

벼의 종자배양에서 배의 성숙정도와 Gelrite 농도가 캘러스 형성 및 식물체 재분화에 미치는 영향

권용삼* · 김경민 · 김도훈¹ · 손재근

경북대학교 농과대학 농학과

¹동아대학교 생명자원과학부

Effects of Embryo Developmental Stage and Gelrite Concentration on Plant Regeneration in Seed Culture of Rice

Yong-Sham Kwon*, Kyung-Min Kim, Doh-Hoon Kim¹ and Jae-Keun Sohn

Department of Agronomy, College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea and

¹College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea

Abstract

To identify the effects of embryo developmental stage and gelrite concentration on plant regeneration in seed culture of rice, mature and immature seeds of rice were cultured on the N₆ medium supplemented with 2 mg/ℓ 2,4-D and different levels of gelrite (0.2~1.0%). The calli formed from immature embryos were produced more plants than those from mature embryos. The maximum frequency of plant regeneration was achieved in the culture of the calli of immature embryos which was harvested at the 21th day after pollination. The plant regeneration on the medium with gelrite was more accelerate than that on the medium with agar. The highest frequency (55%) of plant regeneration was obtained from the calli transferred to the medium with 6 g/ℓ gelrite.

Key words – Rice, Seed culture, Immature embryo, Gelrite

서 론

벼를 포함한 대부분의 화본과 식물의 조직을 기내에 배양하면 캘러스 형성과정을 거쳐서 식물체가 재분화되기 때문에, 배양세포나 조직으로부터 많은 식물체를 얻기 위해서는 재분화력이 높은 캘러스의 획득이 무엇보다 중요하다. 화본과 식물의 조직배양에서 유기되는 캘러스에는 색

깔이 희고, 연한 황색을 띠면서 불투명하고, 그 표면이 nodular하며 organized된 배발생 캘러스(embryogenic callus)와 황갈색을 띠면서 friable하고 unorganized된 비배발생 캘러스(non embryogenic callus)의 두가지 형태가 발생한다고 보고되고 있다[10]. 식물체의 재분화율을 향상시키려면 배발생 캘러스의 발생빈도를 높이는 것이 무엇보다 중요한데, 이는 모식물의 genotype, 배양재료, 배지의 조성, 배양방법 등이 크게 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다[2,3,8]. 벼 종자배양의 경우 캘러스의 유기와 식물체 분화에 대한 다양한 연구가 수행되어져 왔을 뿐만 아니라 종자

*To whom all correspondence should be addressed

Tel: (053) 950-5711, Fax: (053) 958-6880

E-mail: ys4654@naver.com

의 발육 단계에 따라 식물체 분화율이 상이하게 나타난다고 알려져 있다. 그러나 모품종의 genotype과 재배환경에 따라 배의 발육단계가 서로 다르기 때문에 적정 발육단계의 종자를 선정하여 배양하는 것이 무엇보다 중요하다고 할 수 있다[10].

최근에 벼의 조직배양에서 배지내에 첨가되는 응고제 종류나 농도에 따라 배양효율이 다르다는 것이 알려져 오고 있는데, 가장 널리 이용되고 있는 것이 gelrite이며, agarose의 경우, 고가이기 때문에 원형질체 배양 등 특수한 목적의 경우에만 한정적으로 사용되고 있다[9]. 벼 종자배양의 경우 4~6 g/l의 gelrite 농도가 식물체 재분화에 효과적이라는 보고도 있고[7], 벼의 약배양에서 agar보다는 고농도의 gelrite가 캘러스 형성과 식물체 분화 및 자연 배가된 2배체의 획득 빈도를 향상시키는 것으로 보고되고 있다 [6,11]. 그러므로 벼의 종자배양에서 식물체 재분화 능력에 영향을 미치는 종자의 적정발육 단계와 gelrite의 적정 농도가 구명된다면 벼 형질전환 효율향상에 크게 기여할 수 있을 것이다[4].

따라서 본 연구에서는 벼의 종자배양에서 식물체의 획득빈도를 높이고자, 종자의 성숙정도에 따른 식물체 재분화 능력의 차이와 배지내에 첨가되는 gelrite 적정 농도를 구명하기 위하여 몇 가지 실험을 수행하여 얻은 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에는 경북대학교 농과대학 실습포장에서 표준재 배법으로 재배된 자포니카인 ‘일미벼’와 통일형인 ‘남천벼’를 공시품종으로 이용하였다.

종자 성숙정도에 따른 식물체 재분화

벼의 종자성숙에 따른 식물체 재분화 능력의 차이를 조사하기 위하여 수분 후 14, 21, 28일된 미숙종자와 완숙종을 70% ethanol 용액에 30초, 2% NaOCl (sodium hypochlorite)용액에 40분간 소독한 후, 멸균수로 3회 세척한 다음 20 ml씩 배지가 분주된 9 cm 샤테에 10립씩 치상하여 26±1℃ 암조건에서 캘러스를 유기시켰다. 캘러스 유기에는 2 mg/l 2,4-D, 30 g/l sucrose, 5 g/l gelrite 및 2 g/l

casein hydrolysate (CH)가 첨가된 N₆ 배지[1]를 이용하였다. 캘러스 형성정도는 치상된 종자에 대한 캘러스가 형성된 종자의 비율과 1립에서 형성된 캘러스의 생체중 및 건물중을 5반복 조사한 평균치로 조사하였다. 식물체 재분화는 캘러스 유기배지에서 30일 동안 배양된 캘러스를 1.0~1.5 mm크기로 세분하여 30 g/l sucrose, 1 mg/l NAA, 5 mg/l kinetin, 4 g/l gelrite가 첨가된 N₆ 배지가 20 ml씩 분주된 샤테 (φ9 cm)에 치상한 후, 명조건 (2,600 Lux)에서 배양 30일 동안 식물체의 분화정도를 조사하였다.

Gelrite 농도에 따른 식물체 재분화

종자 성숙정도에 따른 식물체 재분화 실험에서 식물체 재분화 능력이 가장 높은 배양재료를 선정하여 2 mg/l 2,4-D가 첨가된 N₆ 배지에 캘러스를 유기시킨 다음, 여러 가지 농도의 gelrite (2, 4, 6, 8, 10 g/l)와 8 g/l의 agar가 각각 첨가된 식물체 재분화 배지에 캘러스를 이식하여 식물체 분화율을 조사하였다.

결과 및 고찰

종자 성숙정도에 따른 식물체 재분화

종자의 성숙정도가 캘러스 형성에 미치는 영향을 조사한 바(Table 1), 공시 품종에 관계없이 완숙종자보다는 미숙종자에서 캘러스 형성률이 높게 나타났고 생체중 또한 무거운 경향을 나타내었다. 특히, ‘일미벼’와 ‘남천벼’의 수분 후 21일된 미숙 종자에서 유기된 캘러스의 생체중이 가장 무겁게 나타났다.

‘일미벼’와 ‘남천벼’의 완숙종자와 미숙종자에서 유래된 캘러스를 재분화 배지에 이식하여 종자의 성숙정도에 따른 식물체 재분화율을 비교한 바(Tale 2), 공시품종 모두 미숙종자에서 유래된 캘러스가 완숙종자에서 유래된 캘러스보다 식물체 분화율이 높은 경향이었으며, 수분후 21일된 미숙종자에서 유래된 캘러스의 식물체 분화율이 각각 37% (일미벼) 와 20%(남천벼)로 가장 높게 나타났다.

벼의 미숙종자 배양에서는 수분 후 10일된 미숙종자로부터 유기된 캘러스에서 식물체 재분화율이 가장 높았다고 한 Lai와 Liu [5]의 연구결과와 수분 후 21일된 미숙종자 유래의 캘러스에서 식물체 재분화율이 가장 높게 나타난 본 실험의 결과와는 다소 상이한데 이러한 차이는 모식물

벼의 종자배양에서 배의 성숙도와 Gelrite 농도가 캘러스 형성 및 식물체 재분화에 미치는 영향

Table 1. Effect of developmental stage of seed on callus formation in seed culture of rice

Cultivars	Developmental stage of seeds	No. of seeds transferred ^b	% of seeds forming calli	Callus weight per a seed (mg)
Ilmibyeyo	Immature			
	14 DAP ^a	100	77.0	180±20.3
	21 DAP	113	86.7	215±25.8
	28 DAP	111	64.1	190±18.7
	Mature	112	62.7	175±15.5
Namcheonbyeyo	Immature			
	14 DAP	55	69.6	140±22.0
	21 DAP	100	71.0	158±17.9
	28 DAP	103	58.0	120±13.0
	Mature	103	52.0	98±20.1

^aDays after pollination.

^bCallus induction; N₆+2 mg/ℓ 2,4-D+2 g/ℓ CH+30 g/ℓ sucrose+5 g/ℓ gelrite.

Table 2. Effect of developmental stage of seed on plant regeneration in seed culture of rice

Cultivars	Developmental stage of seeds	No. of calli transferred ^b	% of plant regeneration	
			green	albino
Ilmibyeyo	Immature			
	14 DAP ^a	160	25.0	1.9
	21 DAP	100	37.0	2.3
	28 DAP	150	23.0	3.4
	Mature	150	17.0	2.0
Namcheonbyeyo	Immature			
	14 DAP	150	12.7	1.8
	21 DAP	100	20.0	3.1
	28 DAP	120	10.5	2.3
	Mature	130	5.4	2.2

^aDays after pollination.

^bPlant regeneration; N₆+1 mg/ℓ NAA+5 mg/ℓ kinetin+2 g/ℓ CH+30 g/ℓ sucrose+4 g/ℓ gelrite.

의 genotype와 생육환경 및 배양조건이 상이한데서 비롯된 결과라고 추정되며, 앞으로 이러한 연구결과의 원인에 대한 구체적인 연구가 수행되어져야 될 것으로 사료되며 본 연구의 결과는 벼의 세포 및 조직배양에서 문제가 되고 있는 식물체 재분화 능력 향상에 유용하게 활용되어질 수 있을 것으로 사료된다.

배지내의 응고제의 종류와 농도에 따른 식물체 재분화 '일미벼'와 '남천벼'의 수분후 21일된 미숙종자를 5 g/ℓ의 gelrite가 첨가된 배지에 배양하여 캘러스를 유기시킨 다음 gelrite의 농도가 다른 재분화 배지에 이식하여 배양 30일 후의 식물체 재분화율을 조사한 바(Table 3), 자포니카인 '일미벼'는 6 g/ℓ의 gelrite가 첨가된 배지에서 재분

Table 3. Effect of gelling agent on plant regeneration of in seed culture of rice

Cultivars	Gelling agents (g/ l)	No. of calli ^a transferred	% of plant regeneration	
			green	albino
Ilmibyeo	Gelrite	2	17.0	0.0
		4	37.0	1.0
		6	55.0	2.0
		8	24.0	0.0
		10	10.0	0.0
	Agar	8	15.0	0.0
	Namcheonbyeo	Gelrite	2	5.0
4			17.0	0.0
6			30.0	1.0
8			37.0	0.0
10			10.0	0.0
Agar		8	2.0	0.0

^aCallus induction; N₆+2 mg/ l 2,4-D+2 g/ l CH+30 g/ l sucrose+5 g/ l gelrite

화율이 55%로 가장 높게 나타났으며, gelrite의 농도가 증가할수록 재분화율은 감소하는 경향을 나타내었다. 통일형인 '남천벼'의 경우 8 g/ l의 gelrite의 농도가 첨가될 경우 37%의 식물체 분화율을 나타내었다. 그리고 식물체 재분화 배지에 agar를 첨가할 경우 gelrite가 첨가된 배지보다 식물체 분화율은 현저히 낮았다.

벼의 조직배양에서 재분화 배지에 첨가되는 응고제의 종류 및 농도가 배양효율에 영향을 미치는 것으로 여러 연구자에 의해 지적되고 있는데, 민 등[7]은 벼의 종자배양에서 6 g/ l의 gelrite가 효과적이라고 하였으며, 양과 오[11]는 벼의 약배양에서 4~6 g/ l의 gelrite가 녹색체 분화율을 향상시킨다고 하였다. 본 연구에서도 자포니카인 '일미벼'의 경우 6 g/ l의 gelrite가 첨가된 배지에서 식물체 분화율이 55%로 가장 높게 나타나 gelrite의 농도면에서 민 등[7]과 양과 오[11]의 연구결과와 일치하는 경향이였다. 그러나 통일형인 '남천벼'의 경우 8 g/ l의 gelrite가 첨가된 배지에서 식물체 분화율이 가장 높게 나타나 품종 유형간에 적정 gelrite 농도는 다른 것으로 나타났다. 이러한 연구결과는 앞으로 우수한 형질을 가진 벼 품종을 유전적으로 안정하게 대량 증식시키거나 유용 유전자를 도입하는 형질전환 분야에 매우 유용하게 이용되어질 수 있을 것

으로 생각된다.

결 론

벼의 종자배양에서 재분화된 식물체의 획득빈도를 높이고자 종자의 성숙정도와 배지내에 첨가되는 응고제의 종류 및 농도에 따른 식물체 재분화 정도를 조사한 결과를 요약하면 다음과 같다. 캘러스 형성능력은 완숙배보다 미숙종자에서 높은 경향이였고, 수분후 21일된 미숙종자에서 유래된 캘러스의 식물체 재분화율이 가장 높게 나타났다. 5 g/ l의 gelrite가 첨가된 배지에서 형성된 캘러스를 6 g/ l의 gelrite를 함유한 배지에 이식했을 때 식물체 재분화율이 가장 높게 나타났다.

참 고 문 헌

1. Chu, C. C., C. C. Wang, C. S. Sun, C. Hsu, K. C. Yin, C. Y. Chu and F. Y. Bi. 1975. Establishment of efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin.* **18**, 659-680.
2. Croughan, T. P. and Q. R. Chu. 1991, *Rice (Oryza*

- sativa* L.); Establishment of callus culture the regeneration of plants, pp 19-37, In Bajaj, Y. P. S. (ed), *Rice*, Springer-verlag, Berlin Heidelberg. .
3. Heyser, J. W., T. A. Dykes, K. J. Demott and M. W. Nibors. 1983. High frequency, long term regeneration of rice from callus culture. *Plant Science Letters* **29**, 175-182.
 4. Hiei, Y., T. Komari and T. Kubo. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology* **35**, 205-218.
 5. Lai, K. W. and L. F. Liu. 1982. Induction and plant regeneration of callus from immature embryos of rice plants (*Oryza sativa* L.). *Japan J Crop Sci* **51**, 70-74.
 6. Lee, J. H. and S. Y. Lee. 1995. Effect of gelling agents and growth regulators on rice anther culture. *Korean J. Plant Tissue Culture* **22**, 35-39.
 7. Min, S. R., W. J. Jeong, M. K. Kim, N. H. Song and J. R. Liu. 1991. Effects of growth regulators and osmotica on somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa* L.). *Korean J. Plant Tissue Culture* **18**, 331-333.
 8. Sohn, J. K., K. M. Kim and J. S. Kim. 1995. Plant regeneration and somatic embryo formation from root-derived callus of rice. *Korean J. Plant Tissue Culture* **22**, 143-157.
 9. Sutter, E. G. 1996. General laboratory requirements, media and sterilization methods. pp 12-25, In Tri-giano R. N. and D. J. Gray (eds.), *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercise*, CRC Press, New York.
 10. Vasil, V. and I. K. Vasil. 1984. Induction and maintenance of embryogenic callus cultures of *Gramineae*, pp.36-42, In Vasil, I. K. (ed.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 1. Academic Press, Orlando, Florida.
 11. Yang, S. J. and B. G. Oh. 1998. Effects of gelling agent brands and concentration on rice anther culture. *Korean J. Plant Tissue Culture* **25**, 295-299.

(Received May 21, 2001; Accepted June 27, 2001)