

벼 체세포배를 알긴산 캡슐에 넣어 제작한 건조형 인공종자

정원중 · 민성란 · 송남희¹ · 유장렬*

한국과학기술연구원 유전공학연구소 생물자원연구그룹, ¹대구교육대학교 과학교육과

Production of Dry-Type Artificial Seeds Using Alginate-Encapsulated Rice Somatic Embryos

Won Joong JEONG, Sung Ran MIN, Nam Hi SONG¹, and Jang R. LIU*

Bioresources Research Group, Genetic Engineering Research Institute, KIST, P.O. Box 115, Taejeon, 305-600: and
¹Department of Science Education, Taegu National University of Education, Taegu, 705-715. *Corresponding author.

Dry-type artificial seeds were produced by dehydrating alginate-encapsulated somatic embryos of rice. When placed on half-strength MS solid medium, 20% of the artificial seeds dehydrated to the level of 80% water loss were capable of germination. Addition of 0.1 mg/L ABA to alginate solution before encapsulation enhanced the germination percentage of those dehydrated to the level of nil to 90% water loss by up to 1.7-folds. The results suggest that ABA may enable somatic embryos to overcome physical and/or physiological restraint by encapsulation and dehydration.

Key words : ABA, dehydration, dry type, encapsulation, *Oryza sativa* L.

1978년 Murashige의 인공종자에 대한 제안(Murashige, 1978) 이후 fluid drilling 방법(Cantliffe et al., 1987), 웨이퍼형 방법(Kitto and Janick, 1985a; Kim and Janick, 1989), 체세포배 건조방법(Gray et al., 1987; Gray and Purohit, 1991), 수화겔 캡슐방법(Redenbaugh et al., 1984; Redenbaugh et al., 1991; Lulsdorf et al., 1993) 등의 연구가 진행되어 왔다. 우리도 Redenbaugh 등 (1984)의 시스템을 이용하여 당근의 수화겔 인공종자와 건조형 인공종자를 개발한 바 있는데 (Jeon et al., 1986; Liu et al., 1989; Liu et al., 1992), 특히 건조형의 경우 이제까지 발표된 여러 인공종자와 비교하여 볼 때 형태나 기능 면에서 진정종자에 가장 접근한 것이었다.

그러나 지금까지 보고된 인공종자는 대부분 쌍자엽 식물의 체세포배를 대상으로 한 것이며 단자엽 식물에서는 최근에 F1잡종벼의 shoot tip과 보리의 소포자 유래 체세포배를 알긴산 캡슐에 넣어 종자화하였다(Yoshida, 1989; Datta and Potrykus, 1989). 우리는 벼의 체세포배를 인공종자화하여 보고한 바 있는데(Jeong et al., 1994), 수화형 인공종자는 무균조건이 아닐 경우 오염에 의해 발아율이 낮아졌다. 이러한 오염의 영향은 발아 전에 수분함량을 줄인 건조형 인공종자로 극복될 수 있다고 보여지며 건조형 인공종자의

개발은 저장 및 수송의 용이성을 위해서도 필요하다. 본 연구에서는 벼의 현탁배양세포로부터 유도된 체세포배를 sodium alginate로 캡슐화하여 인공종자로 만든 후, 탈수 과정을 거쳐 건조형 인공종자를 제조하여 발아율을 조사하였다.

재료 및 방법

현탁 배양세포로부터의 체세포배생산

충청남도 농촌진흥원에서 수분후 14일째된 태백벼(*Oryza sativa* L. cv Taebaegbyeo)의 미성숙배를 분양받아 유도된 배발생 현탁배양 세포주(Jeong et al., 1991)를 사용하였다. 현탁배양세포는 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 N₆ (Chu et al., 1975) 기본액체배지에서 0-2 mm 크기의 세포괴로 유지 및 증식되었다. 현탁배양세포를 1 mg/L NAA, 5 mg/L kinetin, 5 mg/L ABA, 0.3 M sorbitol, 0.6% Gelrite가 첨가된 N₆배지에서 총 질소화합물의 양을 100 mM 되도록 변형하여 25°C, 명조조건(16시간 광주기; cool-white 형광등 약 2,000 lx)으로 배양하여 체세포배를 유도하였다. 배양 3주 후부터 각 세포

피에서 체세포배가 1개 혹은 수 개가 배반부분이 유합되어 발생하였다. 배양 30일 후 뿌리 및 shoot이 발달하지 않은 체세포배를 날개씩 선별 적출하여 인공종자의 재료로 사용하였다.

건조형 인공종자 제조 및 발아율 조사

인공종자 제조는 Liu 등 (1992)의 방법에 준하였으며 0.1 mg/L ABA를 첨가한 것과 첨가하지 않은 1/2 N6 기본 배양액에 알긴산(sodium alginate: low viscosity: Sigma)을 2.5%로 용해하여 15분간 멸균하였다. 체세포배를 넣은 알긴산 용액을 15-20 cm 높이에서 50 mM CaCl₂용액에 떨어뜨려 5-10분간 교반하여 날개씩 알긴산 캡슐에 들어가도록 하였다. 알긴산 캡슐을 1/2 N6액체배지에서 교반하여 캡슐표면의 잔존한 CaCl₂를 제거한 후 멸균된 흡수지로 수화형 인공종자의 여분의 물기를 제거하여 수화형 인공종자를 제조하였다. 상대 습도 24%인 무균상에서 인공종자를 60 × 15 mm의 페트리디시에 10립씩 넣고 뚜껑을 약간 열리도록 비스듬히 덮어 건조 속도가 0.1-1.5 g/h 되도록 하여 인공종자의 수분 손실률(water loss)이 각각 60, 70, 80, 90% 되도록 건조하였다. 이때 수분 손실률은 다음과 같이 계산하였다.

수분손실률(%)

$$= \frac{\text{알긴산캡슐의 초기 생체중량-건조후 중량}}{\text{알긴산캡슐의 초기 생체중량}} \times 100$$

각각의 수분 손실률을 가진 인공종자의 페트리디시는 Parafilm으로 감았으며 마지막 90%의 수분손실률을 가진 건조형이 제조될 때까지 실온 보관 후 동시에 발아 시험에 사용되었다. 건조된 인공종자를 1/2 MS (Murashige and Skoog, 1962) 기본 배지에 치상하여 25°C 16시간 명조에서 배양한 후 발아율을 조사하였다. 배양 7일후 체세포배 및 진정 종자가 캡슐을 뚫고 나와 shoot과 뿌리가 모두 1 cm 이상 자란 것을 발아한 것으로 간주하였다. 각각의 실험은 3 반복으로 수행하였다.

결과 및 고찰

현탁배양세포로부터 체세포배 생산배지에서 30일이 경과한 후 발달한 체세포배를 선별하여 알긴산 캡슐화하였다. 수화형 인공종자는 직경이 약 5 mm, 무게가 80-140 mg을 나타냈으나 수분 손실률이 90%일 때 직경 2.5 mm이하, 무게가 4-7 mg으로 감소하였다(Figure 1A, B). 인공종자는 무균상에서 95%의 수분 손실률에 도달하는 데 18시간이 소요되었다. 따라서 각 수분 손실률 사이에 시간 간격이 18시간

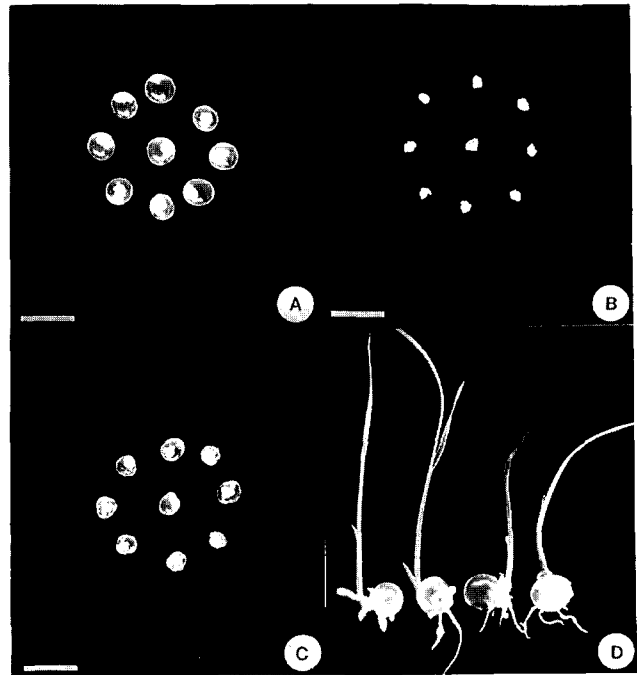


Figure 1. Production and germination of dry-type rice artificial seeds in vitro. A, Freshly encapsulated embryos; B, Dehydrated capsules (90% water loss); C, Rehydrated capsules; D, Germination of rehydrated artificial seeds. Scale bar = 1 cm.

까지 차이가 나므로 각각의 수분 손실률에 도달한 인공종자를 상온에 저장한 후 동시에 발아 시험에 사용하였다. 건조형 인공종자는 1/2 MS배지 상에서 수분을 흡수하면 거의 건조 전의 원형으로 회복된 후 뿌리 및 shoot이 알긴산 캡슐을 뚫고 나와 발아하였다(Figure 1C, D). 인공종자의 발아율은 수분 손실률이 높아짐에 따라 감소하였으며 0.1 mg/L ABA가 첨가된 인공종자는 ABA 무첨가와 비교하여 건조 전후에 걸쳐 1.3-1.7배의 높은 발아율을 나타냈다(Figure 2). 인공종자의 수분 함량은 수분 손실률이 높아짐에 따라 감소하여 수분 손실률이 90%일 때 56%를 나타내었다(데이터 미제시). 건조 전 수화형의 발아율은 이전의 보고(Jeong et al., 1994) 73%에 비하여 낮게 나타났다. 이것은 배발생세포주가 2년 이상 장기간의 재대배양으로 재분화능이 일부 떨어졌고, 체세포배가 발달 후 바로 shoot과 뿌리가 나오므로 인공종자화하기 위해 발아하지 않은 체세포배를 선별하는 과정에서 체세포배가 충분히 성숙하지 않은 것을 사용하였기 때문으로 추측된다. 많은 식물에서 체세포배가 발달할 때 구상형 또는 심장형배에서 조속발아가 일어나는 데 이러한 조속발아는 ABA 또는 삼투조절제의 농도를 높임으로써 억제할 수 있다(Ammirato et al., 1974; Obendorf and Wettlaufer, 1984; Roberts et al., 1990). 따라서 벼 체세포배발생의 경우에도 배지에 본 연구에서 사용한 농도 보다 월등히 높은 ABA 또는 삼투조절제를 첨가함으

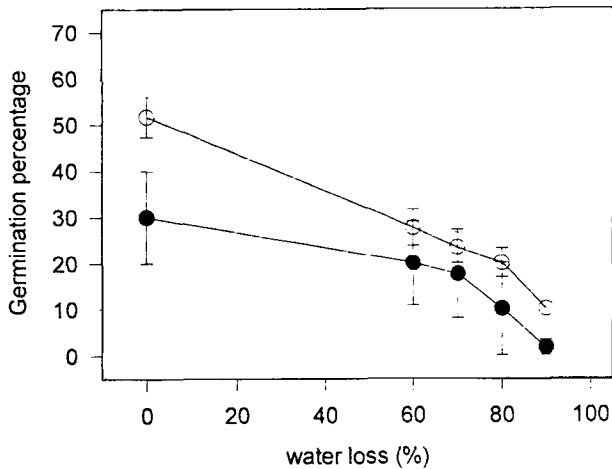


Figure 2. The germination frequency of dry-type rice (*Oryza sativa* L. cv Taebaegbyeo) artificial seeds. Vertical bars indicate standard errors of 3 replicates.

○—○: One-tenth mg/L ABA was added to alginate solution before encapsulation;
●—●: without ABA.

로써 이들의 조속발아를 억제할 수 있을 것이며 인공종자화하였을 때 발아율이 향상될 것으로 예상된다.

자연 상태에서 벼 종자는 성숙된 후 서서히 건조되면서 휴면 과정으로 진행되므로 장기간의 보존 및 건조에 대한 충분한 내성을 가지고 있다. 그러나 체세포배는 이런 과정을 거치지 않으므로 건조에 대한 내성이 낮다. 또한 인공종자는 18시간 이내에 90%이상까지 급속히 건조되므로 이에 따른 생리적인 장애를 많이 입을 것으로 사료된다. ABA처리하는 건조시 체세포배의 생존율을 높인다(Lecoutex et al., 1993; Compton et al., 1992; Kitto and Janick, 1985b). 이것은 ABA, 당 등의 처리가 세포막을 안정화 시키고 세포내에 단백질, 전분, 지질 등을 축적하여 세포를 안정화하며 (Roberts et al., 1990; Vasil and Vasil, 1982; Arnold and Hakman, 1988) 체세포배를 보다 단단하게(Arnold and Hakman, 1988; Kitto and Janick, 1985b)하여 조직에 건조상해를 극복하도록 내성을 부여한 것(Senaratna et al., 1985a; 1985b; Crowe et al., 1984; Baker, 1988)으로 설명될 수 있다. 벼의 배발생과정 및 인공종자제조시에 ABA를 처리한 결과 체세포배는 건조전 후의 전과정(수분손실률 0-90%)에 걸쳐 ABA를 첨가하지 않은 것에 비해 발아율이 높아졌다(Figure 2). 그 이유는 알긴산 캡슐화와 건조과정에서 체세포배의 성숙, 외부의 삼투환경 등의 갑작스러운 변화에 의한 물리적 혹은 생리적인 저해에 대해 ABA가 보호기능을 했을 것으로 사료된다. 또한 내재 ABA가 결핍된 *Arabidopsis* 돌연변이 종자는 휴면과정을 갖지 않았으며 (Karssen et al., 1983), ABA생합성 억제물질인 fluridone 처리로 내재 ABA 농도가 감소된 옥수수의 접합배는 휴면 및 건조과정을 거치지 않고 모식물체에 붙은 채로 발아하였다

(Fong et al., 1983; Hole et al., 1989). 그러므로 고농도로 외부 ABA를 처리하여 벼의 체세포배에 휴면을 도입하는 방법이 연구될 수 있을 것이다. 한편 체세포배는 진정종자에 비해 크기가 크고 알긴산 캡슐화 과정에서 중앙에 위치하지 않고 대부분 가장자리에 위치함으로써 건조 시에 공기중에 직접 노출되어 ABA첨가로 얻은 내성을 훨씬 상회하는 해를 입게 되어 발아율이 저조한 것으로 사료된다. 따라서 캡슐화 과정에서 체세포배가 중심에 위치하도록 하여 서서히 건조시키면 보다 향상된 건조형 인공종자를 제조할 수 있을 것이다.

단자엽 식물의 인공종자 연구는 보리의 소포자 유래 체세포배(Datta and Potrykus, 1989)와 벼의 shoot tip (Yoshida, 1989) 및 벼의 체세포배(Jeong et al., 1994)를 이용한 수화형 인공종자가 보고되어 있다. 이러한 인공종자는 유용한 형질을 가진 작물을 단기간에 적은 노동력으로 대량 증식 및 저장, 수송 등에서 이점을 가지고 있다. 인공종자 제조기술은 대량생산 가능한 재분화시스템이 선행되어야 하므로 쌍자엽 식물에서는 인공종자에 대해 많이 연구되었으나 주요 식량 작물인 단자엽 식물에서는 활발하지 못하였다. 그러나 단자엽 식물에서도 체세포배의 대량생산시스템이 개발되면서 최근 연구가 활발해지고 있다. 인공종자는 건조형으로 제조되었을 경우 부피 및 무게가 적은 장점 이외에도 오염에 대한 피해를 줄일 수 있는 이점을 가진다. 따라서 수화형 인공종자 제조기술이 확립되면 건조형으로 제조하는 방법이 연구되어야 할 것이다. 본 연구에서는 벼의 배발생세포주로부터 대량생산된 체세포배를 이용하여 이전에 발표된 벼의 수화형 인공종자보다 개량된 형태로서 건조형 인공종자를 개발하였다. 이것은 단자엽으로는 처음으로 건조형 인공종자를 제작하여 발아율을 조사한 것이다. 위에서 확립된 방법을 이용하고 건조에 대한 내성 및 저장 방법의 연구가 뒷받침되면 유용한 형질의 벼를 인공종자형태로 유지 및 저장하여 단기간에 대량으로 증식시키는 것이 가능하게 될 것이다.

적 요

벼의 인공종자를 무균상에서 건조시킴으로써 건조형 인공종자를 제조하였다. 1/2 MS배지에서 80%의 수분 손실률을 가진 인공종자는 20%가 발아하였다. 0.1 mg/L ABA가 첨가된 알긴산용액으로 제조한 인공종자는 0-90%의 수분손실률에서 최고 1.7배까지 발아율이 향상되었다. 이러한 결과는 ABA가 인공종자의 제조 및 건조과정에서 물리적 혹은 생리적인 저해에 대한 보호기능을 나타낸 것으로 사료된다. 시사-본 논문은 과학기술처 특정과제 (N80410)의 연구결과이다. 실험재료인 태백벼의 미숙종자를 제공하여준 충남 농촌진흥원 시험국 담당계 직원 여러분과 원고에 대해 세심한 논평과 수정을 가

해준 곡상수, 이행순 박사에게 감사한다.

인 용 문 헌

- Ammirato PV** (1974) The effect of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway (*Carum carvi* L.). *Bot Gaz* **135**: 328-337
- Arnold SV, Hakman I** (1988) Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA). *J Plant Physiol* **132**: 164-169
- Baker J, Steele C, Dure III LS** (1988) Sequence and characterization of 6 LEA proteins and their genes from cotton. *Plant Mol Biol* **11**: 277-291
- Buchheim JA, Colburn SM, Ranch JP** (1989) Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. *Plant Physiol* **89**: 768-775
- Cantliffe DJ, Liu JR, Schulthesis JR** (1987) Development of artificial seeds of sweet potato for clonal propagation through somatic embryogenesis. In WH Smith, JR Frank, eds, *Methane from Biomass: A Systems Approach*, Elsevier Applied Sci, New York, pp 183-195
- Compton ME, Benton CM, Gray DJ** (1992) Plant recovery from maize somatic embryos subjected to controlled relative humidity dehydration. *In Vitro Plant* **4**: 197-201
- 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
- Crowe JH, Crowe LM, Chapman D** (1984) Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of Trehalose. *Science* **223**: 701-703
- Datta SK, Potrykus I** (1989) Artificial seeds in barley: encapsulation of microspore-derived embryos. *Theor Appl Genet* **77**: 820-824
- Fong F, Smith JD, Koehler DE** (1983) Early events in maize seed development. *Plant Physiol* **73**: 899-901
- Gray DJ, Conger BV, Songstad DD** (1987) Desiccation quiescent somatic embryos of orchardgrass for use as synthetic seeds. *In Vitro Cellular Development Biol* **28**: 29-38
- Gray DJ, Purohit A** (1991) Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. *Crit Rev Plant Sci* **10**: 33-61
- Hole DJ, Smith JD, Cobb BG** (1989) Regulation of embryo dormancy by manipulation of abscisic acid in kernels and associated cobb tissue of *Zea mays* L. cultured in vitro. *Plant Physiol* **91**: 101-105
- Iida Y, Watabe KI, Kamada H, Harada H** (1992) Effects of abscisic acid on the induction of desiccation tolerance in carrot somatic embryos. *J Plant Physiol* **140**: 356-360
- Jeong WJ, Min SR, Song NH, Liu JR** (1994) Production of artificial seeds by alginate-encapsulation of rice somatic embryos. *Korean J Plant Tissue Culture* **21**: 183-186
- Jeong WJ, Song NH, Min SR, Kim MK, Liu JR** (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
- Jeon JH, Liu JR, Yang SG, Lee HS, Jeong H, Han MH** (1986) Development of a model system for artificial seed production: I. Encapsulation of somatic embryos by alginic acid. *Korean J Plant Tissue Culture* **13**: 119-128
- Karszen CM, Brinkhorst-van der Swan DLC, Breekland AE, Koormeef M** (1983) Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **157**: 158-165
- Kitto SL, Janick J** (1985a) Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot. *J Amer Soc Hort Sci* **110**: 277-282
- Kitto SL, Janick J** (1985b) Hardening treatments increase survival of synthetically-coated asexual embryos of carrot. *J Amer Soc Hort Sci* **110**: 283-286
- Lecouteux CG, Lai FM, Mckersie BD** (1993) Maturation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos by abscisic acid, sucrose and chilling stress. *Plant Sci* **2**: 207-213
- Liu JR, Jeon JH, Yang SG, Lee HS, Jeong H, Koo JS** (1989) Development of a model system for artificial seed production: II. Dry type of carrot (*Daucus carota* L.) artificial seeds. *Korean J Plant Tissue Culture* **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. *Scientia Hort* **51**: 1-11
- Lulsdorf MM, Taurus TE, Kikcio SI, Bethune TD, Dunstan DI** (1993) Germination of encapsulated embryos of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex) and black spruce (*Picea mariana* Mill.). *Plant Cell Rep* **12**: 385-389
- Murashige T** (1978) The impact of plant tissue culture on industry and agriculture. In T Thorpe, ed, *Frontiers of Plant Tissue Culture*, The International Association for Plant Tissue Culture 1978, Calgary, Canada, p 22
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 478-497
- Obendorf RL, Wettlaufer SH** (1984) Precocious germination during in vitro growth of soybean seeds. *Plant Physiol* **76**: 1023-1028
- Redenbaugh K, Fujii JO, Slade D** (1991) Synthetic seed technology. In IK Vasil, ed, *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol 8. Academic Press, San Diego, pp 35-74
- Redenbaugh K, Nichol J, Kossler ME, Paasch B** (1984) Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production. *In Vitro* **20**: 256-257
- Roberts DR, Flinn BS, Webb DT, Shutton BCS** (1990) Abscisic acid and indole-3-butyric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce. *Physiol Plant* **78**: 355-360
- Senaratna T, McKersie BD, Stinson RH** (1985a) Simulation of

dehydration injury to membranes from soybean axes by free radicals.
Plant Physiol 77: 472-474

Senaratna T, McKersie BD, Stinson RH (1985b) Antioxidant levels in germinating soybean seed axes in relation to free radical and dehydration tolerance. Plant Physiol 78: 168-171

Vasil V, Vasil IK (1982) Characterization of an embryogenic cell

suspension culture derived from cultured inflorescences of *Pennisetum americanum* (perl millet, Gramineae). Am J Bot 69: 1441-1449

Yoshida T (1989) イネF1の大量増殖培養法. Brain テクノユース 13:1-3

(1994년 11월 20일 접수)