

## 벼 진탕 배 배양세포로부터 원형질체 분리 및 배양

黃 柏·金美卿·I. K. Vasil\*

(全南大學校 自然大學 生物學科, \*美國 플로리다大學校 植物學科)

### Isolation and Culture of Protoplasts Derived from Embryogenic Cell Suspension Culture of *Oryza sativa* (Rice)

Hwang, Baik, Mee Kyung Kim and I. K. Vasil\*

(Department of Biology, Chonnam National University and \*Department of Botany, University of Florida, Gainesville, Florida, USA)

#### ABSTRACT

Several cultivars of rice were examined for induction of embryogenic callus on a medium containing MS salts, vitamins and 2,4-D under darkness. Embryogenic callus was obtained from cultivar Cheonma with high ratio and embryo-like structures were formed from the callus on a medium with or without reduced 2,4-D. Somatic embryoids with a plumule and radicle axis surrounded by a scutellum were observed. These embryoids germinated and produced plantlets in 30 days on the same medium.

Protoplasts isolated from an embryogenic cell suspension culture derived from embryogenic callus were cultured either in liquid or in agar medium and protoplast derived cell colonies were obtained in 3-4 weeks.

#### 서 론

*In vitro*에서 세포나 callus로부터 식물체의 효과적인 분화는 체세포 유전학을 개량하는 기술 즉 원형질체 융합과 유전공학 등의 이용에 있어서 필수적이다.

벼 조직배양에서 형태 형성과정을 통하여 식물체의 재분화를 다룬 보고는 많이 있으나 (Kawata and Ishihara, 1968; Tamura, 1968; Nakano and Maeda, 1979; Abe and Futsuhara, 1985; Kang *et al.*, 1986) 재분화율은 항상 높지않았고 또 예견될 수가 없었다. 벼에서의 embryogenesis는 anther (Guha-Mukherjee, 1973; Genovesi and Magill, 1982), leaf (Wernicke and Brettel, 1980), Seed와 immature embryo (Heysler *et al.*, 1983) 및 immature panicles (Ling *et al.*, 1983)등 여러 부위에서 이루어 졌다.

본 논문에서는 곡물류, 특히 벼에 있어서 세포 융합 및 plasmid를 이용한 외래 유전자 발현에 관한 연구의 일환으로 식물체로의 분화가 가능한 embryogenic callus 및 embryo-like 구조의 유도 및 형성 등을 보고 이러한 과정을 형태적, 조직학적인 관찰에 의하여 확인하고 유도된 embryogenic callus를 이용한 embryogenic cell suspension culture를 하여 이에서 원형질체를 분리, 배양을 시도하였다.

이와 같은 embryogenic cell suspension culture로부터 totipotent protoplast를 얻을수 있으며 (Vasil and Vasil, 1984c) 이로부터 embryo, plantlet의 형성을 유도할 수 있다.

### 재료 및 방법

**Callus 유도.** Sced coat를 제거한 볍씨를 70% ethanol 및 5% Calcium hypochlorite에 15분, 6분간 각각 표면 살균하여 무균수로 3~4회 세척한 후 MS 배지(2.4-D; 3mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>, myo-inositol; 100 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>, casein hydrdyzate; 1 gl<sup>-1</sup>, sucrose; 30 gl<sup>-1</sup>)에서 배양(27°C, dark)하여 callus를 유도하였다.

**분화.** 위에서 유도된 callus중 embryogenic callus를 저농도(2.4-D; 0~0.02 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>, kinetin; 0~10 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>)의 호르몬이 첨가된 MS 배지에 옮겨 배양하여 embryoid를 얻었으며 식물체로 분화가 이루어진 것을 vermiculite에 배양한 후 흙을 넣은 pot에 옮겨 재배하였다.

**Embryogenic cell suspension culture.** Embryogenic callus를 이용하여 Vasil and Vasil (1984b)의 방법으로 embryogenic cell suspension culture를 유도하였으며 원형질체의 분리 재료로 사용하였다.

**형태 및 조직학적 관찰.** 시료를 FAA (Formalin-Acetic-Alcohol)에 고정하여 (overnight) ethanol series(35%~absolute)로 탈수한 후 embedding paraplast에 embedding한 다음 rotary microtome을 사용하여 10 μm로 Section하고 fast green, hematoxylin등으로 염색한 후 (Berly and Miksche, 1976) 광학현미경으로 관찰하였다. 한편 주사전자현미경 시료는 2% glutaraldehyde (in 0.1 M Na-cacodylate buffer, pH 7.2)에 전고정한 후 위의 cooled Na-cacodylate buffer(pH 7.2)로 세척한 다음 1% O.O<sub>4</sub> (in 0.1 M Na-cacodylate buffer, pH 7.2)에 후고정한 후 증류수로 세척한 다음 ethanol series (25%~absolute)로 탈수하여 (in 4°C), critical point drier (FL-949B, Balzer)에서 건조한 후 gold ion-coating (IB-2, Eico-Engineering)한 다음 Hitachi S-450 Scanning Electron Microscope로 관찰하였다.

**원형질체 분리 및 배양.** Embryogenic cell suspension culture에서 배지를 제거한 후 효소 처리 (Hwang and Hwang, 1986)로 원형질체를 얻어 KM liquid, solid (0.4% Sea Plaque agarose) 배지 (Kao and Michayluk, 1975)에서 배양하였다.

### 결과 및 고찰

**Embryogenic callus 및 embryogenic cell suspension 유도.** Table 1은 실험에 사용한 6가지 품종에서의 callus 및 embryogenic callus의 형성율을 표시한 것으로 천마에서 각각 85%, 25%로 가장

**Table 1.** Rate of formation of callus and embryogenic callus (EC) from several cultivars of rice

Cultivars	Callus(%)*	EC(%)**
Cheonma	85	25
Dobong	75	15
Kiho	75	10
Chugwang	73	15
Seonam	54	5
Weonpoong	5	0

\*  $\frac{\text{Number of seeds inducing callus}}{\text{Number of total cultured seeds}} \times 100$

\*\*  $\frac{\text{Number of embryogenic calluses derived from total callus}}{\text{Number of total calluses derived from seeds}} \times 100$

높았다.

한편 원뿔뿔에서는 callus 형성율이 극히 낮았으며 embryogenic callus의 형성은 관찰되지 않았다. 특히 Indica type에서도 이러한 현상이 보여 embryogenic callus 유도시 재료의 선택이 중요한 요인으로 작용할 수 있으리라 생각되었다.

Fig. 1은 천마에서 유도된 embryogenic callus (EC)를 나타낸 것으로 non-embryogenic callus(NEC)와는 색깔과 형태로 구별되어지는데 EC는 회고 단단하며 NEC는 노란색을 띠고 물기를 많이 함유하고 있었다. Vasil and Vasil (1984a)은 EC의 지속적인 유지를 위하여 배양초기 수 주일안에 callus집단에서 EC만 분리하여 따로 배양할 수 있고 수회 계대 배양을 하여 나머지 NEC도 모두 제거, EC만 배양이 가능하다고 보고하였다. 또한 계대 배양에 있어서의 시간 간격 및 2,4-D의 농도는 종에 따라 다양하다고 하며 *Panicum maximum* (Lu and Vasil, 1981)과 *Pennisetum purpureum* (Wang and Vasil, 1982)에서와 같이 빨리 성장하는 경우에는 배 10~14일, 다른 종류에 있어서는 보통 배 4주도 가능하였다. 벼에서도 배양 동안에 2,4-D의 농도가 저하되면 embryoid의 형성 및 분화로의 유도가 일어나므로 이와같은 EC의 유지를 위해서는 EC유도시 첨가한 농도 이상으로 유지하여야 한다.

한편 이와 같은 EC를 Vasil and Vasil (1984b)의 방법에 의하여 embryogenic cell suspension culture (Fig. 2)로 유도할 수 있는데 이와 같은 suspension은 벼를 포함한 화본과 식물에 있어서 totipotent protoplast를 얻는 유일한 방법으로 이용할 수 있다고 하였다(Vasil and Vasil, 1980; Lu *et al.*, 1981; Vasil *et al.*, 1983). 이러한 embryogenic cell suspension은 세포의 크기가 작고, 둥근모양이고 세포질이 풍부하며 starch grain을 함유하고 있어 non-embryogenic cell suspension과 구별이 되어진다.

Embryogenic cell suspension의 유도는 많은 쌍자엽 식물에서 이루어져 왔지만 화본과 식물에서는 아주 적은 종에서만 연구됐고 벼에서는 아직 보고가 없는 상태이므로 totipotent protoplast를 이용하는 genetic manipulation 등의 실험에 좋은 재료로 이용될 수 있다. 그러나 이와 같은 embryogenic cell suspension의 유도에는 사용하는 EC, 배지의 2,4-D농도, 계대 배양 등의 시기 등이 중요한 요인이 되고, 현미경적 관찰로 embryogenic cell suspension에 대한 확인도 필요한 사항으로 되어 있다.

**Somatic embryogenesis 및 형태적 관찰.** EC를 재분화 배지(2,4-D; 0.02 mg $l^{-1}$ , sucrose; 30-40 g $l^{-1}$ )에 옮겨 embryoid의 형성 및 재분화가 이루어지는 것을 확인하였다. 즉 EC로부터 구형의 embryoid가 형성되고 이로부터 shoot, root로의 분화가 이루어졌으며 현미경 관찰에서 scutellum (Sc) 및 coleoptile(CI)의 형성을 확인할 수 있었다(Figs.5-7). Figs.2-4는 embryoid들의 발달 과정을 보기 위하여 EC를 10  $\mu$ m 정도의 두께로 절단하여 광학현미경으로 조사한 것으로 Sc 및 CI의 형성이 관찰되고 특히 Fig.2와 4에서는 colcorhiza (CR)가 발달되어 있는 것도 볼 수 있었다. 한편 Abe and Futsuhara (1985) 및 Kang *et al.* (1986)은 벼에서 이러한 embryoid들의 형성 및 식물체로의 재분화 과정에는 casein hydrolyzate, 2,4-D 및 kinetin과 sucrose, proline, ABA 등이 영향을 준다고 하여 분화과정에서의 이들의 역할을 고찰하였다.

본 실험에서는 MS기본 배지에 2,4-D를 첨가하지 않은 배지와 첨가한 배지(0.02 mg $l^{-1}$ )를 사용하였는데 두 배지에서 모두 분화가 일어나는 것을 확인하였다.

Figs. 5와 7은 위의 embryoid형성 과정을 전자현미경으로 관찰한 것으로 Sc 및 CI의 형성이 완료된 것을 볼 수 있다. Figs. 8-10은 matured embryoid에서 shoot 및 root의 형성이 이루어지는 것을, Fig. 11은 이들을 화분에 옮겨 재배하는 것을 각각 보여주고 있다.

원형질체 분리 및 배양. Fig. 13은 위에서 얻은 embryogenic suspension cultured cell로부터 분리한 원형질체로 starch grain을 많이 함유하고 있는 것을 보여주고 있으며 Figs. 14-16은 이들 원형질체를 KM배지에 배양하여 분열이 진행되는 것을 보여주고 있다. 또한 Fig. 17은 이들 세포들의 지속적인 분열에 의한 colony형성을 보여주고 있는데 이들 colony로부터 callus가 유도되었다. 화본과 식물에서 non-embryogenic cell suspension culture로부터 얻은 원형질체의 배양에서는 shoot, somatic embryo, 또는 식물체의 재분화를 얻을 수 없었으나(Jones and Dale, 1982; Chourey and Zurawski, 1981) embryogenic cell suspension culture로부터 분리한 원형질체의 배양에서는 *Panicum maximum* (Lu et al., 1981), *Pennisetum purpureum* (Vasil et al., 1983)등에서 somatic embryo뿐만 아니라 green plant도 얻었다. 그러므로 화본과 식물에서의 genetic manipulation등 원형질체를 이용하는 실험에서는 본실험에서 유도한 바와 같이 embryogenic cell suspension culture를 원형질체 분리 재료로 사용하여야 한다고 생각된다.

## 적 요

벼 원형질체의 연속적인 배양 및 이를 통한 기체의 분화를 유도하기 위하여 몇가지 품종에서 embryogenic callus를 유도하고 이를 이용하여 embryogenic cell suspension culture를 하였다. Embryogenic callus형성은 2,4-D( $3 \text{ mg l}^{-1}$ )와 coconut milk(5%)를 첨가한 MS배지에서 천마에서 가장 높았고 체세포 배형성 과정을 통하여 개체로의 분화가 유도됨을 확인하였다.

또한 이러한 embryogenic callus를 몇가지 전처리후 totipotent protoplast를 얻기위하여 embryogenic suspension culture를 하였고 이에서 분리한 원형질체의 배양에서 지속적인 세포분열 및 colony가 형성되는 것을 확인하였다.

## 참 고 문 헌

- Abc, T. and Y. Futsuhara. 1985. Efficient plant regeneration by somatic embryogenesis from root callus tissues of rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Physiol.* **121**: 111-118.
- Berly, G.P. and J.P. Miksche. 1976. Botanical Microtechnique and Cytochemistry. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa.
- Chourey, P.S. and D.B. Zurawski. 1981. Callus formation from protoplasts of maize cell culture. *Theor. Appl. Genet.* **59**: 341-344.
- Genovesi, A.D. and C.W. Magill. 1982. Embryogenesis in callus derived from rice microspores. *Plant Cell Reports* **1**: 257-260.
- Guha-Mukherjee, S. 1973. Genotypic differences in the *in vitro* formation of embryoid from rice pollen. *J. Exp. Bot.* **24**: 139-144.
- Heyscr, J.W., T.A. Dykes, K.J. Demott and M.W. Nabors. 1983. High frequency, long term regeneration of rice from callus culture. *Plant Sci. Let.* **29**: 175-182.
- Hwang, S.J. and B. Hwang. 1986. Studies on the isolation and culture of protoplasts from cultured cells in rice. *Korean J. Plant Tissue Culture* **13**: 109-117.
- Jones, M.G.K. and P.J. Dale. 1982. Reproducible regeneration of callus from suspension culture protoplasts of the grass *Lolium multiflorum*. *Z. Pflanzenphysiol.* **105**: 267-274.
- Kang, K.H., K.H. Kim and T.Y. Chung. 1986. Studies on somatic embryogenesis in rice. *Korean J. Plant Tissue Culture* **13**: 149-159.

- Kao, K.N. and M.R. Michayluk. 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta* **126**: 105-110.
- Kawata, S. and A. Ishihara. 1968. The regeneration of rice plant, *Oryza sativa* L., in the callus derived from the seminal root. *Proc. Japan Acad.* **44**: 149-153.
- Ling, D.H., W.Y. Chen, M.F. Chen and Z.R. Ma. 1983. Somatic embryogenesis and plant regeneration in an interspecific hybrid of *Oryza*. *Plant Cell Reports* **2**: 169-171.
- Lu, C. and I.K. Vasil. 1981. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues of *Panicum maximum* Jacq. *Theor. Appl. Genet.* **59**: 275-280.
- Lu, C., V. Vasil and I.K. Vasil. 1981. Isolation and culture of protoplasts of *Panicum maximum* Jacq. (Guinea grass): somatic embryogenesis and plantlet formation. *Z. Pflanzenphysiol.* **104**: 311-318.
- Nakano, H. and E. Maeda. 1979. Shoot differentiation in callus of *Oryza sativa* L. *Z. Pflanzenphysiol.* **93**: 449-458.
- Tamura, S. 1968. Shoot formation in calli originated from rice embryo. *Pro. Japan Acad.* **44**: 544-548.
- Vasil, V. and I.K. Vasil. 1980. Isolation and culture of cereal protoplasts. II. Embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of *Pennisetum americanum*. *Theor. Appl. Genet.* **56**: 97-99.
- Vasil, V. and I.K. Vasil. 1984a. Induction and maintenance of embryogenic callus cultures of Gramineae. In, *Cell Culture and Somatic Genetics of Plants*, Academic Press, Vol. 1, pp. 36-42.
- Vasil, V. and I.K. Vasil. 1984b. Isolation and maintenance of embryogenic cell suspension cultures of Gramineae. In, *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Academic Press, Vol. 1, pp. 152-158.
- Vasil, V. and I.K. Vasil. 1984c. Isolation and culture of embryogenic protoplasts of cereals and grasses. In, *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Academic Press, Vol. 1, pp. 398-404.
- Vasil, V., D. Wang and I.K. Vasil. 1983. Plant regeneration from protoplasts of *Pennisetum purpureum* Schum (Napier grass). *Z. Pflanzenphysiol.* **111**: 233-239.
- Wang, D. and I.K. Vasil. 1982. Somatic embryogenesis and plant regeneration from inflorescence segments of *Pennisetum purpureum* Schum (Napier or Elephant grass). *Plant Sci. Lett.* **25**: 147-154.
- Wernicke, W. and R. Brettel. 1980. Somatic embryogenesis from *Sorghum bicolor* leaves. *Nature* (London) **287**: 138-139.

(1987. 12. 20. 接受)

### Explanation of Figures

- Fig. 1.** White and compact embryogenic callus (EC) and friable non-embryogenic callus (NC) 6 weeks after initial culture ( $\times 20$ ).
- Fig. 2.** Longitudinal sections of somatic embryo. Germinated embryoid showing scutellum (Sc) and coleoptile (Cl) ( $\times 25$ ).
- Fig. 3.** Mature embryoid with leaf primodium (LP) ( $\times 25$ ).
- Fig. 4.** Mature, slightly germinated embryoid showing plumule and radicle enclosed by coleoptile, coleorhiza (CR) and scutellum-like structure (Sc) ( $\times 20$ ).
- Figs. 5-7.** Scanning electron micrograph of typical well organized embryoid with a scutellum coleoptile ( $\times 500$ ).
- Fig. 8.** Germination of embryoid after 10 days on MS medium containing 0.02 mg/l 2,4-D ( $\times 40$ ).
- Fig. 9.** Plantlets formation after 15-30 days on MS medium ( $\times 15$ ).
- Figs. 10-11.** Plants regenerated via somatic embryogenesis.
- Fig. 12.** Embryogenic suspension cells (ESC). Note presence of the elongated non-embryogenic suspension cells ( $\times 200$ ).
- Fig. 13.** Freshly isolated protoplasts ( $\times 200$ ).
- Figs. 14-17.** Initial cell divisions and the formation of cell colonies ( $\times 250$ ).







