韓資植誌 20(5) : 389~397(2007)
Korean J. Plant Res.

벼 조직배양 기간에 따른 retrotransposon(*Tos17*)의 활성에 관한 연구

양희은[1], 방일란[1,2], 신영범[1,4], 이병진[3], 홍순관[1,4]*
[1]강원대학교 BT특성화학부대학 생명공학부 식물생명공학전공
[2]이화여자대학교 약학대학 구조생물약학과
[3]강원대학교 농업생명과학대학 부속농장
[4]강원대학교 부설 생명공학연구소

The Studies of Activity of Retrotransposon (*Tos17*) according to Tissue Culture Periods in Rice (*Oryza sativa* L.)

Hee-Eun Yang[1], Yilan Fang[1,2], Young-Boum Shin[1,4], Boung-Jin Lee[3] and Soon-Kwan Hong[1,4]*
[1]Department of Plant Biotechnology, Division of Biotechnology, School of Bioscience & Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
[2]Structural Biopharmacy, College of Pharmacy, Ewha Woman's University, Seoul 120-750, Korea
[3]Experimental Station, College of Agricultural and Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
[4]Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract - Using the active-increment of *Tos17* copies in the genome of *Oryza sativa* L., there were many studies about induction and selection of new mutants. This study mainly focuses on the induction for retrotransposon (*Tos17*) activity in the callus of Ilpumbyeo (*Oryza sativa* L.) according to varied culture period and condition. The objectives of this study are obtaining various mutants (M_1) through plant regeneration, identification of the mutation relation with *Tos17*, and subsequent phenotyping of the mutants (M_2, M_3). A total of 371 M_1 mutants was obtained. The degree of *Tos17* activity obtained regeneration plants with each different culture period was evaluated by Southern blot analysis. The result showed that control Ilpumbyeo rice has 5 numbers of copies and the band numbers obtained 7, 8, 9.5, 12, 6, 13.5, 17.5 from culture period of 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 month, respectively. In this study, the result showed that most effectual culture period for activity of *Tos17* in Ilpumbyeo rice is 5 month. Hereafter, collections and analysis of various recombination plants will act on an important factor in multiplication and preservation of M_2 and M_3 generation. And an urgent and important subject is a development of screening method for selection of diverse mutants.

Key words - *Tos17*, Southern blot, Tissue culture, Rice, Mutant, Retrotransposon

서 언

최근 식물의 세포나 조직을 배양하는 기술이 발전함에 따라 이용분야가 많이 확대되고 있다. 이러한 배양 기술을 통하여 얻어진 재분화 개체들 중에는 세포학적이나 유전학적 또는 형태학적인 여러 가지 특성들이 원래의 기본 식물체와 동일한 개체뿐만 아니라 기본 식물체와는 다른 변이체들이 발생된다는 것이 당근(Blakely and Steward, 1964)에서 알려진 후 담배, 밀, 벼, 보리 등의 조직배양에서 변이 식물체의 발생이 보고되어 있다 (Larkin and Scowcroft, 1981; Mousseau *et al.*, 1970; Ruiz *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 1996).

Retrotransposon은 전이인자(transposable element)중 하나로 mRNA를 매개로 하여 복제하고 역전사(reverse transcription)에 의해 어떤 부위의 게놈(genome)에도 삽입되어 질 수 있어서 식물체의 여러 가지 특성을 변화시키는 움직이는 유전요소(mobile genetic element)라고 할 수 있다. Retrotansposon은 독특한 말단 역반복(TIR, terminal inverted repeat)을 가지며 전이 시 새롭게 전이되는 부위에 타겟부위중복(TSD, target site duplication)을 만든다. 여러 가지 식물에 존재하며, 식물의 유전자와 유전자 진화(gene

*교신저자(E-mail) : soonkwan@kangwon.ac.kr

evolution)에 있어서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 식물의 retrotransposon은 구조적이나 기능적으로 각각 다른 진핵생물체로부터 얻은 retrovirus와 비슷하다. 그러나 식물의 retrotransposon은 몇몇 다른 진핵생물들과 비교하였을 때 높은 수의 copy 수를 가지고 있고, 광범위한 이종집단(extensively heterogeneous populations)을 만들 수 있으며, 염색체적 분산 경향(chromosomal dispersion pattern) 등의 유전적 기관화(genetic organization)에서 중요한 차이점을 가지고 있다. 최근에는 구조는 물론 유전적 기관화, 표현형(phenotype), 조절인자(regulation element), 진화(evolution) 등에 관한 다양한 연구가 수행되어졌고, 앞으로 유전학적 도구로써의 이용과 식물 게놈의 진화에 관한 연구가 더 많이 시행되어 질 것으로 생각되어 진다(Kumar and Bennetzen, 1999).

Retrotransposon은 단순하게 전이하는 방식이 아니라 중복적으로 전이가 일어남에 따라 retrotransposon의 copy수가 증가하는 특성을 가지고 있어서 진화학적인 측면의 해석에도 많은 도움이 될 것으로 보인다. Retrotransposon의 일부는 조직배양으로 활성화된다는 것이 담배(Grandbastien *et al.*, 1989), 밀(Moore *et al.*, 1991), 벼(Hirochika, 1997), 보리(Manninen and Schulman, 1993) 등에서 보고되었다. 이로 인해 유전적 변화가 생길 수 있으며, 식물 종의 다양화에도 관여할 수 있어서 RFLP (restriction fragment length polymorphism) marker나 종의 연관분석, 유전자 표시(gene tagging)의 수단이나 유전자 기능(gene function) 연구에도 활용될 수 있어서 그 이용분야는 매우 넓다고 하겠다.

현재 벼에서 retrotransposon은 약 32종류가 있는 것으로 밝혀졌으며 그 중 활성이 가장 높은 것이 *Tos17*이라고 한다. *Tos17*은 retrotransposon의 일종으로 벼에 존재하는 Tos (transposon Oriza sativa)는 게놈 상의 주요한 구성요소이며 많은 변이를 일으키는 원인으로 알려져 있고 식물에 매우 보편적으로 존재한다고 보고되었다(Yamazaki *et al.*, 2001).

Retrotransposon은 양단에 수백~수천 base pair로 존재하는 enhancer와 promotor에 의해 RNA가 합성되고 이렇게 합성된 RNA를 주형으로 역전사 효소에 의해 DNA로 전환되어서 조직배양 과정에 특이한 스트레스를 가하였을 때 그 전이가 유발되는 것으로 알려져 있다. *Tos17*은 구조적으로 LTR retrotransposon 중에서 *Ty1*-copia group에 속하며 전체 길이는 4.1 Kb로 LTR의 길이는 138bp로서 벼 식물 전체 게놈(~420 Mbp)에서 많이 발견 되었으며, 게놈 전체에 넓게 퍼져 있는 것으로 원형질체 배양이나 조직배양에 의해서 활성화 되는 것으로 보고되고 있다(Kumar and Bennetzen, 1999).

본 연구에서는 일품벼에서 배양된 캘러스를 이용하여 배양기간 및 배양조건에 따른 retrotransposon(*Tos17*)의 활성화를 유도함을 일차적인 목적으로 하고, 이에 따른 재분화 개체를 통하여 다양한 돌연변이체(M_1)를 얻음과 동시에 세대의 진전에 따른 돌연변이체(M_2, M_3)가 나타내는 표현형과 *Tos17*과의 연관성을 확인하여 특정 유전자의 기능에 대한 기초적 자료로 활용할 수 있도록 한다. 또한 향후 cloning을 목적으로 하여 새로운 자원식물개발에 중요한 요소가 될 것이다.

재료 및 방법

일품벼 종자를 이용한 캘러스 유도, 배양 및 재분화

일품벼 종자의 과피를 제거한 후 70% 에탄올로 30초간 소독한 뒤에 2% sodium hypochlorite 용액으로 1시간동안 소독하고 멸균된 증류수로 3번 washing 하여 캘러스 유도용 종자로 사용하였다.

캘러스 유도 배지는 N6 powder 3.98g/ℓ 에 vitamin과 myo-inositol 100㎎/ℓ , casamino acid 0.3g/ℓ , proline 2.88g/ℓ , 2,4-D 2㎎/ℓ , sucrose 30g/ℓ 을 넣고, pH 5.8로 조절한 뒤 gelrite 3g/ℓ 을 넣고 autoclave(121℃, 20min.)를 실시한다. Petri dish(Ø90 × 15㎜)에 준비한 종자를 치상한 뒤 28℃의 암실에서 한 달간 배양시킨다(Table 1).

재분화는 MS powder(4.4g/ℓ)에 vitamin, myo-inositol 100㎎/ℓ , casamino acid 2g/ℓ , sorbitol 30g/ℓ , NAA 0.01 ㎎/㎖, BA(0.1㎎/㎖), sucrose 40g/ℓ , gelrite 3g/ℓ 을 넣고 pH 5.8로 조절하여 autoclave한 뒤 배지에 배양된 캘러스를 매달 치상하여 8개월 동안 재분화 시켰으며, 재분화 식물체는 온실에 이식하여 종자를 수확할 수 있을 때까지 재배를 지속하였다(Table 2).

DNA 추출

재분화된 식물체는 Tai와 Tanksley(1990)의 방법을 변형하여 DNA를 추출하였다. 재분화 된 식물체의 어린잎을 1g씩 채취하여 10개체씩 섞어서 전체 10g을 bulk로 하여 액체질소로 급냉시킨 후 막자사발에 넣고 곱게 갈아주었다. 50㎖ centrifuge tube에 곱게 갈은 시료를 넣고 곧바로 15㎖의 DNA extraction buffer(5M NaCl, 1M Tris-HCl(pH 8.0), 0.5M EDTA, 10% SDS, sodium bisulfate)를 tube에 넣고 섞었다.

Biophenol(Q-BIOgene)을 extraction buffer와 동량으로 넣어 섞어 준 후 65℃의 water bath에서 10분간 incubation 하였고, 13,500rpm에서 10분 동안 4℃ 상태로 원심 분리하여 상층액만 취하여 새 튜브에 옮겨 담았다.

Chloroform과 isoamylalcohol이 24:1로 혼합된 용액을 상층액 취한 양과 동일하게 넣어 섞어준 다음 13,500rpm에서 10분간 4℃ 상태로 원심분리 시켰다. 상층액을 다시 취하여 새 튜

Table 1. The list of medium contents for callus induction and regeneration

Medium content		Callus induction	Regeneration
Medium (g/ℓ)		N6*, 3.98	MS**, 4.4
Vitamin (㎎/ℓ)	- glycine	2	2
	- nicotinic acid	0.5	5
	- pyridoxine	0.5	10
	- thiamine	1	10
Myo-inositol (㎎/ℓ)		100	100
Casamino acid (g/ℓ)		0.3	2
Proline (g/ℓ)		2.88	-
2,4-D (㎎/ℓ)		1	-
Sucrose (g/ℓ)		30	40
NAA (㎎/㎖)		-	0.01
BA (㎎/㎖)		-	0.1
Gelrite (g/ℓ)		3	3
pH		5.8	5.8
Autoclave (121℃, 1kg/㎠<15lb/in²>)		20min.	20min.

*N6 (Chu C.C. *et al.*, 1975)

**MS (Murashige T. and Skoog F., 1962)

Table 2. The number of regenerated plants in this experiment

Culturing months	No. of petri dishes	No. of total regenerated plants	No. of full grown regenerated plants	No. of plant obtained seed
Callus	10	20	18	18
1	11	38	35	26
2	20	11	10	0
3	10	23	18	18
4	58	0	0	0
5	100	52	43	42
6	100	7	3	2
7	1000	163	156	146
8	300	57	51	41
Total	1609	371	316	293

브에 옮긴 다음 ice-cold isopropanol을 상층액과 동량으로 넣어준 후 천천히 inverting하여 DNA가 응집되는 것을 확인한 후 13,500rpm에서 10분간 원심 분리하여 DNA pellet을 확인하였다.

상층액을 제거하고 70% ice-cold ethanol을 3㎖ 넣고 13,500rpm에서 5분간 원심 분리하여 washing한 뒤에 실온에서 건조시킨 후 증류수를 넣어 DNA를 녹인 뒤, RNA를 제거하기 위하여 RNase A를 첨가하여 37℃ incubator에서 2시간동안 처리하였으며, 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 DNA 정량분석을 실시하였다.

Southern blot 분석

Genomic DNA의 농도는 1㎍/㎕로 조절하였고, 제한효소 *Xba* I (Sigma, 10unit/㎕)으로 full digestion 처리하였다. 0.9% agarose gel에 제한효소 처리한 DNA와 Marker, probe(*Tos17*)를 분주하고 35V로 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 후에는 EtBr(ethidium bromide)용액에서 15분간 염색하였고, membrane에 transfer를 실시하였다.

Nucleic acid transfer가 끝나면 5X SSC로 5분간 중화시킨 후 membrane을 잘 넣고 60℃의 hybridization buffer(5X SSC, dH_2O, Dextran sulfate〈Sigma〉 2g, liquid block 〈Amershame〉 2㎖, 0.1% SDS solution)를 bottle에 담은 후 shaking incubator에서 12시간동안 O/N하였다.

Probe(*Tos17*)는 pGEMT-easy vector로 클로닝한 뒤 Elution하여 400ng/㎕ 농도로 사용하였고 size는 1.5Kb이다.

60℃의 shaking incubator에서 1X SSC, 0.1% SDS를 넣고 15분간 incubation 하고, 다시 0.5X SSC, 0.1% SDS에서 15분간 washing하였다. 멸균한 buffer A(100mM tris-HCl,

300mM NaCl, pH 9.5) 135㎖와 liquid block 15㎖를 섞고 실온에서 membrane을 한 시간 동안 shaking incubation하였다. Probe DNA와 digestion DNA를 결합(conjugation)하기 위하여 buffer A 50㎖에 BSA(bovine serum albumin, Sigma) 0.25g을 넣고, anti-fluorescein AP 10㎕를 섞은 후 membrane을 40분간 shaking incubation 시켜주었다. Buffer A 100㎖에 0.3% Tween 20(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Sigma)을 넣고 10분 동안 washing을 3반복하였다. 4℃ 보관중인 detection reagent(CDP star-™ detection reagent, Amershame) 1㎖을 membrane에 5분간 pipet으로 도포하여 준 다음 X-ray cassette에 넣고 X-ray film을 감응 시킨 다음 2시간 경과 후에 developer와 fixer를 이용하여 검출하였다.

결과 및 고찰

캘러스 배양에 따른 재분화

일품벼 종자를 소독 한 뒤에 N6 배지에 2,4-D를 첨가한 고체배지에 치상 한 뒤 28℃에서 암배양 하였을 때 약 3주 정도가 경과하면 캘러스가 형성되는 것을 관찰할 수 있었다.

재분화 조건을 찾기 위해 MS와 N6 배지를 사용하여, 각각의 배지에 vitamin과 myo-inositol 100㎎/ℓ 과 casamino acid 2g/ℓ , sorbitol 30g/ℓ , pH 5.8, gelrite 3g/ℓ 을 넣고 autoclave 20분은 동일한 조건으로 하였으며, sucrose 양을 30g/ℓ 와 40g/ℓ 으로 달리하고 NAA와 kinetin, BA농도를 각각 다양하게 처리하여 재분화에 적합한 조건을 찾고자 하였다. 재분화는 캘러스가 증식할 때(N6 배지)와는 다른 MS 배지에서 재분화가 잘 되었으며, sucrose도 30g/ℓ 보다 40g/ℓ 의 경우가, NAA는 0.01㎎/㎖일 때, kinetin보다는 BA를 0.1㎎/㎖ 첨가하였을 때 재분화 효율이 가장 높은 것으로 나타났다(Table 1).

현탁배양기간에 따른 재분화 및 retrotransposon 활성

배양 6주 후부터 재분화체가 온전한 식물체로 분화가 시작되었으며, 50일 후 3~4매의 본엽이 발생한 다음 2~3일간 순화 후 포장으로 이식하였고, 90일 정도 되었을 때 각각의 식물체에 대한 간단한 특성 조사를 실시하였고 수확기에 종자를 수확하였다(Fig. 2).

캘러스를 유도하여 현탁배양을 거치지 않고 바로 재분화 실험을 실시하여서 총 20개체의 재분화 식물체를 얻었다. 이것은 현탁배양을 하지 않았으므로, retrotransposon이 활성화 되지 않은 상태이며 그 특성은 control인 일품벼와 같았고, Southern blot 분석 결과에서도 이 재분화 식물체에서는 특이한 점을 발견할 수 없었다. 1개월 이상 현탁배양하여 얻어진 재분화

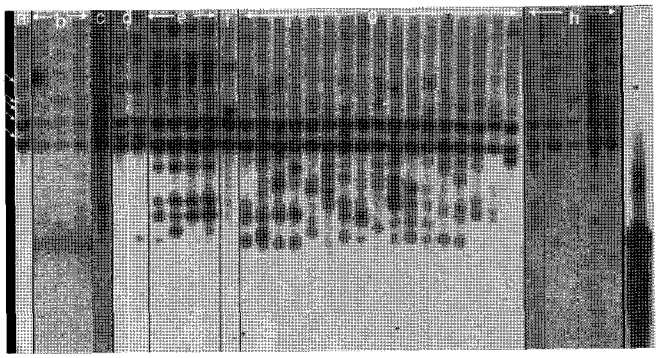

Fig. 1. Polymorphic RFLP bands in 316 regeneration plants, using *Tos17* as a probe in southern blot.
a: 5 bands of *Tos17* in Ilpumbyeo (normal), b: 7 bands of *Tos17* on an average in 1 month plants, c: 8 bands of *Tos17* on an average in 2 month plants, d: 9.5 bands of *Tos17* on an average in 3 month plants, e: 12 bands of *Tos17* on an average in 5 month plants, f: 6 bands of *Tos17* on an average in 6 month plants, g: 13.5 bands of *Tos17* on an average in 7 month plants, h: 17.5 bands of *Tos17* on an average in 8 month plants, i: *Tos17* marker as a probe.

식물체에서는 retrotransposon의 활성화가 나타남을 확인 할 수 있었다. 1개월간 현탁배양한 캘러스에서는 총 38개체가 재분화 되었는데 3개체가 배양 기간 동안 죽었다. 2개월간 현탁배양한 캘러스에서는 총 11개체가 재분화 되었으며, 3개월간 현탁배양한 캘러스에서는 총 23개체가 재분화 되었다. 4개월간 현탁배양한 캘러스에서는 여러 번 재반복 실험을 했음에도 불구하고 재분화 기간 동안 잦은 오염의 발생으로 인하여 재분화 식물체를 얻지 못하였다. 이 단계는 현재 계속적으로 재분화를 시도하고 있다. 5개월간 현탁배양한 캘러스에서는 총 52개체를 얻었으며, 이것들 중 5개의 개체는 표현형이 albino인 개체였다. 6개월간 현탁배양한 캘러스에서는 오염의 발생으로 인하여 재분화 개체를 충분히 얻지 못하여서 7개체를 대상으로 실험하였다. 7개월에는 재분화체 163개체를 얻었다. 7개월간 현탁배양한 캘러스에서는 재분화 식물체를 다른 stage에 비하여 충분히 확보하여 변이의 폭이 다양하게 나타났다. 8개월간 현탁배양한 캘러스에서는 총 57개체의 재분화 식물체를 얻었다. 본 실험에서는 총 371개체의 재분화 식물체를 얻었고, albino를 포함하여 순화 기간 동안에 죽은 개체가 55개체 발생하였으므로 이를 제외한 총 316 개체를 대상으로 retrotransposon에 관한 활성을 조사하기 위한 Southern blot 분석을 하였다.

Southern blot 분석은 각 개월마다 재분화 개체수를 10개체씩 bulk로 하여 분석을 실시하여 대략적인 활성 정도를 파악하였다. 일품벼 식물체로부터 DNA를 추출하여 *Tos17*을 probe로 사용하였을 때 일품벼에서 *Tos17*의 copy 수가 5개로 나타났다.

Fig. 1에 probe인 *Tos17*(1.5Kb)을 loading하여 band를 확인하였다. 일품벼는 5개의 *Tos17* band를 가지고 있었고, 평균

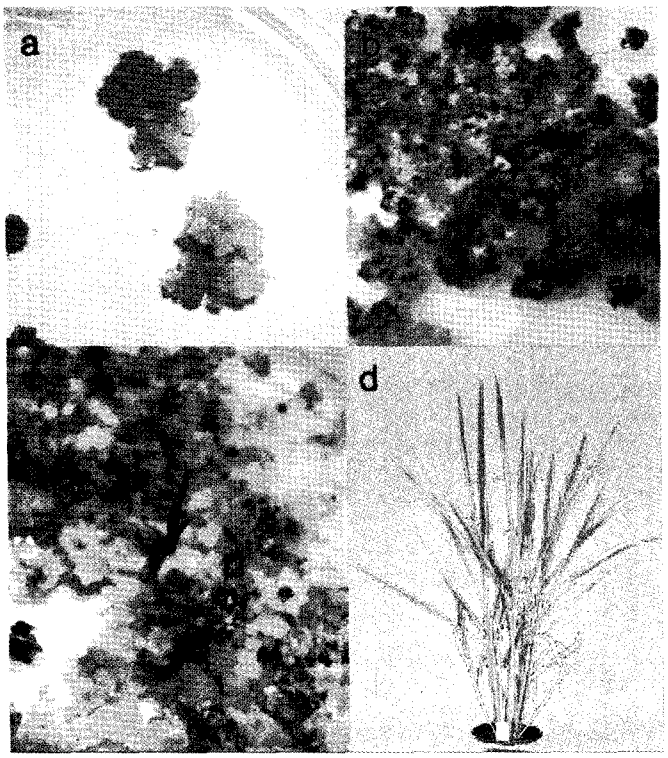

Fig. 2. Calli formation and plant regeneration by callus culture.
a: Callus shape, b: green spots appeared after 20 days in regeneration medium, c: shoot formation after 40 days in regeneration medium, d: regenerated plant after 90 days.

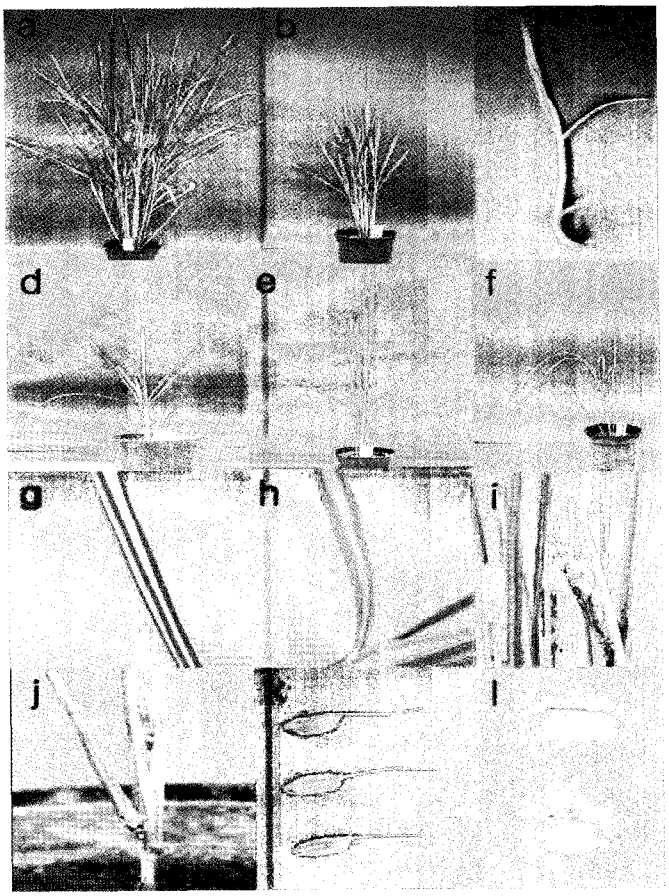

Fig. 3. The shape of normal and various mutant plants by regeneration.
a: normal, b: dwarf, c: albino, d: non-tiller, e: narrow leaf, f: brassinosteroid-like mutant, g: stripe, h: virescent, i: flowering mutant, j: extra stem and node, k: seed coats, l: strange seed and normal seed.

적으로 각각 1개월에서는 7개, 2개월은 8개, 3개월은 9.5개, 5개월은 12개, 6개월은 6개, 7개월은 13.5개, 8개월은 17.5개의 band를 확인할 수 있었다. 이것으로 보아 조직배양기간이 증가함에 따라서 retrotransposon인 *Tos17*의 활성을 확인 할 수 있었다.

Southern blot 분석을 실시한 재분화 식물체에 대해서 표현형의 변이를 조사하였다. 유묘기의 식물체에서부터 결실기의 식물체가 될 때까지 줄기에 가늘고 선명한 흰색의 줄무늬가 생겨 있는 stripe개체는 1개월의 No. 27과 7개월의 No. 1개체에서 나타났으며, 분얼이 생기지 않는 non-tillering 개체는 3개월의 No. 21, 23과 5개월의 No. 15, 7개월의 No. 33, 55, 60, 89, 118, 128, 132, 138, 144와 8개월의 No. 27, 29, 32, 36, 40개체에서 다양하게 나타났다.

줄기의 회전방향에 이상을 보이는 twisted stem개체가 2개월의 No. 4에서 나타났고, 7개월에서 줄기가 왼쪽으로 이상을 보이는 left twisted stem개체가 No. 2, 3, 25, 52, 75, 77, 86, 90개체에서 나타났고, 오른쪽으로 이상을 보이는 개체인 right twisted stem이 No. 11, 38, 39, 41, 42, 58, 63, 93, 105개체에서 나타났다. Dwarf개체는 3개월의 No. 1과 7개월의 No. 13, 14, 23, 27, 33, 46, 57, 73, 86, 89, 102, 118, 128개체에서 나타났다.

기본 식물체에 비하여 줄기가 가늘고 얇게 뻗으면서 생장속도는 빠르나 축 늘어지는 듯한 brassinosteroid-like mutant 개체가 5개월의 No. 15, 24와 7개월의 No. 18, 24, 81, 85, 110 개체에서 나타났으며, 암술이나 수술의 이상으로 인해 영화에 이삭이 맺히지 않거나, 영화 자체가 이상이 생긴 경우에 해당되는 flowering mutant개체도 5개월의 No. 15, 6개월의 No. 2, 7개월 No. 98, 128, 156와 8개월의 No. 42에서 나타났다.

Albino 개체도 5개월, 7개월 배양 후 각각 5개체와 4개체가 생겼으며, 분얼절이 신장절화(extra stem and node)된 특성을 보이는 개체도 7개월의 No. 60개체에서 발견되었다. 또한 잎이 normal에 비해서 폭이 좁은 narrow leaf 개체가 7개월의 No. 33, 60, 69, 89, 94, 109, 118, 128, 132, 138, 144, 156과 8개월의 No. 11, 25, 29, 32, 40, 42개체에서 나타났고, stripe개체와 조금 다르게 잎이 녹변하여 무늬가 생기는 형태인 virescent 개체도 7개월의 No. 1개체에서 확인되었다. 또한 재배품종인 일품

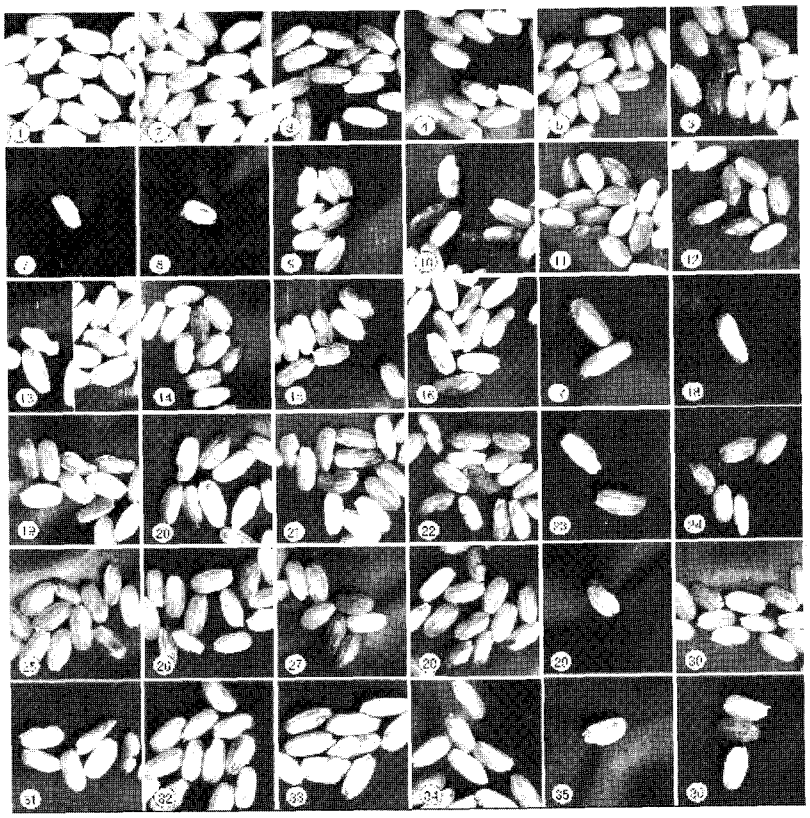

Fig. 4. The seed shapes from the regenerated plant.
1: Ilpumbyeo (normal), 2: No. 22 from 1 month culture, 3: No. 1 from 3 month culture (dwarf), 4: No. 8 from 3 month culture, 5: No. 34 from 5 month culture, 6: No. 39 from 5 month culture, 7: No. 2 from 6 month culture (flower mutant), 8: No. 1 from 7 month culture (stripe), 9: No. 5 from 7 month culture, 10: No. 10 from 7 month culture, 11: No. 15 from 7 month culture, 12: No. 22 from 7 month culture, 13: No. 31 from 7 month culture, 14: No. 42 from 7 month culture, 15: No. 46 from 7 month culture (dwarf), 16:No. 51 from 7 month culture, 17: No. 60 from 7 month culture (non-tiller, narrow leaf, extra stem and node), 18: No. 72 from 7 month culture, 19: No. 79 from 7 month culture, 20: No. 80 from 7 month culture, 21: No. 88 from month culture, 22: No. 92 from 7 month culture, 23: No. 97 from 7 month culture, 24: No. 102 from 7 month culture (dwarf), 25: No. 112 from 7 month culture, 26: No. 127 from 7 month culture, 27: No. 130 from 7 month culture, 28: No. 147 from 7 month culture, 29: No. 148 from 7 month culture, 30: No. 8 from 8 month culture, 31: No. 10 from 8 month culture, 32: No. 17 from 8 month culture, 33: No. 18 from 8 month culture, 34: No. 29 from 8 month culture, 35: No. 32 from 8 month culture, 36: No. 37 from 8 month culture.

벼에는 까락이 없으나, 재분화 식물체에는 까락이 발생한 개체들이 다수 나타난 것을 확인하였다(Fig. 3).

캘러스 배양을 실시한 개월별로 재분화 식물체의 특성은 Table 3과 같다. 일반적으로 일품벼 종자의 모양은 투명하고 맑은 색으로 보이며, 낱알이 타원형으로 생겼는데, 1개월간 배양한 식물체에서 얻어진 종자 모양에 있어서는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 배양 기간이 3개월을 경과하면서 얻어진 재분화 식물체의 종자 색깔은 맑지 않고 우유빛으로 변하는 것들이 많았고 종자 모양도 정상체와는 다른 형태가 생기고 색상이 탁한 것을 확인 할 수 있었다. Fig. 4에서 No. 7, 8, 18, 29, 35의 경우는 전체적으로 하나 밖에 종자를 수확하지 못 하였고, No. 6, 10, 22, 27, 36의 종자의 색은 확실히 이상이 있는 것으로 나타났다. No. 17의 종자의 경우 7개월에서 재분화된 식물체로써 No. 60으로 재분화 식물체의 모양에 있어서도 non-tillering과 narrow leaf 뿐만 아니라 분얼절이 신장절화 된(extra stem and node) 특성을 가지고 있었으며(Fig. 3-j), 종자가 일품벼 종자에 비해서 거대화 되는 것이 조사되었다. 이러한 여러 가지 종자 모양으로 보아도 조직 배양기간이 길어질수록 retrotransposon의 활성으로 인하여 종자 모양에도 다양한 변이가 발생한다는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 4).

벼의 캘러스를 대상으로 한 *Tos17*의 활성증가를 이용한 새로운 돌연변이체의 유발 및 선발에 대한 연구는 많이 시도되어 왔다. Hirochika 등(1996)에서 벼의 조직배양 후 재분화된 개체를 대상으로 retrotransposon의 활성을 조사한 바 *Tos17*이 가장 활성이 좋다고 보고하고 있다. 본 연구에서는 일품벼 캘러스의 *Tos17*의 활성에 필요한 유효한 배양기간 및 배양조건을

Table 3. Genetic variations of regenerated plants from callus culture

Culturing months	Phenotype variations of regenerated plants	No. of regenerated plants
1	stripe	27
2	twisted stem	4
3	dwarf	1
	non-tillering	21, 23
4	-	-
5	albino (5ea.)	-
	brassinosteroid-like mutant	15, 24
	flowering mutant	15
	non-tillering	15
6	flowering mutant	2
7	albino (4ea.)	-
	brassinosteroid-like mutant	18, 24, 81, 85, 110
	dwarf	13, 14, 23, 27, 33, 46, 57, 73, 86, 89, 102, 118, 128
	extra stem and node	60
	flowering mutant	98, 128, 156
	narrow leaf	33, 60, 69, 89, 94, 109, 118, 128, 132, 138, 144, 156
	non-tillering	33, 55, 60, 89, 118, 128, 132, 138, 144
	stripe	1, 1-1, 1-2
	twisted stem - left	L- 2, 3, 25, 52, 75, 77, 86, 90
	twisted stem - right	R- 11, 38, 39, 41, 42, 58, 63, 93, 105
	virescent	1-4, 1-5
8	flowering mutant	42
	narrow leaf	11, 25, 29, 32, 40, 42
	non-tillering	27, 29, 32, 36, 40

구명하고, 다수의 돌연변이체(M_1)를 얻고자 하였다. 본 실험에서 얻어진 재분화 식물체는 1개월에서 38개체, 2개월에서 11개체, 3개월에서 23개체, 5개월에서 52개체, 6개월에서 7개체, 7개월에서 163개체, 8개월에서 57개체로 총 371개체를 얻었다. 그 중 순화 기간 동안 albino를 포함한 56개체가 도태됨에 따라 316개체의 M_1 돌연변이체를 조사할 수 있었다. 이들 중 종자를 수확할 수 있었던 개체 수는 293개체였으며, 종자를 얻지 못한 개체들 중에는 flowering mutants였거나, 온실의 환경 불량에 따른 결과로 종자를 수확할 수 없었다.

Retrotransposon은 LTR(long terminal repeat)과 내부 damain으로 gag(group specific antigen)와 pol(polyprotein)을 가지고 있으며, 조직배양에 의해서 활성화 된다는 것이 담배(Hirochika, 1993)에 의해 최초로 알려졌다. 벼에서는 담배에서 분리된 retrotransposon인 *Tto1*의 존재가 확인된 이래, 32종류의 retrotransposon family가 확인되었으며 그 중 5개는 조직배양 과정을 거치면 활성화 된다는 것이 밝혀졌다. 화영벼 등 약배양한 후대로부터 한 달간의 조직배양으로부터 유래한 재분화 식물체에서 retrotransposon의 존재와 활성을 확인하기 위해 수행한 Southern blot의 결과 *Tos17*의 활성이 *Tos10*이나 *Tos19* 보다 높음을 볼 수 있었다(Yi *et al.*, 1999). 따라서 본 실험에서는 *Tos17*을 probe로 사용하였으며, 배양 기간이 길어질수록 retrotransposon의 활성이 어떠한 변화를 보이는지 확인하고자 하였다. 실험 재료로 사용한 일품벼에서 캘러스를 증식하여 얻은 재분화 식물체의 DNA를 뽑고, *Xba* I 으로 DNA를 제한효소 처리하여 Southern blot을 실시한 결과 *Tos17*이 기본적으로 5개의 band를 가지고 있다는 것을 확인할 수 있었으며, 화성벼는 4개의 band를 가지고 있었다.

본 연구에서는 제한효소 처리를 *Xba* I 하나만 수행하였고, 일품벼 하나의 품종에 대해서만 조직배양을 한 것으로 품종 간 비교는 할 수 없었다, 그러나 Yi 등(1999)의 논문에서는 국내 육성 품종과 해외 도입 품종들에 대해서 한 달간 배양하였고, 제한효소인 *Xba* I 과 *Eco* RI을 각각 처리하였을 때 *Xba* I 을 처리하였을 때(46%)가 *Eco* RI을 처리했을 때(23%)보다 copy수의 다양성이 큰 것을 보고하였다. 이러한 양상으로 볼 때 retrotransposon의 경우 품종간, 생태형간 여러 특성들을 구별하는 것이 가능하여 DNA marker로도 활용할 수 있는 가능성을 보여주고 있다.

본 실험을 수행하는데 있어서 조직배양에 소요된 총 기간과 식물체의 재분화, 그리고 Southern blot 분석에 많은 시간이 소요된 관계로 DNA를 bulk로 뽑았을 뿐만 아니라 *Tos17*로 표

시된 부분을 cloning 하지는 못했지만, 재분화 식물체에 대한 Southern blot에서 상당수의 *Tos17*의 transposition이 관찰되었다. 따라서 본 실험에서 얻어진 다양한 변이 식물체의 생성원인 중에 retrotransposon이 관여되었을 가능성이 높은 것으로 판단되어 진다. 1개월부터 8개월까지 조직배양의 개월 수가 증가함에 따라 확실히 *Tos17*이 활성화 되는 것을 관찰할 수 있었으나, 각 개체별로 DNA를 뽑아 분석한 것이 아니라 10개체씩 bulk로 뽑아 분석한 것이기 때문에 재분화 된 각각의 개체별 식물체들의 특징에 대한 *Tos17*의 활성은 확인 할 수 없었으므로 차후에 다양한 변이에 대한 연구를 수행해야 할 것이다.

Hirochika 등(1996)의 보고에서는 retrotransposon의 활성화는 캘러스의 계대배양 기간이 3~6개월 이상으로 길어질수록 활성이 높아져서 더 많은 변이가 창출될 수 있을 것으로 판단된다고 하였다. 본 실험의 결과로도 Hirochika 등(1996)의 결과를 뒷받침하는 것으로 생각된다.

본 연구의 결과에서 1개월의 배양기간에도 *Tos17*이 활성화되는 것을 알 수 있었으며, 배양이 진행될수록 보다 많은 copy의 *Tos17*이 활성화됨을 확인 할 수 있었다. 이와 같은 결과로 보아 짧은 시간에 retrotransposon의 활성화나 transposition이 일어날 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 일품벼 *Tos17*의 활성화에 가장 효과적인 배양기간은 최소한 5개월간의 배양기간을 거치는 것으로 나타났다. 향후 재분화로부터 얻은 stripe, non-tillering, twisted stem, dwarf, virescent, flowering mutant, extra stem and node, narrow leaf, brassinosteroid-like mutant 개체에 대한 연구 이외에도 종자를 얻지 못한 개체를 비롯하여, 종자 이상이나 줄기, 이삭 등에도 이상이 생긴 개체들에 대한 연구가 가능할 것이며, 현재 가시적인 결과가 나타나지 않는다고 하여도 세대진전으로 인해 후대에 이상 형질이 분리 될 수도 있을 것으로 보이는 개체들에 대해서 더 많은 연구가 수행되어져야 할 것이다.

적 요

벼의 캘러스를 대상으로 *Tos17*의 활성 증가를 이용하여 새로운 돌연변이체의 유발 및 선발에 대한 연구는 많이 시도되어 왔다. 일품벼에서 배양된 캘러스를 이용하여 배양기간 및 배양조건에 따른 retrotransposon(*Tos17*)의 활성화를 유도함을 일차적인 목적으로 하고, 이에 따른 재분화 개체를 통하여 다양한 돌연변이체(M_1)를 얻음과 동시에 세대의 진전에 따른 돌연변이체(M_2, M_3)가 나타내는 표현형과 *Tos17*과의 연관성을 확인하여 특정 유전자의 cloning을 향후 목적으로 하고 있다.

1. 본 연구에서는 배양기간에 따라 총 371개체의 M_1 돌연변이체를 얻었다.

2. 각각의 배양기간 단계별 재분화 식물체에서 얻어진 *Tos17*의 활성정도를 나타내는 Southern blot의 결과 normal 즉, 기본 식물인 일품벼는 5개의 copy수를 가지고 있는 것을 알 수 있었으며, 1개월 7개, 2개월 8개, 3개월 9.5개, 5개월 12개, 6개월 6개, 7개월 13.5개, 8개월 17.5개의 band를 확인할 수 있었다.

3. *Tos17*의 Southern blot의 결과, 3~5개월의 배양기간이 경과해야만 기본 copy의 2배수로 *Tos17*이 활성화됨을 알 수 있었다. 향후 M_1 돌연변이체의 세대진전을 통하여 M_2, M_3 세대 등의 다양한 재조합 개체의 확보 및 분석이 중요하다. 또한 다양한 형태로 원하는 돌연변이를 선발하는 screening 방법을 개발하는 것이 시급하고 중요한 과제이다.

인용문헌

Blakely L.M. and F.C. Steward. 1964. Growth and organized development of cultured cells 7 cellular variation. Amer. J. Bot. 51(8): 809-820

Fuerstenberg S.I. and M.A. Johns. 1990. Distribution of Bs1 retrotransposons in Zea and related gene. Thero. Appl. Genet. 80: 680-686

Fukuchi A., F. Kikuchi and H. Hirochika. 1993. DNA fingerprintion of cultivated rice retrotransposon probes. Jpn, J. Genet. 68: 195-204

Gabriel A., M. Willems, E.H. Mules and J.D. Boeke. 1996. Replication infidelity during a single cycle of *Ty1* retrotransposition. PNAS USA 93: 7767-7771

Grandbastien M.A., A. Spielman and M. Caboche. 1989. Tnt1, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics. Nature 26: 376-380

Hirochika H. 1993. Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture. EMBO J. 12: 2521-2528

_____. 1997. Retrotransposons of rice : their regulation and use for genome analysis. Plant Mol. Biol. 35: 231-240

_____, A. Fukuchi and F. Kikuchi. 1992. Retrotransposon families in rice. Mol. Gen. Gemet. 233: 209-216

_____, H. Otsuki, M. Yoshikawa, Y. Otsuki, K. Sugimoto and S. Takeda. 1996. Autonomous transposition of the tobacco retrotransposon *Tto1* in rice. Plant Cell 8: 725-734

_____, K. Sugimoto, Y. Otsuki, H. Tsugawa and M. Kanda. 1996. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. PNAS USA 93: 7783-7788

Kumar A. and J.L. Bennetzen. 1999. Plant Retrotransposons. Annu. Rev. 33: 479-532

Larkin P.J. and W.R. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation a novel

source of variability from cell cultures for plant improvement, Theor. Appl. Genet. 60: 197-214

Marillonnet S. and S.R. Wessler. 1998. Extreme Structural Heterogeneity Among the Members of a Maize Retrotransposon Family. Genetics 150: 1245-1256

Manninen, I. and A.H. Schulman. 1993. *BARE-1*, a *copoa*-like retroelement in barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Mol. Biol. 22: 829-846

Miyao A., K. Tanaka, K. Murata, H. Sawaki, S. Takeda, K. Abe, Y. Shinozuka, K. Onosato and H. Hirochika. 2003. Target site specificity of the *Tos17* retrotranposon shows a preference for insertion within genes and against insertion in retrotranposon-rich regions of the genome. Plant Cell 15: 1771-1780

Moore G., H. Lucas, N. Batty and R. Flavell. 1991. A family of retrotransposons and associated genomic variation in wheat. Genomics 10: 461-468

Murashige T. and F. Skoog. 1962. A Revised medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant 15: 473-497

Ruiz M.L., J. Rueda, M.I. Pelaez, F.J. Espono, M. Candela, A.M. Sendino and A.M. Vazquez. 1992. Somatic embryogenesis, plant regeneration and somaclonal variation in barley. Plant Cell, tissue and Organ Culture 28: 97-101

Tai T.H. and S.D. Tanksley. 1990. A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from detydrated plant tissue. Plant Mol. Biol. Report 8(4): 297-303

Vicient C.M., A. Suoniemi, K.A. Jónsson, J. Tanskanen, A. Beharav, E. Nevo and A.H. Schulman. 1999. Retrotransposon BARE-1 and Its Role in Genome Evolution in the Genus Hordeum. Plant Cell 11: 1769-1784

Wang S., N. Liu, K. Peng and Q. Zhang. 1999. The distribution and copy number of copia-like retrotransposons in rice (Oryza sativa L.) and their implications in the organization and evolution of the rice genome. PNAS USA 96: 6824-6828.

Xie Q.J., M.C. Rush and S.D. Linscombe. 1996. Inheritance of homozygous somaclonal variation in rice. Crop Sci. 36: 1491-1495

Yamazaki M., K. Tsugawa, A. Miyao and M. Yano. 2001. The rice retrotransposon *Tos17* prefers low-copy-number sequences as integration targets. Mol. Genet. Genomics 265: 336-344

Yi G.H., M.H. Nam, B.G. Oh, H.C. Choi, S.C. Kim, C.D. Han and J.K. Sohn. 1999. Activation of retrotransposon in plant variants derived from rice cell culture. Korean J. Breed. 31: 341-347

(접수일 2007. 4. 3 ; 수락일 2007. 7. 20)