.

고등식물의 배발생에서 ABA의 역할은 중요하다. ABA는 당근의 체세포배발생에서 내생함량이 심장형배 또는 어뢰형배 단계까지 증가한 후 감소하며(Kamada and Harada, 1981), 화본과인 진주조, 옥수수, 벼 등에서도 체세포배발생을 향상시킨다(Close and Ludeman, 1987; Jeong et al., 1991; Vasil and Vasil, 1982). 이같은 ABA의 역할은 외부 삼투환경 조절기능으로 생각할 수 있다. 즉 담배花粉에서 ABA가 mRNA합성을 억제하여 배발생을 유도한 것과 같은 결과를 mannitol에 의한 삼투환경조절로써 얻었으며(Harada and Imamura, 1983), ABA 처리에 의한 옥수수의 체세포배발생 향상이 고농도의 sucrose나 mannitol첨가와 같은 결과를 나타낸 것으로 보아 체세포배발생에 대한 ABA의 역할은 세포내에서의 삼투조절효과로 해석되었



다(Close and Ludeman, 1987). 따라서 본 실험의 결과 sucrose, sorbitol, Gelrite 등에 의한 직접적인 삼투조절로써 태백벼 및 화청벼의 체세포배발생이 향상된 것으로 보인다.

## 적 요

벼 현탁배양 세포괴로부터 체세포배발생을 통한 식물체 재분화에 미치는 NAA와 kinetin 그리고 삼투환경의 영향에 대하여 조사하였다. Kinetin의 농도가 높을수록 재분화율은 증가하는 경향을 보였으나 캘러스의 갈변이 심하였다. 식물체 재분화에 미치는 NAA와 kinetin의 최적농도는 각각 0.1-1.0 mg/L와 0.5-10.0 mg/L이었다. 또한 삼투조절제를 이용한 재분화에 대한 최적조건으로는 1 mg/L NAA와 5 mg/L kinetin이 첨가된 N6 배지에 0.1-0.3 M sorbitol, 3-6% sucrose, 0.4-0.6% Gelrite 등이 첨가된 것으로서 태백벼에서 95%, 화청벼에서 85%의 재분화율을 나타내었다. 삼투조절제의 처리로써 현탁배양 세포괴로부터 식물체 재분화는 체세포배발생을 거치는 것임을 확인하였다.

## 사 사

본 논문은 과학기술처 특정과제(N80210)의 연구결과이다. 실험재료인 태백벼의 미성숙종자를 제공해준 충청남도 농촌진흥원 시험국 답작계와 화청벼의 성숙종자를 제공해준 농촌진흥청 작물시험장 직원 여러분과 원고에 대해 세심한 논평과 수정을 가해준 곽상수 박사에게 감사한다.

## 참 고 문 헌

- Ammirato PV, Steward FC** (1971) Some effects of the environment on the development of embryos from cultured free cell. *Bot Gaz* 132 : 149-158
- Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY, Bi FY** (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiment on the nitrogen sources. *Sci Sin* 18 : 659-668
- Close KR, Ludeman LA** (1987) The effects of auxin-like plant growth regulators and osmotic regulation on induction of somatic embryogenesis from elite maize inbreds. *Plant Science* 52 : 81-89
- Green CE** (1982) Somatic embryogenesis and plant regeneration from the friable callus of *Zea mays*. In A Fujiwara, ed, Plant tissue culture 1982. 5th international congress of plant tissue and cell culture, pp 107-108
- Harada H, Imamura J** (1983) Factors that stimulate pollen embryogenesis. In Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement, proceedings of a workshop cosponsored by The Institute of Genetics, Academia Sinica and The International Rice Research Institute, Science Press, Beijing, China, pp 145-158
- Jeong WJ, Song NH, Min SR, Kim MK, Liu JR** (1991) Effects of ABA and the total inorganic nitrogen content on plant regeneration from cultured cells of rice (*Oryza sativa* L. cv Taebaegbyeon). *Korean J Plant Tissue Culture* 18 : 209-214
- Kamada H, Harada H** (1981) Changes in the endogenous level and effects of abscisic acid during somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Plant Cell Physiol* 22 : 1423-1429
- Kim KM, Sohn JK** (1991) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.). *Korean J Plant Tissue Culture* 18 : 27-32
- Ling DH, Chen WY, Ma ZR** (1983) Somatic embryogenesis and plant regeneration in an interspecific hybrid of *Oryza*. *Plant Cell Reports* 2 : 169-171
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 : 473-497
- Nayak P, Sen SK** (1989) Plant regeneration through somatic embryogenesis from suspension cultures of a minor millet, *Paspalum scrobiculatum*. *Plant Cell Reports* 8 : 296-299
- Ozawa K, Komamine A** (1989) Establishment of a system of high-frequency embryogenesis from long-term cell suspension cultures of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 77 : 205-211
- Raghava Ram NV, Nabors MW** (1984) Cytokinin mediated long-term, high-frequency plant regeneration in rice tissue cultures. *Z Pflanzenphysiol Bd* 113 : 315-323
- Siriwardana S, Nabors MW** (1983) Tryptophan enhancement of somatic embryogenesis in rice. *Plant Physiol* 73 : 142-146
- Vasil V, Vasil IK** (1982) Characterization of an embryogenic cell suspension culture derived from cultured inflorescences of *Pennisetum americanum* (Pearl millet, Gramineae). *Amer J Bot* 69 : 1441-1449
- Vasil IK** (1982) Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. In A Fujiwara, ed, Plant tissue culture 5th international congress of plant tissue and cell culture, pp 101-104
- Wang MS, Zapata FJ, Castro DCD** (1987) Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature seed and young inflorescence of wild rice (*Oryza perennis* Moench). *Plant Cell Reports* 6 : 294-296

(1991년 12월 7일 접수)