

벼의 소포자 배양을 통한 식물체 재분화

金永秀·田鍾聲·李光雄

(서울대학교 생물학과)

Plant Regeneration from Rice Microspore Cultures

Kim, Young-Soo, Jong-Seong Jeon and Kwang-Woong Lee

(Department of Biology, Seoul National University, Seoul)

ABSTRACT

Efficient plant regeneration system was established through the culture of rice (*Oryza sativa* L.) microspores. Microspores released by anther shedding culture developed into proembryos and calluses in B5 medium within two weeks of culture. The optimal hormone and carbon sources were dependent on the genotypes used. Microspore's viability decreased rapidly in culture time, therefore less than 3% of the total microspores were viable at the 9th day when the first microspore division was observed. Of two types of microspores (pollen dimorphism) observed in culture, only the P-grain, larger microspores than normal ones was able to divide. Using 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) fluorescence staining, it was confirmed that the symmetrical division of uninucleate microspore was the first step leading to continuous microspore development. Microspore-derived proembryos and calluses were regenerated to plants in N6 medium containing 1 mg/L NAA and 5 mg/L kinetin, and 78.3% of the regenerated plants were haploids.

서 론

약(anther) 배양과 소포자 배양을 통하여 식물체를 재분화시키려는 노력들이 경제적으로 유용한 식물들인 벼(Niizeki and Oono, 1968; Chen *et al.*, 1981; Gupta and Borthakur, 1987), 보리(Datta and Potrykus, 1989; Kuhlmann and Foroughi-Wehr, 1989; Kao *et al.*, 1991), 밀(Chu *et al.*, 1990) 및 옥수수(Pescitelli *et al.*, 1990; Gaillard *et al.*, 1991)를 포함한 여러 화분과 식물에서 시도되었다. 이것은 소포자가 하나의 세포로 구성되어 있기 때문에, 단세포에서 완전한 식물체에 이르기까지의 발달기작을 연구하는 데 좋은 재료가 될 수 있을 뿐만 아니라, 동형접합성의 이배체를 얻을 수 있다는 점에서 육종을 통한 품종 개량의 도구로서 이용될 수 있기 때문이었다. 그러나 최근에는 단순히 배양을 통한 식물체의 재분화라는 측면보다는 배우체 경로를 따라야 하는 소포자가 배양을 통해 어떻게 조포체 경로로 바뀌어지는가에 대한 분자생물학적인 연구와 더불어, 소포자 혹은 소포자 유래의 원배(proembryo)를 microinjection(Neuhaus *et al.*, 1987; Bolik and Koop,

1991), electroporation(Joersbo *et al.*, 1990) 및 particle gun 기법(Creissen *et al.*, 1990)을 통한 유전자 직접 도입으로 유용한 형질을 갖는 형질전환식물체를 얻고자 하는 연구들이 행해지고 있다. 특히 약 배양이나 소포자 배양을 통해 형성된 캘러스는 우수한 배발생 능력을 갖고 있음이 확인되어, 원형질체 배양과 함께 이를 통한 형질 전환의 연구에 널리 이용되고 있다(Datta *et al.*, 1990a, 1990b; Mitchell and Petolino, 1991).

벼에 있어서는 최초로 약 배양을 통하여 식물체 재분화(Niizeki and Oono, 1968)에 성공한 이후로 많은 실험들이 행해져 왔지만, 대부분의 연구에서는 고체 배지상에서 약을 배양함으로써 소포자의 분열과정에 대한 연구와 소포자로부터의 식물체 유도 효율은 극히 낮았다(Gupta and Borthakur, 1987). 그러나 일본형 벼와 인도형 벼를 대상으로 약을 액체 배지에서 전배양한 후 기계적으로 소포자를 방출시킨 다음 분열을 유도하여 식물체를 얻는 방법이 개발되었고(Cho and Zapata, 1988, 1990), anther shedding 배양을 통해서도 다수의 생식가능한 식물체를 얻을 수 있었으며(Datta *et al.*, 1990a), 소포자로부터 유도된 배발생

세포주를 재료로 하여 높은 효율로 형질전환된 개체를 얻었다(Datta *et al.*, 1990b). 유체를 비롯한 쌍자엽 식물과 (Chuong and Beversdorf, 1985; Swanson *et al.*, 1987), 밀과 보리같은 일부 화분과 식물에서는 소포자로부터 배발생을 통한 식물체의 재분화가 가능한 것으로 알려져 있고 (Chu and Hill, 1988; Datta and Potrykus, 1989) 이를 위한 배양 조건도 어느 정도 확립되어 있지만(Kao *et al.*, 1991), 벼의 경우 소포자 배양에 적절한 호르몬과 탄소원의 종류 및 농도가 보고된 사례는 없었다.

화분에 이형성이 존재한다는 것이 알려진 이후로(La Cour, 1949) 소포자 배양에 있어서는 두 가지 type의 소포자 모두가 분열을 하는 것이 아니라, 소수의 비정상적인 소포자만이 조포체로 분열하는 능력을 갖고 있다고 보고되었는데(Horner and Street, 1978), 최근에는 화분을 S 및 N의 두 group으로 나누어 S 화분의 경우 세포질이 작고, 크기가 작으며, 핵이 뚜렷이 식별되어 이들만이 조포체로 변할 수 있는 반면, 대다수를 점하는 정상적인 N 화분은 분열을 할 수 없는 것이라고 규정하였다(Heberle-Bors, 1985). 벼의 경우에 있어서도 이러한 구분에 근거하여 약을 저온처리하면 S 화분이 증가하고, S 화분이 많은 품종에서 캘러스 유도율이 높다는 보고가 있었다(Kim *et al.*, 1990). 그러나 이에 상반된 실험결과로는, 분열능이 있는 소포자는 일반적인 S 화분의 특징에는 부합되지만 크기가 정상 소포자에 비해 큰 것(P-grain)이라고 주장되고 있어(Cho and Zapata, 1988, 1990) 이에 대한 명확한 설명이 필요한 실정이다. Heberle-Bors(1985)는 이러한 비정상 소포자의 출현빈도는 식물체가 자란 환경요인과 유전자형에 따라 달라진다고 하였는데 일장의 조절, 저온처리, 화분의 불염성을 유도하는 쪽으로 환경 요인을 조절함으로써 P-grain이 얻어질 수 있다고 보고하였다. 일반적으로 소포자 배양이 어려운 것으로 알려진 인도형 벼의 경우에는 일본형(30%)에 비해 상대적으로 적은 수(10%)의 P-grain을 갖고 있기 때문인 것으로 밝혀졌다(Raghavan, 1988).

소포자가 단핵상태에서 분열을 통하여 조포체를 이루는 경로에 대한 연구는 배양을 통해 소포자의 발달 경로가 바뀌어진다는 측면에서 대단이 중요한데, 크게 다섯 가지의 경로가 존재하여 식물에 따라 각기 다른 경로를 통해 식물체로 발달하는 것으로 알려져 있다(Raghavan, 1986). 십자화과 식물의 경우 배양 초기에 일시적인 고온 처리를 가함으로써 단핵이 동등한 두 개의 핵으로 분열하도록 유도될 수 있음이 입증되었으며(Hamaoka *et al.*, 1991), 벼의 경우 소포자의 발달 경로를 바꾸어 줄 수 있는 요인으로서 배양 전의 저온처리와 배양 초기의 sugar starvation 등(Kyo and Harada, 1986)이 제시되고 있으나 정확한 증거는 보고된 바 없고, 관찰되는 주된 소포자 분열의 경로로는 하나의 핵이 분열하여 동등한 두 개의 핵이 생겨나고, 이를

통하여 다핵의 소포자와 원배가 형성되는 양상과 드물게는 핵분열을 통하여 형성된 두 핵 중 어느 한 핵만이 분열을 계속하고 나머지 한 핵은 그대로 있거나 수 회의 분열에 그치는 현상이 발견된다고 보고되었다(Zapata and Torrizo, 1988).

이상에서 살펴본 바와 같이 벼 소포자를 재료로 하여 많은 연구들이 행해졌음에도 불구하고, 국내·외의 연구는 대부분 육종과 형질전환을 위한 재료라는 실용적인 측면에만 그 초점이 국한되었으며, 소포자의 초기 분열상에 대한 조사와 적절한 배양 조건에 대한 연구는 미진한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 벼의 국내 품종을 대상으로 소포자 배양에 적합한 호르몬의 농도, 탄소원의 종류 및 농도와 각 품종이 가지는 유전자형의 효과를 조사하여, 배양 중 나타나는 화분 이형성(pollen dimorphism)에 주목하여 정보보다 큰 소포자인 P-grain만이 생존하고 분열할 수 있음을 입증하고, 나아가 그 분열양상을 세포학적 방법을 통해 관찰하였다. 그리고 이를 통해 소포자로부터 식물체에 이르는 효율적인 재분화 체계를 확립하였다.

재료 및 방법

식물 재료 및 배양 조건. 본 실험에서 재료로 사용된 벼(*Oryza sativa* L.)는 농촌진흥청 작물시험장 인공기상실과 호남작물시험장에서 재배한 일본형 품종인 동진벼, 관악벼 및 화성벼를 분양받은 것이다. 열이간 길이가 5~7 cm일 때 이삭(panicle)을 채취한 후, 습도를 유지하기 위해 비닐백에 밀봉하고 이 상태로 8°C에서 10~14일간 저온처리하였다. 저온처리된 이삭을 2% sodium hypochlorite 용액에서 20분간 표면살균하고 멸균한 2차 증류수로 3회 세척한 다음, floret으로부터 분리해낸 약을 재료로 사용하였다. 소포자로부터 원배와 캘러스를 유도하기 위한 기본 배지로는 B5 salt에 B5 vitamin, 1 g/L casein hydrolysate, 100 mg/L myo-inositol을 첨가한 배지(pH 5.7)를 사용하였으며, 배양조건은 27°C 암상태하에서 페트리디쉬에 7 mL씩 액체배지를 분주하고 mL당 10개의 밀도로 약을 띄웠으며, 배양 3주 후에 결과를 측정, 조사하였다.

원배와 캘러스 유도에 미치는 호르몬과 탄소원의 효과. 원배와 캘러스 유도에 미치는 품종별 적정 호르몬의 농도를 조사하기 위하여 동진벼, 관악벼에 대해서 탄소원으로서 4% sucrose를 첨가한 위와 동일한 조성의 배지에 호르몬이 들어 있지 않은 처리구와 0.2/0, 0.2/0.2, 0.2/0.5, 0.2/1.0, 0.2/2.0, 0.2/5.0의 2,4-D/NAA (mg/L) 혼합처리구를 사용하였다. 또한 품종별로, 적절한 탄소원의 종류와 농도를 조사하기 위하여 호르몬으로서 0.2/2.0 (mg/L), 2,4-D/NAA가 첨가된 동일조성의 배지에서 0, 2, 4, 6, 8%로 sucrose 및 maltose의 농도를 달리하면서 동진벼, 화성벼 및

관악벼에서의 효과를 조사하였다.

화분 이형성의 관찰과 생존율 조사. 소포자 배양 중 나타나는 화분 이형성을 관찰하기 위하여 배지내로 방출된 소포자의 현탁액을 0.5% neutral red 용액(w/v)과 혼합하여 관찰하였고, 또한 배양기간의 경과에 따른 전체 소포자의 생존율을 3일 간격으로 산출하였는데, 배지내로 방출된 소포자는 그 자체로, 그리고 약 안에 들어 있는 소포자는 주사기 피스톤으로 부드럽게 마쇄하여 약에서 분리시킨 후 100g, 10분간 원심분리하여 가라앉은 소포자 층을 재료로 사용하였으며, 생존율은 fluorescein diacetate(FDA) 형광 염색과 alcohol dehydrogenase(ADH) 활성을 이용하여 산출하였다. FDA 형광염색의 경우 소포자 현탁액 한 방울과 FDA 용액(3 mg/mL을 acetone에) 한 방울을 섞은 후 Olympus BH-2 형광현미경하에서 관찰하였고, ADH 활성의 경우 Stinson과 Macarenhas(1985)의 방법을 수정하여 사용하였는데, 0.1 M 인산 완충용액(pH 7.3)에 소포자 현탁액을 섞어, -20°C에서 30분간 냉동시킨 후 27°C에서 30~40 rpm으로 교반해 주면서 녹인 다음, 86 mM 인산완충용액(pH 7.6), 0.3 mM nitro blue tetrazolium, 1.0 mM β -nicotinamide adenine dinucleotide(NAD), 9.5% ethanol로 구성된 용액에서 2~3시간 반응시킨 후 100% methanol을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 생존율은 최소 600~1,000 개의 소포자를 관찰하여 산출하였다.

두 소포자 type의 분리. 화분 이형성 관찰을 통하여 확인된 두 type의 소포자를 따로 분리하여 각각에 대한 생존율과 전체 소포자 중에서 정상보다 큰 P-grain의 상대적인 출현빈도를 계산하기 위하여, 소포자 현탁액을 20, 40, 60, 80%(w/v)로 구성된 sucrose 밀도구배에서 650g로 20분간 원심분리하여 두 소포자층을 분리해낸 후, 처음 배양했던 배지로 2회 원심분리(100g, 5 min)하여 sucrose를 세척한 다음, 위와 동일한 방법으로 각 소포자층에 대한 생존율을 조사하였다.

소포자의 초기 핵분열상 관찰. 소포자의 초기 핵분열상은, 배지에 방출된 소포자를 전도현미경을 사용하여 배양 1주일 후부터 매일 관찰하였으며, 또한 소포자 현탁액을 DNA 특이적인 동량의 DAPI 용액(2.33 μ g/mL)과 혼합하여 상온에서 10분간 방치한 후 Nikon Epifluorescence microscope에서 관찰하였다(Coleman and Goff, 1985).

원배 및 캘러스의 재분화. 크기가 2 mm 이상으로 자란 원배와 캘러스는 배양 4주 이후 약 1주 간격으로 유도 배지에서 꺼내어 5% sucrose, 1 mg/L NAA, 5 mg/L kinetin, 0.4% Phytigel, 100 mg/L myo-inositol을 포함하고 있는 N6 배지(pH 5.7)에 옮긴 다음 27°C 16시간 광조진하에서 재분화시켰다. 줄기와 뿌리가 형성된 유식물체는 호르몬이 첨가되지 않고, 1/2 N6 salt, 100 mg/L myo-inositol, 0.3% Phytigel, 3% sucrose를 포함한 배지(pH 5.7)로 옮겨 약

7~10 cm까지 성장시킨 후에는 뿌리의 Phytigel을 제거한 다음, 1/2 MS salt가 포함된 배양액에서 비닐을 덮은 채 수경재배하였다. 대기상태에 적응시키기 위해 2~3일 후부터 비닐을 조금씩 벗겨낸 다음, 1주일 후 온실로 옮겨 성장시켰다.

염색체 분석. 재분화된 식물체의 근단을 채취하여 2 mM 8-hydroxyquinoline 용액에서 2시간, 75 mM KCl 용액에서 20분간 각각 처리한 후 효소용액(5% cellulase Onozuka R-10, 5% macerozyme R-10, 1% pectinase, pH 4.0)에서 37°C 1.5시간 동안 해리시킨 다음, 증류수로 3회 세척하고 methanol과 acetic acid가 3:1(v/v)의 비율로 혼합된 고정액으로 30초간 고정한 후 1.5% Giemsa 용액을 사용하여 squash method로 염색체를 관찰하였다.

결 과

소포자 배양. 배양된 소포자는 배지내로 방출된 후에 분열하거나 약내에서 분열하여 원배로 발달한 상태에서 배지로 분리되었다. 소포자의 분열은 품종에 따라 약간의 차이가 있었으나 관악벼와 화성벼에서는 배양 9일째부터, 동진벼에서는 12일째부터 최초 분열이 관찰되었으며, 관악벼와 화성벼의 경우 배양 초기부터 배지로 방출되는 소포자의 수가 많았고, 이들 소포자들이 분열하여 원배로 발달하였으나(Fig. 1A), 동진벼의 경우 방출되는 소포자의 수가 적고, 대신 약 안에서 발달한 원배들(Fig. 1B)이 약으로부터 배지내로 분리되어 나오는 것이 주된 양상이었다. 원배는 구형배까지는 전형적인 배발생의 단계를 거치지만, 극히 일부만이 완전한 배의 형태로 발달하였고 시간이 경과하면서 캘러스로 되었다.

원배와 캘러스 유도에 미치는 호르몬 및 탄소원의 효과. 원배와 캘러스 유도에 미치는 품종별 적정 호르몬의 농도를 조사한 결과, 품종에 따라 호르몬의 효과가 약간은 다르게 나타났지만, 호르몬이 첨가되지 않은 배지에서는 동진벼와 관악벼 모두에서 소포자가 거의 분열되지 않았으며, 동진벼의 경우 어떤 특정한 처리구에서만 높은 효율을 보이지 않았다. 관악벼의 경우 0.2 mg/L 2,4-D 단독 처리구와 0.2/5.0, 2,4-D/NAA(mg/L) 혼합 처리구에서 각각 112.9%와 151.0%의 높은 유도효율을 나타냈다(Table 1). 또한 원배와 캘러스 유도에 미치는 탄소원의 종류와 농도를 조사한 실험의 경우, 품종에 따라 약간의 다른 양상을 보였는데(Table 2), 먼저 탄소원이 없는 처리구에서 동진벼와 화성벼에서는 100개의 약당 각각 49.3개와 13.1개의 원배와 캘러스가 유도되었으나, 관악벼에서는 전혀 유도되지 않았다. 탄소원 종류에 따른 효과에 있어서도, 동진벼의 경우 sucrose와 maltose에서는 뚜렷한 차이가 발견되지 않았으며, 화성벼의 경우, 전반적으로 sucrose가 maltose에 비해 높은 효과를

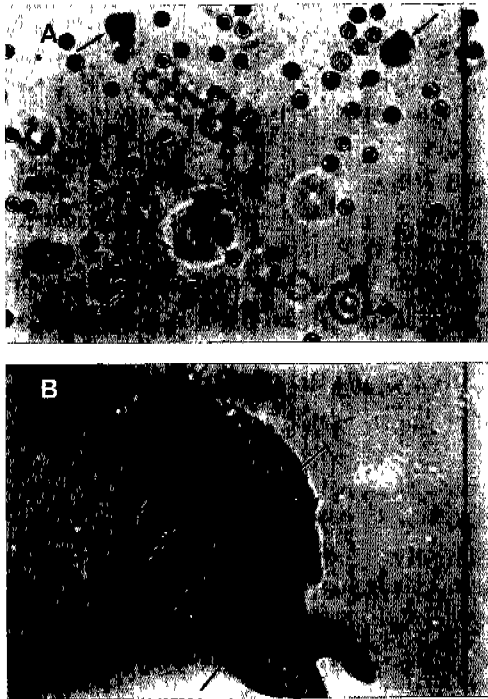


Fig. 1. Microspore division and microspore-derived proembryos of rice. A, Microspore dividing after two weeks of culture in cv. Kwanakbyeo. Arrow indicates dividing microspores; B, Many proembryos within anther in cv. Dongjinbyeo. Arrows indicate microspore-derived proembryos. Scale bars=100 μ m.

Table 1. Effects of various hormone concentration and genotype on proembryo and callus induction of rice in B5 medium containing 4% sucrose as carbon source

Treatment	No. of proembryo and callus/100 anthers	
	Cultivar	
	Dongjinbyeo	Kwanakbyeo
NAA/2,4-D (mg/L)		
nh ^c	1.5	0
0.0 / 0.2	19.0	112.9
0.2 / 0.2	70.9	63.7
0.5 / 0.2	20.6	36.5
1.0 / 0.2	42.1	62.9
2.0 / 0.2	63.5	109.8
5.0 / 0.2	19.9	151.0

^cnh=no hormone treatment.

보였지만 2% maltose 처리구에서는 이들 모든 처리구에 비해서 가장 높은, 362.6개의 원배와 캘러스가 유도되었다.

Table 2. Effects of carbon source and genotype on proembryo and callus induction of rice in B5 medium containing 0.2/2.0 (mg/L) 2,4-D/NAA

Cultivar	Carbon source	No. of proembryo and callus/100 anthers				
		Concentration (%)				
		0	2	4	6	8
Dongjinbyeo	Sucrose	49.3	66.7	63.5	19.1	36.3
	Maltose	49.3	61.7	74.7	70.2	32.9
Hwaseongbyeo	Sucrose	13.1	20.1	169.1	148.1	91.3
	Maltose	13.1	362.6	15.3	43.9	0
Kwanakbyeo	Sucrose	0	6.1	4.9	11.3	3.3
	Maltose	0	45.5	126.6	188.6	35.8

Results were summed up after 3 weeks of culture.

관악씨의 경우 모든 처리구에서 maltose를 탄소원으로 하였을 때의 유도율이 sucrose를 사용하였을 때보다 훨씬 높게 나타났다. 일반적으로 탄소원의 농도가 높아질수록 원배와 캘러스는 단단해지고 분화된 형태를 갖추었으며, sucrose를 탄소원으로 사용한 처리구에서 소포자의 분열이 더 빨리 일어나는 경향이 있었다.

화분 이형성의 관찰과 생존율 조사. 배지내로 방출된 소포자에서 두 가지 소포자 type이 관찰되었는데, 하나는 크기가 직경 50~60 μ m에 분홍색의 얇은 화분벽을 가지고 있으며, 세포질이 얇아 핵이 뚜렷이 관찰되는 반면, 다른 경우는 직경 40 μ m 정도 크기의 소포자로 상대적으로 두꺼운 화분벽과 농축된 세포질로 인하여 광학 현미경하에서는 핵이 관찰되지 않았다. 배양기간의 경과에 따른 전체 소포자의 생존율을 산출한 결과(Fig. 2), 동진벼와 관악씨의 배양기간에 따른 생존곡선은 비슷하게 나타났으며, 시간이 지남에 따라 생존율은 감소하는 경향이 있었다. 특히, 배양 6 일째까지는 현저하게 생존율이 감소되어 배양 9일 후부터는 약 3% 내외까지 떨어지는 양상이었다. 또한 배양 중 나타난 두 형태의 소포자 중에서 크기가 정상에 비해 큰 소포자(P-grain)의 상대적인 출현빈도와 전체 소포자의 생존율을 비교하기 위하여 두 품종에 있어 전체 소포자 중에서 차지하는 P-grain의 비율을 계산한 결과, 동진벼와 관악씨에서 각각 32%와 28.7%로 나타났고 배양기간이 경과함에 따라 생존율과 상당히 유사한 경향으로 P-grain의 비율이 감소하는 것을 관찰할 수 있었으며, 이로써 생존하는 소포자의 대부분이 P-grain이었음을 추측할 수 있었다 (Fig. 2).

두 소포자 type의 분리. 두 가지 type의 소포자를 서로 분리해 내기 위해 sucrose 밀도구배 원심분리를 수행한 결과 40%, 60%의 경계면과, 20% 상층부로 두 소포

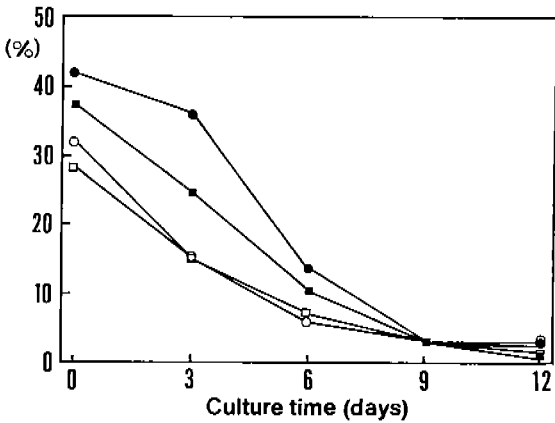


Fig. 2. Total microspore viability of rice and relative frequency (RF) of P-grains in total microspores. Viability was determined with ADH activity and FDA fluorescence staining. (-○-), RF of P-grains in Dongjinbyeo; (-●-), Viability of microspores in Dongjinbyeo; (-□-), RF of P-grains in Kwanakbyeo; (-■-), Viability of microspores in Kwanakbyeo.

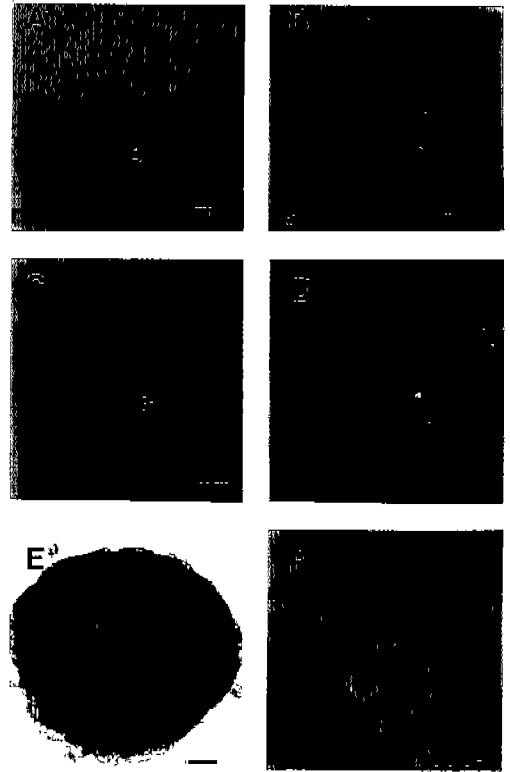


Fig. 4. The modes of initial nuclear division in microspore of rice. A, Microspores showing normal developmental stage. v=vegetative nucleus, g=generative nucleus; B, Binucleate microspore (arrow) with two symmetrical nuclei; C, Second nuclear division (arrow); D, Multinucleate microspore; E, Proembryo derived from microspore; F, Microspore with one nucleus dividing continuously. Scale bars=60 μm.

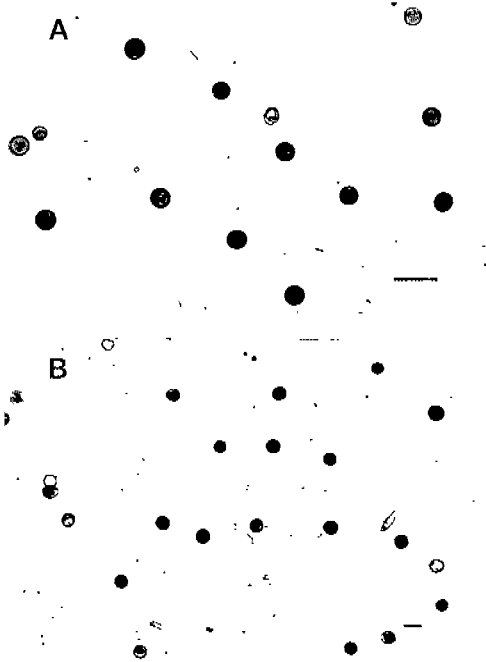


Fig. 3. Rice microspores separated by sucrose density gradient centrifugation. A, Microspores of top fraction within 20% and most microspores consisted of P-grains; B, Highly viable P-grain fraction. Viable microspores were stained in black by ADH activity. Scale bars=100 μm.

자충이 나누어지는 것을 확인할 수 있었다. 20% 상층부에서 분리해 낸 소포자는 주로 P-grain이었으며(Fig. 3A) 거의 대부분 생존한 소포자들만으로 구성되어 있었다(Fig. 3B).

소포자의 초기 핵분열상 관찰. 배양에 따른 소포자의 초기 분열상을 관찰한 결과, 오직 P-grain만이 분열하는 양상이었으며, 전도현미경만으로도 P-grain이 가진 얇은 세포질로 인하여, 핵분열을 관찰할 수 있었다. 정상적인 핵분열 과정을 통하여, 첫번째 분열 후 크기가 큰 영양핵과 작은 생식핵이 각각 형성되는 분열이 일부 소포자에서 관찰되기도 하였지만(Fig. 4A) 이러한 소포자는 더 이상 분열하지 못하였고, 분열된 원배 형태에 이르는 핵분열은 다양한 양상이었으나, 크게 두 가지 경로로 일어났다. 첫 번째 경로로는 하나의 핵이 동등한 두 개의 핵으로 분열하고(Fig. 4B), 이것이 연속적인 분열과정을 통하여 다핵의

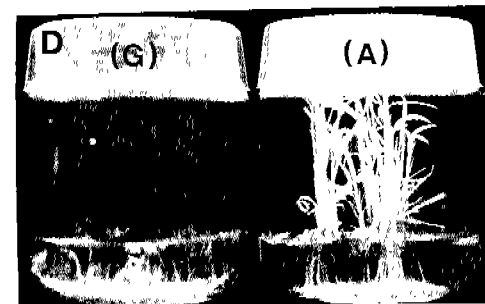
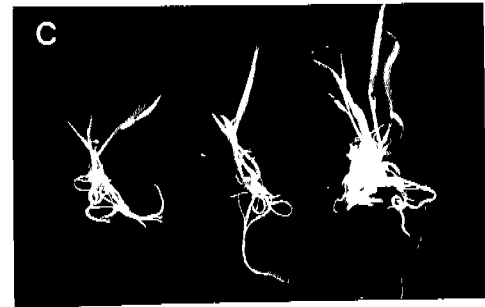
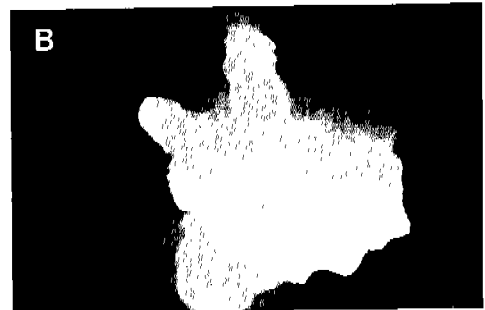
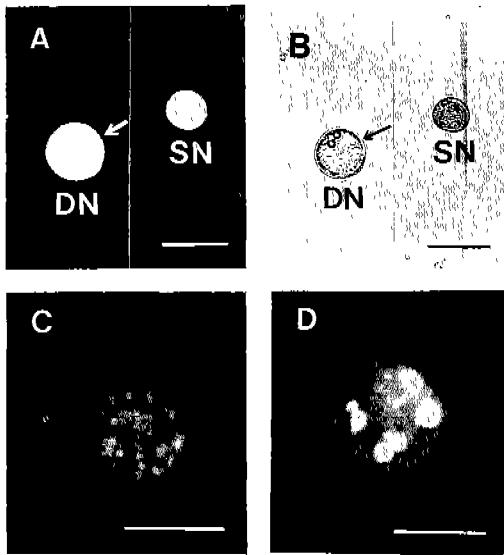


Fig. 6. Plant regeneration from microspore-derived proembryo and callus of rice. A, Multiple plantlets formation in N6 regeneration medium: B, Germinating embryo formed in N6 regeneration medium: C, Plantlet with strong shoots and roots: D, Green (G) and albino (A) plant.

서는 각각 62.2와 50.0%로 커다란 차이점을 보였다.

Fig. 5. Rice microspores stained with DAPI under UV illumination. A, P-grain with two symmetrical nuclei (DN) and normal microspore with single nucleus (SN). Arrow indicates P-grain: B, The same phase as A, but observed under bright field. Arrow indicates P-grain: C-D, P-grains with many nuclei. Scale Bars=100 μm.

원배를 형성하는 양상으로서 대부분의 소포자가 이러한 경로를 따라 분열하였다(Fig. 4C, D, E). 그리고 다른 하나의 경로로는, 두 핵 중 하나만이 분열을 계속하고, 나머지 핵은 수 회 분열에 그쳐 주변을 이루는 양상으로 나타났다(Fig. 4F). DAPI 형광염색을 통해서도 동등한 두 개의 핵을 가진 소포자(Fig. 5A-DN)와 하나의 소포자 안에 다수의 핵이 존재하는 것이 확인되었는데(Fig. 5C, D) 이러한 현상은 P-grain에서만 관찰되었고, 정상 소포자에서는 진한 세포질로 인하여 전도현미경으로는 핵을 관찰할 수 없었으며(Fig. 5B-SN), DAPI 형광염색을 한 결과 단지 하나의 핵만을 그대로 유지하고 있었다(Fig. 5A-SN).

원배 및 캘러스의 재분화. 재분화 배지로 옮긴 원배와 캘러스는 2주 이내에 줄기와 뿌리가 거의 동시에 형성되었으며(Fig. 6A), 일부 원배는 성숙한 배로 발달하였고(Fig. 6B), 그 후 재분화되었다(Fig. 6C). 유도배지에서 30일 경과한 원배와 캘러스의 경우, 재분화율은 동진벼, 화성벼 및 관악벼에서 각각 33.5, 42.7, 43.0%로 나타났으며 유도배지에서 오래 경과한 것일수록 재분화율은 감소하는 양상이었다(Table 3). 재분화된 식물체는 green(G)과 albino(A) plant가 모두 나타났으며(Fig. 6D) 품종에 따라 green plant가 차지하는 비율은 서로 달라서(Table 4), 동진벼에서 16.7%의 개체만이 green plant인 반면 화성벼와 관악벼에

Table 3. Effect of culture age of microspore-derived proembryos and calluses of rice in B5 induction medium on regeneration frequency

Cultivar	Regeneration frequency (%)		
	Culture age ^a (day)		
	30	40	50
Dongjinbyeo	33.5	22.2	15.5
Hwaseongbyeo	42.7	40.8	22.5
Kwanakbyeo	43.0	26.9	15.0

^aCulture age means the duration time of microspore-derived proembryos and calluses in B5 induction medium after culture initiation. At least 80-150 proembryos and calluses were tested at each experiment.

Table 4. Regeneration frequency of microspore-derived proembryos and calluses of rice in N6 regeneration medium containing 1.0/5.0 NAA/kinetin (mg/L)

Cultivar	No. of proembryos and calluses plated	No. of regenerated plants		
		Green	Albino	Green plant %
Dongjinbyeo	352	14	74	15.9
Hwaseongbyeo	275	56	43	56.6
Kwanakbyeo	301	41	41	50.0

Results were summed up after 5 weeks of culture in N6 regeneration medium.

염색체 분석. 재분화된 식물체의 염색체를 분석한 결과 green 및 albino plant에서 만수체가 차지하는 비율은 각각 75%와 81.8%로 비슷하게 나타났다(Table 5).

고 찰

벼의 소포자 배양을 통하여 소포자의 초기 분열상을 관찰하고 효율적인 재분화 체계를 확립하고자 시행된 본 연구에서, 소포자의 최초 분열은 배양을 시작하지 9~12일부터 관찰되었는데, 이것은 기존의 실험결과(Cho and Zapata, 1990)와 유사한 것으로 나타났다. 그러나 재료로 사용한 소포자의 발달상태가 다른 이유에서인지 배양 기간이 30일 이상 지난 후에도 분열하는 소포자를 관찰할 수 있었다. 또한 소포자의 발달시기가 오래 경과한 것일 수록 배지로 방출되는 소포자의 수가 많았는데, 관악벼와 화성벼에 있어서는 이렇게 방출된 소포자들이 주로 분열을 하였다(Fig. 1A). 반면 동진벼의 경우에는 약 안에서 분열한 소포자들이 배지로 방출되었다(Fig. 1B). 소포자의 분열

Table 5. Analysis of ploidy level of regenerated green and albino plants in rice (*Oryza sativa* cv. Hwaseongbyeo)

Type	No. of plants analyzed	Haploid (%)	Diploid (%)
Green	12	9 (75.0)	3 (25.0)
Albino	11	9 (81.8)	2 (18.2)
Total	23	18 (78.3)	5 (21.7)

가능성은 약의 상태로서도 예측할 수 있었는데, 일반적으로 노화된 소포자를 가지고 있는 약은 조기에 검게 변하는 양상을 보였다. 그리고 동일한 페트리디쉬상에서도 발달 단계가 다른 원배와 캘러스가 생성되었는데, 이런 점에 비추어 소포자의 발달에 따른 분자생물학적인 연구를 수행하기 위해서는 발달 단계가 동일한 소포자를 재료로, 동조화된(synchronized) 배발생 시스템의 확립이 중요하다고 생각된다.

소포자로부터 원배와 캘러스의 유도에 미치는 품종별 호르몬의 효과를 조사한 실험에서는 각 품종이 가진 유전자형에 따라 다른 결과를 보였는데, 가장 높은 유도 효율을 보인 처리구를 기준으로 하였을 경우 관악벼가 동진벼에 비하여 약 2.1배 높은 유도율을 보였다(Table 1). 탄소원의 종류와 농도 효과도 품종에 따라 차이를 보였지만 동진벼, 화성벼 및 관악벼 모두에서 2~6%의 농도가 적절하였다(Table 2). Maltose를 탄소원으로 사용한 처리구에서는 sucrose에 비하여 소포자의 분열이 늦게 일어나는 양상이었는데, 이것은 maltose의 분해속도가 느리기 때문인 것으로 사료되었다. 그러나 밀과 보리에서 입증된 탄소원으로서 maltose의 우수성은(Kuhlman and Foroughi-Wehr, 1989; Orshinsky *et al.*, 1990) 관악벼에서만 관찰되었으며, maltose와 sucrose가 각각 첨가된 배지에서 유도된 원배와 캘러스의 재분화율은 크게 차이가 나타나지 않았다. 원배와 캘러스가 유도된 조건과 품종에 따라 차이는 있으나, 최대 유도 효율을 보인 처리구를 기준으로 했을 때 동진벼, 관악벼 및 화성벼에서 100개의 약당 각각 70.9, 151.0 및 362.6 개의 원배와 캘러스가 유도되었는데 이는 기존의 약 배양에서 100개의 약당 최대 30~70개의 캘러스가 유도된 것(Torizzo and Zapata, 1986; Reiffers and Freire, 1990)에 비해 월등히 높은 효율이다.

배양 기간의 경과에 따른 소포자의 생존율은(Fig. 2) 기존의 보고(Cho and Zapata, 1990)와 유사한 것으로 나타났다. 전체 소포자 중에서 차지하는 P-grain의 상대적인 출현빈도도 동진벼와 관악벼에서 각각 32%와 28.7%로 나타나(Fig. 2), 일본형 벼인 Taipei 309에서의 30%(Raghavan, 1988)와 유사한 수치를 나타내었다. 그러나 P-grain의 상

대적인 빈도가 품종 차이 외에도 식물체가 자란 환경 요인에 의하여 크게 좌우된다는 점을 고려할 때(Heberle-Bors, 1985), P-grain의 수를 증가시키는 모본 식물의 재배조건에 대한 확립도 필요하리라 사료된다.

배양 중 나타나는 두 가지 type의 소포자 중에서 어떤 것이 분열능이 있는가에 대한 논란은(Cho and Zapata, 1990; Kim *et al.*, 1990) 세포화학적 방법을 사용한 소포자 분열의 관찰과 더불어(Figs. 4, 5) P-grain의 빈도가 전체 소포자 생존율과 거의 일치한다는 점에서(Fig. 2) 정상보다 큰 소포자인 P-grain의 분열능을 입증할 수 있었다. 그러나 두 소포자를 밀도구배 원심분리를 통하여 분리한 후 따로 배양할 경우, 선별하지 않고 배양하였을 경우와는 달리 소포자의 지속적인 분열이 관찰되지 않았다. 이것은 원심 분리 과정 중에 가해지는 충격으로 인해 소포자가 손상을 입었기 때문인 것으로 사료된다. 벼의 경우에는 소포자를 기계적으로 방출시켜 배양할 경우 다른 식물과는 달리 5~10일의 전배양(preculture)기간을 필요로 하는 것으로 알려져 있는데(Cho and Zapata, 1988, 1990), 이 때 생존율이 급속히 감소하게 되므로(Fig. 2) 두 요인을 어떻게 조절해야 할 것인가가 앞으로 해결해야 할 문제이며, 이후 분열능 있는 소포자인 P-grain만을 선별하여 배양할 수 있는 기법이 개발된다면, 훨씬 높은 효율로 식물체를 재분화시킬 수 있을 것이다.

소포자의 초기 핵분열상을 관찰함으로써, 벼 소포자가 조포체로 발달하는 경로에 대한 기존의 실험결과들을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 그러나 어떤 원인에 의하여 하나의 핵이 균등분열을 하여 동등한 두 핵이 생성되는지에 대하여는 본 연구를 통해서도 밝힐 수 없었다. 십자화과 식물의 경우 배양 초기에 35°C 정도의 고온처리를 함으로써 소포자 단핵의 균등분열을 유도할 수 있는 것으로 보고된 것(Hamaoka *et al.*, 1991)에 비추어, 벼에 있어서도 배양 전에 가해지는 저온처리 효과에 대한 단핵 소포자의 반응 양상을 연구할 필요가 있으리라 판단된다.

재분화된 식물체 중에는 albino가 상당수를 차지하였는데, 유도배지에서 오래 경과한 원배와 캘러스일수록 재분화시킬 경우 albino의 빈도가 커졌으며, 또한 품종에 따라 서로 큰 차이를 보여(Table 4) 원배와 캘러스가 배양되었던 조건 이외에 각 품종이 가진 유전자형도 albino의 출현에 영향을 주는 것으로 사료되었다. 약 배양이나 소포자 배양에서 일반적으로 발견되는 현상 중의 하나가 이러한 albino의 출현이라 할 때 엽록체의 정상적인 분화과정을 이해하기 위한 도구로서, 이런 변이에 대한 체계적인 연구가 필요하리라 여겨진다. Albino에 대한 최근의 연구로서 Harada 등(1991)은 약 배양을 통하여 형성된 albino와 albino 유래 캘러스의 plastid DNA에서 대규모의 결실이 일어났음을 보고하였다.

재분화된 식물체의 염색체를 분석한 결과 albino와 green plant 모두에서 약 80%가 반수체였고 나머지는 이배체로 밝혀졌다(Table 5). 고배배지상에서 행해지는 약 배양의 경우 캘러스 단계를 거쳐 재분화가 이루어지므로 이배체가 나올 확률이 높은 것으로 알려져 있지만(Merey and Zapata, 1986), 본 연구의 경우 초기 단계까지는 배발생을 통해 식물체가 재분화된 이유로 인하여 반수체가 차지하는 비율이 큰 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 세포분화연구센터의 연구비(92-5-2) 일부 지원에 의하여 수행되었으며, 여러 벼 품종을 분양해 준 농촌진흥청 작물시험장에 감사드린다.

적 요

벼의 소포자 배양을 통하여 효율적인 재분화 체계를 확립하였다. Anther shedding 배양을 통해 배지로 방출된 소포자는 B5 배지에서 2주 이내에 원배와 캘러스로 발달하였다. 소포자로부터 원배와 캘러스를 유도하기 위한 적정 호르몬과 탄소원의 농도 및 종류는 각 품종이 가지는 유전자형에 따라 다르게 나타났다. 배양기간이 경과할수록 소포자의 생존율은 급격하게 감소하여, 소포자의 최초 분열이 관찰되는 배양 9일 이후에는 3% 이하의 소포자만이 생존하였다. 배양 중 두 형태의 소포자(화분 이형성)가 관찰되었으며, 이 중 정상보다 큰 소포자인 P-grain만이 분열하였다. 소포자의 초기 핵분열상을 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI) 형광 염색을 통하여 관찰한 결과, 소포자 단핵의 균등분열이 지속적인 소포자 발달의 첫 단계임이 확인되었다. 소포자로부터 유도된 원배와 캘러스는 1 mg/L NAA, 5 mg/L kinetin이 첨가된 N6 배지에서 식물체로 재분화되었으며, 재분화된 식물체 중 78.3%가 반수체였다.

참 고 문 헌

Bolik, M. and H. U. Koop. 1991. Identification of embryogenic microspores of barley (*Hordeum vulgare* L.) by individual selection and culture and their potential for transformation by microinjection. *Protoplasma* **162**: 61-68.

Chen, Y., Q. Zuo, S. Li, D. Lu and S. Zheng. 1981. Green plants regenerated from isolated rice pollen grains *in vitro* and the induction factors. *Acta. Genet. Sinica* **8**: 158-163.

Cho, M. S. and F. J. Zapata. 1988. Callus formation and plant regeneration in isolated pollen culture of rice (*Oryza*

- sativa* L. cv. Taipei 309). *Plant Sci.* **58**: 239-244.
- Cho, M. S. and F. J. Zapata. 1990. Plant regeneration from isolated microspore of Indica rice. *Plant Cell Physiol.* **31**: 881-885.
- Chu, C. C. and R. D. Hill. 1988. An improved anther culture method for obtaining higher frequency of pollen embryos in *Triticum aestivum* L. *Plant Sci.* **55**: 175-181.
- Chu, C. C., R. D. Hill and A. L. Brule-Babel. 1990. High frequency of pollen embryoid formation and plant regeneration in *Triticum aestivum* L. on monosaccharide containing media. *Plant Sci.* **66**: 255-262.
- Chuong, P. V. and W. D. Beversdorf. 1985. High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *B. carinata* Braun. *Plant Sci.* **39**: 219-226.
- Coleman A. W. and L. J. Goff. 1985. Application of flurochromes to pollen biology. I. Mithramycin and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) as a vital stains and for quantitation of nuclear DNA. *Stain Technol.* **60**: 145-154.
- Creissen, G., C. Smith, R. Francis, H. Reynolds and P. Mullineaux. 1990. *Agrobacterium*-and microprojectile-mediated viral DNA delivery into barley microspore-derived cultures. *Plant Cell Rep.* **8**: 680-683.
- Datta, S. K. and I. Potrykus. 1989. Artificial seeds in barley : encapsulation of microspore derived embryos. *Theor. Appl. Genet.* **77**: 820-824.
- Datta, S. K., K. Datta and I. Potrykus. 1990a. Embryogenesis and plant regeneration from microspores of both 'Indica' and 'Japonica' rice (*Oryza sativa*). *Plant Sci.* **67**: 83-88.
- Datta, S. K., A. Peterhans, K. Datta and I. Potrykus. 1990b. Genetically engineered fertile Indica-rice recovered from protoplasts. *Bio/Technology* **8**: 736-740.
- Gaillard, A., P. Vergne and M. Beckert. 1991. Optimization of maize microspore isolation and culture conditions for reliable plant regeneration. *Plant Cell Rep.* **10**: 55-58.
- Gupta, H. S. and D. N. Borthakur. 1987. Improvement rate of callus induction from rice anther culture following microscopic staging of microspores in iron alum-haematoxylin. *Theor. Appl. Genet.* **74**: 95-99.
- Hamaoka, Yoh., Y. Fujita and S. Iwai. 1991. Effects of temperature on the mode of pollen development in anther culture of *Brassica campestris*. *Physiol. Plant.* **82**: 67-72.
- Harada, T., T. Sato, D. Asaka and I. Matsukawa. 1991. Large-scale deletions of rice plastid DNA in anther culture. *Theor. Appl. Genet.* **81**:157-161.
- Heberle-Bors, E. 1985. In vitro haploid formation from pollen: a critical review. *Theor. Appl. Genet.* **71**: 361-374.
- Horner, M. and E. Street. 1978. Pollen dimorphism-origin and significance in pollen plant formation by anther culture. *Ann. Bot.* **42**: 763-767.
- Joersbo, M., R. B. Jorgenson and P. Olesen. 1990. Transient electroporabilization of barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores to propidium iodide. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **23**: 125-129.
- Kao, K. N., M. Saleem, S. Abrams, M. Pedras, D. Horn and C. Mallard. 1991. Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods. *Plant Cell Rep.* **9**: 595-601.
- Kim, H. I., D. H. Kim and Y. H. Lee. 1990. Differences between two rice varieties under low temperature treatment in anther culture. *Korean J. Plant Tissue Culture* **17**: 159-165.
- Kuhlmann, U. and B. Foroughi-Wehr. 1989. Production of doubled haploid lines in frequencies sufficient for barley breeding programs. *Plant Cell Rep.* **8**:78-81.
- Kyo, M. and H. Harada. 1986. Control of the developmental pathway of tobacco pollen *in vitro*. *Planta* **168**: 427-432.
- La Cour, L. F. 1949. Nuclear differentiation in the pollen grain. *Heredity* **3**: 319-366.
- Merey, S. T. and F. J. Zapata. 1986. Chromosomal behavior of anther culture derived plants of rice. *Plant Cell Rep.* **3**: 215-218.
- Mitchell, J. C. and J. F. Petolino. 1991. Plant regeneration from haploid suspension and protoplast cultures from isolated microspores of maize. *J. Plant Physiol.* **137**: 530-536.
- Neuhaus, G., G. Spangenberg, O. M. Scheid and H. G. Schweiger. 1987. Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore-derived embryos. *Theor. Appl. Genet.* **75**: 30-36.
- Niizeki, H. and K. Oono. 1968. Induction of haploid rice plants from anther culture. *Proc. Jpn. Acad.* **44**: 554-557.
- Orshinsky, B. R., L. J. McGregor, G. I. E. Johnson, P. Hucl and K. K. Kartha. 1990. Improved embryoid induction and green shoot regeneration from wheat anthers cultured in medium with maltose. *Plant Cell Rep.* **9**: 365-369.
- Pescitelli, S. M., C. D. Johnson and J. F. Petolino. 1990. Isolated microspore culture of maize: effects of isolation technique, reduced temperature, and sucrose level. *Plant Cell Rep.* **8**: 628-631.
- Raghavan, V. 1986. Pollen embryogenesis. In, Embryogenesis in Angiosperms. Barlow, P. W., P. B. Green and C. C. Wylie (eds.), Cambridge University Press, Cambridge. pp. 152-188.
- Raghavan, V. 1988. Anther and pollen development in rice (*Oryza sativa* L.). *Am. J. Bot.* **75**: 183-196.
- Reiffers, I. and A. B. Freire. 1990. Production of doubled haploid rice plants (*Oryza sativa* L.) by anther culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **21**: 165-170.
- Stinson, J. and J. P. Macarenhas. 1985. Onset of alcohol deh-

- ydrogenase synthesis during microsporogenesis in maize. *Plant Physiol.* 77: 222-224.
- Swanson, E. B., M. P. Coumans, S. C. Wu, T. L. Barsby and W. D. Beversdorf. 1987. Efficient isolation of microspores and the production of microspore-derived embryos from *Brassica napus*. *Plant Cell Rep.* 6: 94-97.
- Torrizo, L.B. and F. J. Zapata. 1986. Anther culture in rice: The effect of abscisic acid on plant regeneration. *Plant Cell Rep.* 5: 136-139.
- Zapata, F. J. and L. B. Torrizo. 1988. Tissue culture program at IRRI. In, *Cell and Tissue Culture in Field Crop Improvement*. F.J. Zapata (ed.). Science Press, Beijing. pp. 80-91.

(1993. 5. 11 接受)