

벼 뿌리조직 유래의 캘러스로부터 체세포배 형성과 식물체 재분화

손재근* · 김경민 · 김종수
경북대학교 농학과

Plant Regeneration and Somatic Embryo Formation from Root-Derived Callus of Rice

Jae Keun SOHN*, Kyung Min KIM, and Jong Soo KIM

Department of Agronomy, Kyungpook National University, Taegu, 702-701. *Corresponding author.

The competence of callus formation and plant regeneration from root-derived callus was higher in japonica cultivars than those of Tongil-type cultivars of rice. A japonica type cultivar, Yeongdeogbyeo, showed the highest capacity (13%) for plant regeneration from root calli of 6 cultivars tested. The callus induced from seed and root tissues maintained higher capacity for plant regeneration during 7 passages of subculture on N₆ solid media at 2-week intervals. The maximum frequency (2×10^5 /mL) of round cells and their cell colonies showed about 24 days after suspension culture of root-derived callus in N₆ medium with 1 mg/L 2,4-D, 300 mg/L casein hydrolysate, 10 mM L-proline, 20 g/L sucrose and 30 g/L sorbitol. The frequency of somatic embryo formation in suspension cultures of root-derived callus increased with prolonged advance of subculture time from 30 to 90 days, but their regenerative capacities decreased.

Key words: callus formation, suspension culture

화분과 작물의 조직배양에서 유기되는 캘러스에는 색깔이 희고, 연한 황색을 띠면서 불투명하고 그 표면이 nodular하며 organized된 배발생캘러스(embryogenic callus)와 황갈색을 띠면서 friable하고 unorganized된 비배발생캘러스(non-embryogenic callus)로 구분되고, 배발생캘러스는 장기간의 계대배양에서도 비교적 오랫동안 재분화력이 유지되는 것으로 알려져 있다(Vasil and Vasil, 1984). 벼의 배발생캘러스 유기에는 어린화서(Chen et al., 1985), 미숙배(Koetje et al., 1989; Sohn and Lee, 1992), 유엽(Wernicke et al., 1981), 뿌리(Abe and Futsuhara, 1985, 1991) 등이 이용되고 있으나, 벼 품종이나 배지조성에 따라 배발생캘러스의 형성률이 다를 뿐만 아니라 조직부위에 따라서도 배양효율이 크게 다르다. 특히 미숙배의 경우는 배발생캘러스나 부정배 형성에서 다른 조직부위 보다 비교적 효과적인 것으로 알려져 있다. 그러나 배양재료의 안정적인 공급이라는 측면에서는 어린 뿌리조직이나 완숙배가 오히려 효과적인 수 있다.

따라서 본 연구에서는 벼의 뿌리조직을 기내배양하여 배발생캘러스 형성과 식물체 재분화에 영향을 미치는 몇 가지 요인을 구명하고자, 캘러스 형성과 식물체 재분화 능력

의 벼 품종간 차이, 계대배양 횟수에 따른 식물체 재분화율, 완숙배와 뿌리조직에서 형성된 캘러스의 현탁배양 기간별 배발생캘러스와 식물체 분화율 등에 대한 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

본 실험에는 1992년 경북대학교 농과대학 실습포장에서 수확한 자포니카형 4품종(추청벼, 일품벼, 영덕벼, 영남벼)과 통일형 2품종(밀양 23호, 칠성벼)을 공시품종으로 이용하였다.

공시품종의 완숙종자로부터 내외영을 제거한 건전한 현미를 70% 에탄올 용액에 30초, 1% sodium hypochlorite 용액에 40분간 침지한 후, 살균수로 3-5회 씻은 다음 멸균수(5-6 ml)를 넣은 200 ml 배양병에 품종별로 20립씩 파종하였다. 파종 5-6일 후에 발근된 어린 뿌리의 생장점 부근을 제거하고 10 mm크기로 절단하여 배지가 20 ml씩 분주된 샬레(\emptyset 9 cm)에 10개씩 배양하여 캘러스 형성을 유도하였다. 뿌리

조직의 캘러스 형성과 식물체 재분화율을 완속배에서 형성된 캘러스와 비교하기 위하여 “영덕벼”의 뿌리조직에서와 같은 방법으로 살균하여 배지가 20 ml씩 분주된 샤프에 배반이 묻히지 않게 10립씩 배양하였다. 캘러스 형성에는 2,4-D (1 mg/L), casein hydrolysate (2 g/L), sucrose (30 g/L) 및 gelrite (2 g/L)가 첨가된 N₆배지 (Chu et al., 1975)를 이용하였고, 식물체 재분화에는 NAA (1 mg/L), kinetin (5 mg/L), sucrose (30 g/L) 및 gelrite (2 g/L)가 첨가된 N₆배지를 이용하였다. 캘러스 형성은 26 ± 1°C의 암상태에서, 식물체 재분화는 캘러스 형성 배지에서 30일 정도 자란 캘러스를 1.0~1.5 mm 크기로 세분하여 재분화 배지가 20 ml씩 분주된 샤프에 10개씩 이식하여 26±1°C, 16시간 명상태 (2,500 lx)에서 배양하였다. 캘러스 생체중은 배양 30일 후에, 식물체 재분화율은 캘러스 이식 40일 후에 조사하였다.

고체배지에서 계대배양 기간 및 횟수와 식물체 재분화율과의 관계를 조사하고자, “영덕벼”의 뿌리조직과 현미를 캘러스 형성배지에 배양하여 30일간 형성된 캘러스를 2주 간격으로 7회 계대배양하면서 계대배양 횟수별 식물체 분화율을 조사하였다. 캘러스의 현탁배양에서 세포의 증식과 형태, 배발생세포괴(embryogenic cell clump)와 부정배의 형성 정도를 조사하기 위하여 고체배지에서 형성된 캘러스 100 mg을 2,4-D (1 mg/L), casein hydrolysate (300 mg/L), L-proline (10 mM), sucrose (20 g/L) 및 sorbitol (30 g/L)이 첨가된 N₆배지가 20 ml씩 분주된 삼각 플라스크(100 mL)에 넣은 후, 120 rpm(26 ± 1°C, 암상태)으로 진탕배양하면서 3일 간격으로 새로운 배지를 1:1의 비율로 교환해 주면서 계대배양하였다. 뿌리조직과 현미에서 형성된 캘러스를 30일 동안 현탁배양하면서 6일 간격으로 세포의 형태별 증가량과 세포군의 수를 혈구계산기로 측정하였고, 120일간 계대배양하면서 30일 간격으로 형성된 부정배의 수를 조사하는 한편, 각각의 체세포배를 N₆ 재분화배지로 이식하여 계대배양 기간에 따른 식물체 재분화율을 비교하였다.

결과 및 고찰

“영덕벼”와 5품종의 뿌리조직과 현미를 캘러스 형성배지에 배양하여 30일 후에 각 품종별로 형성된 캘러스의 생체중과 캘러스 이식 40일 후의 식물체 재분화율을 조사한 바 (Table 1), 품종 유형별로는 대체로 자포니카형 품종의 뿌리조직에서 형성된 캘러스의 생체중이 통일형에 비해 무거운 편이었고, 뿌리조직에서 형성된 캘러스의 식물체 재분화율 또한 품종간 차이를 보여 “영덕벼”와 “추청벼”의 캘러스에서 식물체 재분화율이 각각 13%와 10%로 가장 높게 나타났다.

“영덕벼”의 현미와 뿌리조직에서 형성된 캘러스를 N₆ 고체배지상에서 2주 간격으로 계대배양하면서 계대배양 횟수

Table 1. Varietal differences of callus growth and plant regeneration in the root and mature zygote embryo culture of 6 Korean rice cultivars.

Explant	Type and cultivars	Fresh weight of callus/root explant calli X ± SD (mg)	No. of transferred calli	No. of calli with		
				Green spot (%)	Root (%)	Plant (%)
Root	Japonica type					
	Chucheongbyeo	12 ± 4.9	60	9(15.0)	32(53.3)	6(10.0)
	Ipoomye	24 ± 6.5	100	7(7.0)	8(8.0)	1(1.0)
	Yeongdeogbyeo	32 ± 9.2	100	16(16.0)	52(52.0)	13(13.0)
	Yeongnambyeo	31 ± 9.2	90	4(4.4)	30(43.3)	1(1.1)
	Tongil type					
Chilseongbyeo	9 ± 2.2	60	2(3.3)	36(60.0)	0(0.0)	
Milyang 23	13 ± 2.3	100	3(3.0)	54(54.0)	1(1.0)	
Zygote embryo	Japonica type Yeongdeogbyeo	129 ± 3.3	100	26(26.0)	6(6.0)	28(28.0)

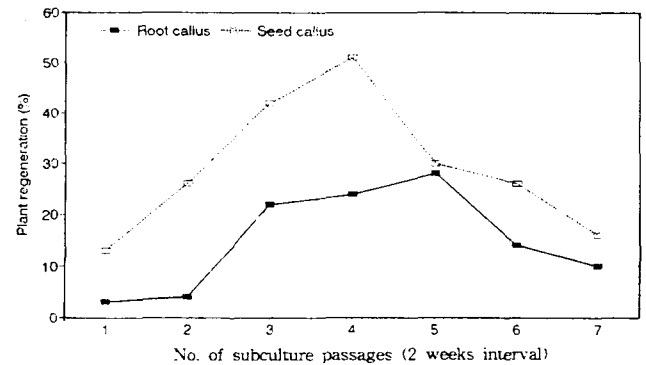


Figure 1. Effect of subculture passages on plant regeneration from rice callus subcultured on N₆ medium.

별 식물체 분화율을 조사한 바(Figure 1), 뿌리조직이나 현미배양에서 형성된 캘러스는 다같이 계대배양 횟수가 4회까지 증가될수록 식물체 재분화율이 높아지는 경향이 있었지만, 계대배양 횟수에 따른 식물체 재분화율의 증가 양상은 두 조직부위 간에 다소 다르게 나타나 뿌리조직 보다는 현미 유래의 캘러스에서 식물체 재분화율이 높은 경향이 있었다. 또한 계대배양 과정에서 Figure 4-1과 같이 캘러스의 색깔이 희고 불투명한 배발생캘러스와 황갈색을 띤 비배발생캘러스가 형성됨을 확인할 수 있었다.

일반적으로 벼의 캘러스를 계대배양하게 되면 식물체 재분화력이 감소하지만(Inoue and Maeda, 1980) 배발생캘러스의 경우는 비교적 장기간 재분화력이 높게 유지되며(Heyer et al., 1983), 특히 배지 내에 sorbitol이나 mannitol과 같은 삼투압 조절제를 첨가하게 되면 캘러스의 재분화 능력은 장기간 높게 유지되는 것으로 알려져 있다(Kavi Kishor and Reddy, 1986). 본 연구에서 벼의 뿌리조직이나 현미로부터 형성된 캘러스를 2주 간격으로 7회까지 계대배양하였을 때 식물체 재분화율이 일정기간(4회)까지 증가하다가 감소하

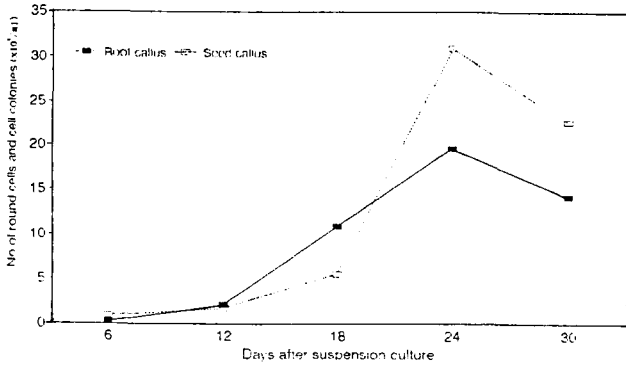


Figure 2. Number of round cells and cell colonies to days after suspension culture of calli formed from root and seed of rice.

는 경향이었는데 이는 Inoue와 Maeda(1980)의 연구 결과와 유사함을 알 수 있었다.

뿌리조직과 현미에서 형성된 캘러스를 액체배지에 30일 동안 계대배양하면서 6일 간격으로 세포의 외형이 둥글면서 세포질이 풍부한 것과 이들의 cell colony (Figure 5-2)를 조사한 바(Figure 2), 세포질이 풍부한 둥근 세포나 그들의 colony수는 24일간 현탁배양했을 때 최대치에 달하였고 그 이후는 감소하는 경향이였다. 뿌리조직과 현미 유래의 캘러스를 120일 동안 현탁배양하면서 30일 간격으로 체세포배 (Figure 5-4)형성률을 조사한 바(Figure 3-A), 현미 캘러스의 경우는 60일간 현탁배양 되었을 때 47%로 가장 높았고, 그 이후는 점차 감소하는 경향이였다. 그러나 뿌리조직 캘러스의 배양 30일 후의 부정배 형성률은 6%로 현미 캘러스에 비해 현저히 낮았지만, 현탁배양기간이 90일로 연장되었을 때는 부정배 형성률이 33%로 증가하는 경향이였다.

그리고 현미와 뿌리조직에서 형성된 캘러스를 90일간 현탁배양하면서 형성된 부정배를 현탁배양 기간별로 N6 재분화배지에 이식한 바(Figure 3-B), 식물체 재분화(Figure 5-5)는 현탁배양 기간이 길어질수록 저조한 것으로 나타났다.

벼의 미숙배나 약배양에서 형성된 캘러스를 현탁배양하게 되면 두가지 유형의 세포가 관찰되며, 그 중에서 세포의 크기가 작고 모양이 둥글면서 세포질이 풍부한 것이 배발생캘러스로 발달하는 것으로 알려져 있는데(Yoshida et al., 1990), 본 연구에서 뿌리조직에서 형성된 캘러스의 현탁배양에서도 모양이 둥글고 크기가 작은 세포와 tube 모양의 세포가 관찰되었다. 또한 현탁배양 기간이 24일 이상 연장되면 모양이 둥근 세포의 수가 줄어들었는데, 이는 배양기간이 길어짐에 따라 이들 세포나 세포피가 배발생캘러스나 체세포배로 발달되었기 때문인 것으로 생각된다.

본 연구에서 뿌리나 조직 유래의 캘러스를 현탁배양 했을 때 배양 90일 이후부터는 부정배의 형성률이 감소하였고 현탁배양 기간이 연장될수록 형성된 부정배의 식물체 분화률도 낮아지는 경향이었는데 (Figure 3-B), 이러한 결과는 뿌리

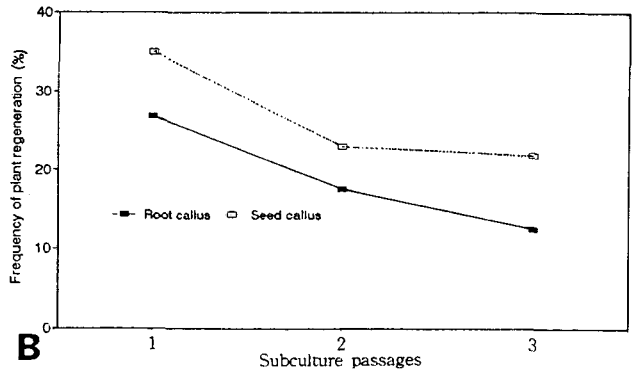
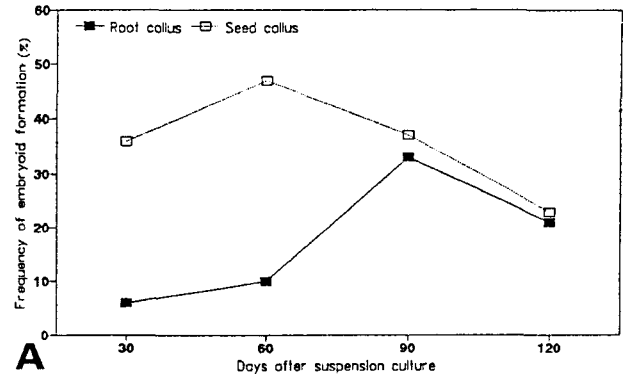


Figure 3. Frequency of somatic embryos formation to days after suspension culture (A), and plant regeneration from somatic embryos with different subculture passages (B) of root- and seed-derived calli of rice.

조직에서 형성된 캘러스를 액체배지에서 계대배양 했을 때 배양횟수가 증가하면 부정배 형성률과 식물체 재분화력도 낮아졌다고 한 Abe와 Futsuhara (1985, 1991)의 연구 결과와 일치되는 경향이였다. 그리고 장기간 현탁배양된 캘러스로부터 형성된 부정배에서 식물체 재분화율이 낮아지는 것은 재분화배지로 이식된 부정배는 대부분 갈변현상이 심하게 일어나 재분화력이 상실되었기 때문이라고 생각되나, 이에 대해서는 앞으로 보다 깊이 있는 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

적 요

벼의 뿌리조직을 기내배양하여 배발생캘러스의 형성과 식물체 재분화율의 품종간 차이 및 완숙배와 뿌리조직에서 유래된 캘러스의 현탁배양 기간별 부정배 형성정도와 식물체 재분화율 등에 대한 몇가지 실험을 수행하여 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다. 벼 뿌리조직으로부터 캘러스 형성 및 식물체 재분화 능력의 품종간 차이는 뚜렷하게 나타났다으며, 자포니카형 품종들이 통일형 품종에 비해 캘러스의 성장량도 많고 식물체 재분화율도 높은 경향이였고, 공

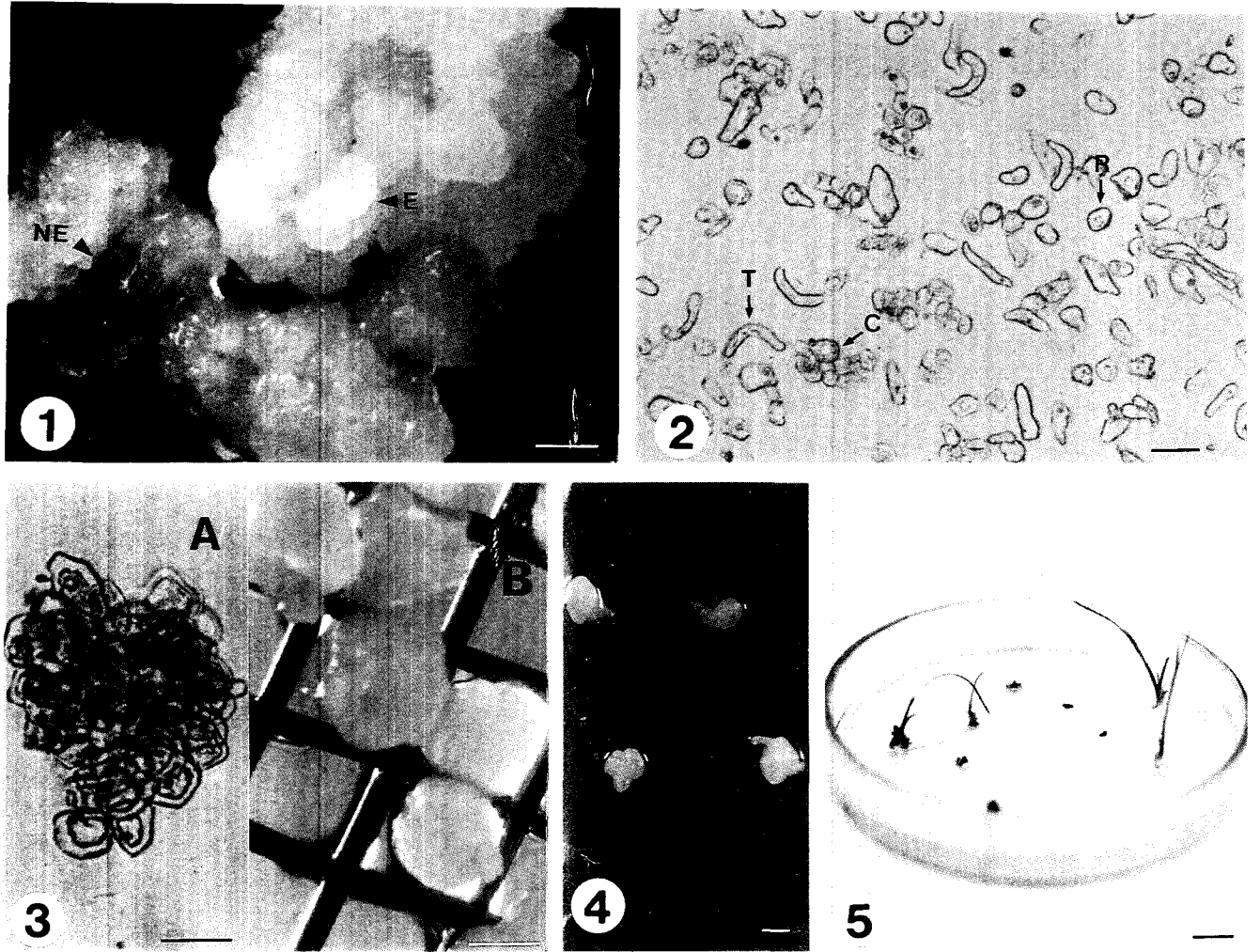


Figure 4. Formation of somatic embryos and plant regeneration from root callus of rice. 1: Embryogenic (E) and non-embryogenic Callus (NE) (bar, 1 mm). 2: Round cell (R), tube cell (T) and cell colony (C) (bar, 1 mm). 3: Embryogenic cell cluster (A) (bar, 0.1 mm), and cell clump (B) (bar, 0.5 mm) in liquid medium. 4: Embryoid formed from suspension culture (bar, 1 mm). 6: plant regeneration (bar, 10 mm).

시품종 중 "영덕벼"의 식물체 재분화율이 13%로 가장 높았다. 뿌리 및 현미배양에서 형성된 캘러스를 고체배지에서 2주 간격으로 7회 계대배양한 바, 계대배양 횟수가 증가됨에 따라 식물체 재분화율이 증가되었다가 5회째부터는 점차 감소하였다. 뿌리조직에서 형성된 캘러스의 현탁배양에서 모양이 둥근세포와 그들의 세포괴는 배양 24일 후에 최대치를 나타내었고, 그 이후는 감소하였다. 현탁배양 기간별 뿌리조직에서 형성된 캘러스의 체세포배 형성률은 배양 90일까지는 배양기간이 길어질수록 증가하였으나, 그 이후는 감소하였고, 식물체 재분화율도 배양기간이 길어질수록 감소하는 경향이었다.

인용문헌

Abe T, Futsuhara Y (1985) Efficient plants regeneration by somatic embryogenesis from root callus tissues of rice (*Oryza sativa* L.). J Plant Physiol 121: 111-118

Abe T, Futsuhara Y (1991) Regeneration of rice plants from suspension cultures. In YPS Bajaj, ed, Biotechnology Agriculture and Forestry 14. Springer-Verlag, Berlin, pp 38-46

Chen TH, Lam L, Chen SC (1985) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured young inflorescences of *Oryza sativa* L. (rice). Plant Cell Tissue Organ Culture 4: 51-54

Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY, Bi FY (1975) Establishment of efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Sci Sin 18: 659-68

Heyser JW, Dykes TA, DeMott KJ, Nabors MW (1983) High frequency, long term regeneration of rice from callus culture. Plant Science Letters 29: 175-182

- Inoue M, Maeda E (1980) Effects of auxins and cytokinins on the occurrence of green regions in rice callus cultures, Japan J Crop Sci 49: 167-174
- Kavi Kishor PB, Reddy GM (1986) Regeneration of plants from long-term cultures of *Oryza sativa* L. Plant Cell Reports 5: 391-393
- Koetje DS, Grimes HD, Wang YC, Hodges TK (1989) Regeneration of indica rice (*Oryza sativa* L.) from primary callus derived from immature embryos. J Plant Physiol 135: 184-190
- Sohn JK, Lee GH (1992) Effect of sorbitol on embryogenic callus and embryoid formation in callus cultures of rice (*Oryza sativa* L.). Korean J Plant Tissue Culture 19: 179-184
- Vasil V, Vasil IK (1984) Induction and maintenance of embryogenic callus cultures of *Gramineae*. In IK Vasil, ed, Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants Vol. Academic Press, Orlando, Florida, pp 36-42
- Wernicke W, Brettell R, Wakizuka T, Potrykus I (1981) Adventitious embryoid and root formation from rice leaves, Z Pflanzenphysiol Bd 103: 361-365
- Yoshida S, Imamura K, Iwai M (1990) The effects of the media with mannitol on regeneration and growth of rice anther callus in suspension culture. Japan J Plant Breeding 40: 40-41

(1995년 5월 15일 접수)