

한국 벼 품종 배발생 현탁배양 세포의 초저온 보존과 식물체 재분화

김석원 · 정원중¹ · 민성란¹ · 배경숙 · 유장렬*

한국과학기술연구원 생명공학연구소 생물자원그룹, ¹유전자원센터

Plant Regeneration from Cryopreserved Embryogenic Cell Suspension Cultures of Korean Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars

Suk Weon KIM, Won Joong JEONG¹, Sung Ran MIN¹,
Kyung Sook BAE, and Jang Ryol LIU*

Genetic Resources Center and ¹Bioresources Research Group, Korea Research
Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, P.O. Box 115, Yusong, Taejon, 305-600. *Corresponding author.

A method for cryopreservation of suspension-cultured embryogenic cells derived from immature zygotic embryos of rice (Korean cultivars, Donggin-byeo and Taebaeg-byeo) was developed. The highest cell regrowth after storage in liquid nitrogen was obtained when Donggin-byeo cells were cryoprotected with a mixture of 2 M DMSO and 0.4 M sucrose and Taebaeg-byeo cells with a mixture of 0.64 M DMSO and 0.4 M sucrose at frequencies of 88% and 90%, respectively. Pretreatment in a high osmotic medium was not necessary. Upon transfer to N₆ medium supplemented with 1 mg/L NAA and 5 mg/L kinetin, the regenerated calli gave rise to numerous somatic embryos which subsequently underwent development into plantlets. Among approximately 100 plantlets, 25% of them were albinos.

Key words: cryopreservation, Donggin-byeo, Taebaeg-byeo

식물세포 및 조직배양 기술은 식물체의 대량증식 수단
하나로서 다수의 식물체에서 매우 효율적으로 이용되고
있다. 이러한 목적을 달성하기 위하여 배양세포는 계속적인
계대배양을 통하여 세포주의 증식 및 보존이 이루어져야
한다. 그러나 계대배양은 많은 시간과 노동력이 요구되며
또한 이 과정에서 체세포변이가 빈번하게 이루어짐으로써
식물체의 재분화능이나 유용물질 생산능 등 세포의 특성이
변화되기 쉽다. 이와 같은 배양세포의 체세포변이를 최소화
하기 위하여 세포주의 안정적인 장기보존 방법의 개발이
절실히 요구된다.

식물세포나 조직을 액체질소에 보존하는 초저온 보존 방
법은 세포주는 물론 생장점의 장기 보존에도 매우 효율적
인 방법이다. 초저온 보존을 통하여 배양세포의 장기 보존
에 성공한 예로서 쌍자엽 식물인 물론 단자엽 식물인 벼
(Sala et al., 1979; Cella et al., 1982; Kuriyama et al., 1989),
옥수수(Withers and King, 1979), 사탕수수(Gnanapragasam
and Vasil, 1990)와 밀(Chen et al., 1985) 등에서 보고된 바

있다. 그리고 벼의 초저온보존에 관한 최근 연구로서 재생
된 배양세포로부터 원형질체 배양을 통하여 식물체를 재분
화한 보고가 있다(Lynch et al., 1994).

그러나 국내에서는 아직까지 이러한 기술개발이 활발하
지 못하다. 본 연구에서는 유용한 유전자원의 안정적인 보
존 시스템을 개발하기 위한 기초 연구로서, 현탁배양된 국
내품종 벼의 배발생세포주(Jeong et al., 1991)를 이용하여
기존의 방법보다 간편한 냉동법으로 높은 재생률이 가능한
초저온 시스템을 개발하였다.

재료 및 방법

현탁배양

자포니카형인 동진벼(*Oryza sativa* L.)와 자포니카 × 인
디카형인 태백벼(*O. sativa* L.)의 미숙 접합자배로부터 유도

된 배발생캘러스를 2,4-D가 1 mg/L 첨가된 N₆배지(Chu et al., 1975) (N₆1D)에서 약 4주 간격으로 계대배양하였다. 배양세포 10 ml을 N₆1D 액체 배지 50 ml이 첨가된 250 ml Erlenmeyer flask에 넣고 25°C 암소에서 gyratory shaker (100 rpm)로 현탁배양하였다.

Cryoprotectant 처리

2주간 배양한 현탁배양세포를 피펫으로 수거하여 15 ml conical tube에 넣은 다음 100 g로 3분간 원심분리하였다. 배양세포의 packed cell volume (pcv)을 2 ml로 조정하여 다음 남아있는 액체배지를 피펫으로 제거하였다. Pre-chilled된 각각의 cryoprotectant 용액을 10 ml씩 현탁배양세포에 첨가한 다음 잘 섞어서 ice bath에서 30분간 처리하였다. Cryoprotectant 용액은 N₆ 기본배지에 여러 농도(0.64, 1.28, 2 M)의 DMSO와 glycerol 그리고 0.4 M sucrose를 첨가하여 pH를 5.8로 조정하여 다음 membrane filter로 멸균하였다.

동 결

Cryoprotectant를 처리한 현탁배양세포(약 400 mg) 1 ml을 2 ml cryo vial (Nalgene)에 넣은 다음 parafilm으로 밀봉하였다. Cryo vial을 Cryomed Model 1010 Micro Computer Programmable Freezer Unit에 넣은 다음 분당 1°C씩 -40°C 까지 동결하였다. Cryo vial을 -40°C에서 45분간 유지한 후 곧 바로 액체질소 탱크에 넣었다.

해동 및 재생

액체질소에 1주간 유지한 배양세포를 꺼내어 40°C 수조에 넣은 다음 약 90초간 급속 해동하였다. 배양세포가 vial의 바닥에 침전되도록 방치한 다음 상층액을 제거한 후 세포를 여과지가 올려진 고체 배지위에 옮겼으며 남아있는 cryoprotectant 용액은 여과지 디스크를 이용하여 제거하였다(Kartha et al., 1988). 5시간 경과 후 세포가 놓여있는 여과지를 신선한 배지로 옮겨주고, 24시간 배양 후 세포를 증식배지인 N₆1D 고체배지에 옮겨준 다음 25°C 암소에서 4주간 배양하였다.

생존율 분석

세포의 생존율은 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) reduction 분석방법(Steponkus and Lanphear, 1967)을 이용하여 조사하였다. 세포를 0.18 M TTC 용액에 침적하여 25°C에서 16시간 처리한 다음 적색의 세포피를 육안으로 식별하여 계산하였으며 무처리 대조구와 생존율을 비교 분석하였다. 보다 확실한 생존율 조사 방법으로 각 처리구당

50개의 세포피를 무작위로 선발하여 N₆1D 고체배지상에서 4주간 25°C 암소에서 배양한 후 캘러스 재생 빈도를 조사하였다. 재생된 캘러스는 N₆ 기본배지에 3% sucrose, 1 mg/L NAA와 5 mg/L kinetin이 첨가된 재분화배지(N₆R)에 옮겨 25°C에서 명배양(광도: 약 3,000 lx; 광주기 16시간)하였다. 재분화된 녹색의 shoot은 MS 기본배지(Murashige and Skoog, 1962)로 옮겨 뿌리를 유도하였다.

결과 및 고찰

세포의 전처리과정을 거치지 않고 단시간의 cryoprotectant 처리를 통하여 높은 빈도의 캘러스 재생과 식물체 재분화가 가능한 간편한 초저온보존 방법을 국내품종의 동진벼(자포니카형)와 태백벼(자포니카 × 인디카 교잡형)의 배발생 세포를 이용하여 개발하였다. Glycerol과 DMSO 농도가 캘러스의 재생률에 미치는 영향(Fig. 1)과 식물체 재분화에 미치는 영향은 Table 1에 제시되어 있다. 동진벼의 경우 2 M DMSO와 0.4 M sucrose를 혼용처리하였을 때 캘러스의 재생률이 88%로 가장 높았으며(Table 1), 태백벼의 경우 0.64 M DMSO와 0.4 M sucrose를 처리하였을 때 90%로 가장 높았다. 그러나 양 품종 모두 glycerol을 처리하였을 때는 캘러스의 재생이 이루어지지 않았다.

일반적으로 고농도의 삼투조절제가 첨가된 배지에서 3-4일간 전처리를 하게 되면 동결될 수 있는 세포내의 수분함량이 낮아짐으로써 세포의 동결과정에서 생존율이 증가하게 된다(Withers, 1985). 그러나 본 연구에서는 이와같은 전처리과정을 거치지 않고도 효율적인 캘러스의 재생이 가능하였다. 전처리를 수행하지 않은 *O. sativa* (품종명:

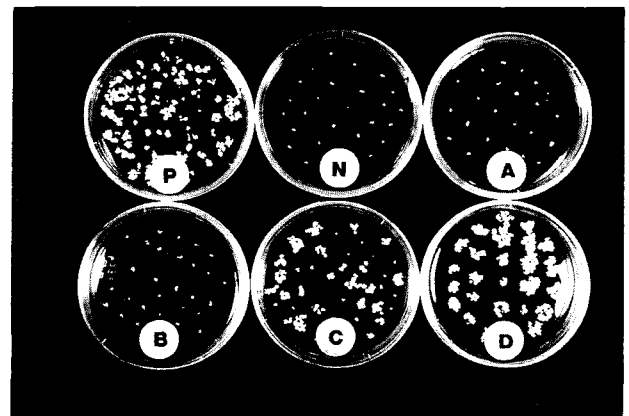


Figure 1. Effect of cryoprotectants on regrowth of cryopreserved rice cells after 4 weeks of culture on N₆1D medium. P, Positive control (no cryoprotectant and no freezing); N, Negative control (no cryoprotectant and slow freezing); A, 2 M glycerol + 0.4 M sucrose; B, 0.64 M DMSO + 0.4 M sucrose; C, 1.28 M DMSO + 0.4 M sucrose; D, 2 M DMSO + 0.4 M sucrose.

Table 1. Effect of cryoprotectant on the survival of rice (*O. sativa* L.) cell suspension cultures.^a

Cultivar	Treatment ^b	Freezing method	% Survival ^c	% Regrowth ^d
Donggin-byeo	No cryoprotectant	- ^e	100	100
	No cryoprotectant	SF ^f	0	0
	2 M DMSO	--	98	100
	2 M DMSO	RF ^g	0	0
	2 M Glycerol	SF	0	0
	0.64 M DMSO	SF	48	0
	1.28 M DMSO	SF	53	70
Taebaeg-byeo	2 M DMSO	S	74	88
	No cryoprotectant	-		100
	No cryoprotectant	SF		0
	2 M DMSO	-		100
	2 M DMSO	RF		0
	2 M Glycerol	SF		0
	0.64 M DMSO	SF		0
	1.28 M DMSO	SF		34
2 M DMSO	SF		30	

^aEach datum represents the mean value of three replicates.

^bFour-tenths molar sucrose was added to each cryoprotectant treatment.

^cThe frequency of cell survival was determined by TTC test.

^dThe frequency of callus regeneration from thawed cells on N61D medium was determined after 4 weeks of culture.

^e-: no freezing.

^fSF: slow freezing.

^gRF: rapid freezing.

Roncarolo)의 TTC 생존율 분석결과는 60-65%이었으며(Sala et al., 1979), 동진벼의 경우 DMSO의 처리 농도에 따라 차이를 보이지만 2 M DMSO 처리시 74%이었다. 따라서 전처리 과정이 필요하지 않은 이유로 먼저 본 실험에 이용된 배양세포는 2주간 배양된 세포를 이용하였는데, 이 기간동안 세포내에 축적된 다량의 대사산물이 고농도의 삼투조절제 역할을 대신함으로써 세포내의 동결가능한 수분함량을 낮추어 주었을 것으로 생각된다. 또한 cryoprotectant의 처리시간이 *Saccharum* sp.의 경우 2시간 (Gnanapragasam and Vasil, 1990), 벼의 경우 1시간 (Lynch et al., 1994) 보다 짧은 30분간 처리하였으므로 고농도의 cryoprotectant를 장기간 처리할 때 나타날 수 있는 독성효과를 줄일 수 있었기 때문이라 사료된다.

동결과정에서 세포가 죽게되는 이유는 세포내의 빙결정 형성에 따른 세포 막구조의 손상때문이다. 본 연구에서 cryoprotectant를 처리하지 않은 세포를 액체질소로 동결시킨 경우 세포의 생존이 불가능하였다. 또한 cryoprotectant를 처리한 세포를 액체질소에 급속하게 얼리면 세포는 세포내 빙결정 형성을 효과적으로 감소시키지 못하여 결국 죽게된다. 또한 세포의 생존율에 미치는 영향이 cryoprotectant의 독성효과에 기인한 것인지를 조사하기 위하여 가장 높은 농도의 cryoprotectant 처리구인 2 M DMSO와 0.4 M

sucrose를 혼용처리한 배양세포를 액체질소에 얼리지 않고 바로 TTC 생존율 분석과 캘러스의 재생률을 조사하였다 (Table 1). 그 결과 동진벼의 경우 각각 98%와 100%이었으며 태백벼의 경우는 캘러스의 재생률이 100%로서 cryoprotectant를 처리하지 않은 대조구와 동일하였다. 따라서 세포의 사망원인은 cryoprotectant의 독성효과에 기인한 것이 아니라 동결과정에서 이루어지는 세포내의 빙결정 형성에서 기인한 것이라 생각된다.

본 연구에서 glycerol과 DMSO가 캘러스의 재생률에 미치는 영향을 보면 동진벼의 경우 2 M DMSO 처리구에서, 태백벼의 경우 0.64 M DMSO 처리구에서 효과적으로 재생이 이루어졌다. 그러나 glycerol 처리구에서는 품종에 상관없이 캘러스의 재생이 이루어지지 않았다. 이 결과는 벼의 경우, 5% DMSO가 18% glycerol보다 캘러스의 재생에 더욱 효율적이라는 Sala (1979) 등의 보고와 일치한다. DMSO는 glycerol에 비하여 세포막에 대한 투과성이 더욱 높기 때문에 DMSO의 세포내 흡수가 용이할 것으로 사료된다. 또한 DMSO는 독성효과를 갖는 free radical의 scavenger로서 기능이 보고된 바 있다(Benson and Withers, 1987). 따라서 벼의 벼발생 세포의 경우 세포피로 구성되어 있기 때문에 glycerol에 비하여 DMSO의 세포내 흡수가 용이하게 이루어지며 또한 재생과정에서 free radical을 효과적으로 제거함으로써 캘러스의 재생률이 증가한 것으로 보인다.

벼의 배발생 세포는 비배발생 세포에 비하여 초저온 보존 후 재생률이 더욱 빠르고 (Lynch et al., 1994) 또한 동결과정에 있어서 내성이 높다(Benson et al., 1992). 아울러 초저온 보존후 재생된 캘러스를 N61D 배지에 재차 현탁배양을 시도한 결과 현탁배양세포는 원래 세포주와 동일한 전형적인 배발생세포주의 형태적 특징을 나타내었다(Fig. 2). 재생된 캘러스를 재분화 배지로 이식하여 명배양한 결과 약 100개의 식물체가 재분화되었으며(Fig. 2) 이중 25%는 albino이었다. 태백벼 배발생 현탁배양 세포에서 초저온 과정을 거치지 않고 직접 분화된 식물체중 albino인 경우는 10-15% 이하 (Min SR, 미발표 데이터)인 사실에 비추어 25%의 albino의 빈도는 cryoprotectant 혹은 냉동 및 해동과정의 물리적 스트레스에 의한 변이가 증가된 것으로 판단된다. 아직까지 인디카형벼에서 초저온 보존을 통한 식물체 재분화가 보고된 바는 없다. 그러나 본 연구에 이용된 태백벼의 경우 자포니카 × 인디카 교잡형이므로 인디카형 벼에서도 효율적인 초저온 보존법의 개발이 가능할 것으로 기대된다. 본 연구에서 개발된 세포주의 초저온보존 시스템은 생태계 파괴로 인하여 소실 및 멸종위기에 처한 유용한 자원식물을 효과적으로 보존할 수 있는 대안으로 제시할 수 있으리라 사료된다.

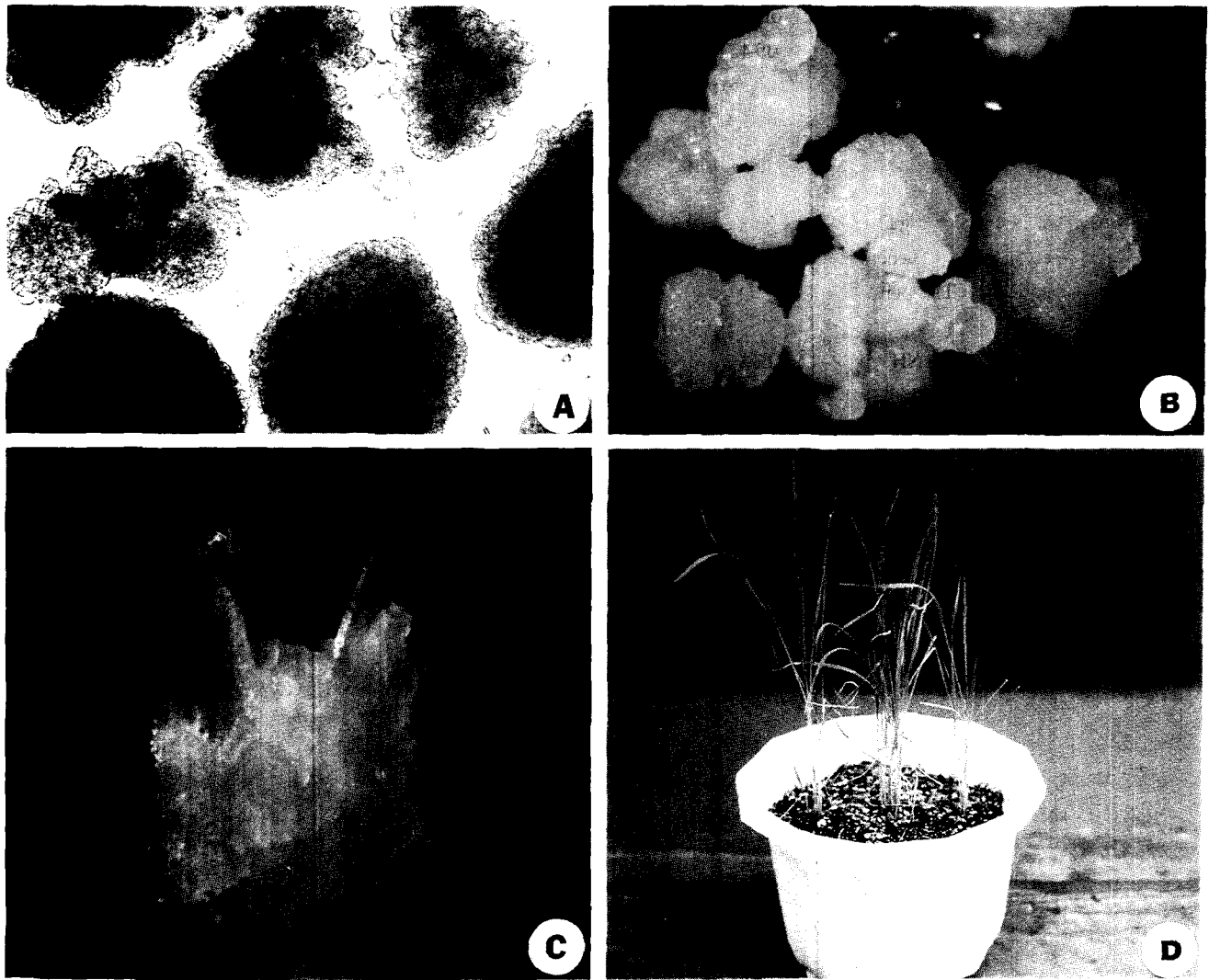


Figure 2. Plant regeneration from cryopreserved rice cells (cv Donggin-byeo). A, Reinitiated cell suspension cultures of rice after cryopreservation: B, Somatic embryo development on N6D medium: C-D, Regenerated plantlets.

국내품종인 동진벼와 태백벼의 미숙접합자배 유래 배발생 현탁배양 세포의 초저온 보존 시스템을 개발하였다. 동결/해동 후 캘러스 재생률은 동진벼의 경우 2 M DMSO와 0.4 M sucrose를 태백벼의 경우 0.64 M DMSO와 0.4 M sucrose를 혼용처리하였을 때 캘러스 재생률이 각각 88%와 90%로 가장 높았다. 또한 고농도의 삼투용액에서 배양세포의 전처리 과정은 필요하지 않았다.

재생된 캘러스를 1 mg/L NAA와 5 mg/L kinetin이 첨가된 N6 배지로 이식하여 명배양하였을 때 체세포배발생을 통하여 다수의 유식물체가 발달하였다. 약 100여개의 식물체가 재분화되었으며, 이중 25%는 albino이었다.

인용문헌

Benson EE, Lynch PT, Jones J (1992) The detection of lipid peroxidation products in cryoprotected and frozen rice cells: consequences for post thaw survival. *Plant Science* 85: 107-114

Cella R, Colombo R, Galli MG, Nielsen E, Rollo F, Sala F (1982) Freeze preservation of rice cells: a physiological study of freeze thawed cells. *Physiol Plant* 55: 279-284

Chen THH, Kartha KK, Gusta LV (1985) Cryopreservation of wheat suspension culture and regenerable callus. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 4: 101-109

Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yim KC, Chu CY, Bi FY (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sinica* 18: 659-668

Gnanapragasam S, Vasil IK (1990) Plant regeneration from a

- cryopreserved embryogenic cell suspension of a commercial sugarcane hybrid (*Saccharum* sp.). *Plant Cell Rep* **9**: 419-423
- 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
- Lynch PT, Benson EE, Jones J, Cocking EC, Power JB, Davey MR** (1994) Rice cell cryopreservation the influence of culture methods and the embryogenic potential of cell suspensions on post-thaw recovery. *Plant Science* **98**: 185-192
- Min SR, Jeong WJ, Kim MK, Song NH, Liu JR** (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, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497
- Sala E, Cella R, Rollo F** (1979) Freeze-preservation of rice in suspension culture. *Physiol Plant* **45**: 170-176
- Steponkus PL, Lanphear FO** (1967) Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiol* **42**: 1423-1426
- Kuriyama A, Watanabe K, Ueno S, Mitsuda H** (1989) Inhibitory effect of ammonium ion on recovery of cryopreserved rice cells. *Plant Science* **64**: 231-235
- Withers LA** (1985) Cryopreservation of plant cells and organs. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 243-267
- Withers LA, King PJ** (1979) Proline a novel cryoprotectant for the freeze preservation of *Zea mays* L. *Plant Physiol* **64**: 675-687

(1995년 5월 31일 접수)