

벼의 수화겔 인공종자 생산

정원중 · 민성란 · 송남희¹ · 유장렬*

한국과학기술연구원 유전공학연구소 생물자원연구그룹, ¹대구교육대학교 과학교육과

Production of Artificial Seeds by Alginate-encapsulation of 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, 305-606; and ¹Department of Science Education, Taegu National University of Education, Taegu, 705-715. *Corresponding author.

Somatic embryos derived from cell suspension cultures of rice were singly alginate-encapsulated to be used as artificial seeds. When placed on half strength MS solid medium, 73% of the encapsulated somatic embryos were capable of germination. Encapsulation per se did not affect the germination frequency of embryos. When incubated by wrapping with moistured non-sterile filter paper, 60% of the encapsulated somatic embryos germinated. However, encapsulated zygotic embryos without endosperm showed a high germination frequency regardless of the sterility of the incubation conditions. The results suggest that a greater susceptibility of somatic embryos to contaminants is attributed to lower germination frequency of encapsulated somatic embryos in non-sterile conditions.

Key words : cell suspension culture, *Oryza sativa* L

인공종자에 대한 Murashige (1978)의 제안 이후 fluid drilling 방법(Cantliffe et al., 1987), 웨이퍼형 방법(Kitto and Janick, 1985; 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 인공종자 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, 1992), 특히 건조형의 것은 이제까지 발표된 여러 인공종자와 비교하여 볼 때 형태나 기능면에서 가장 진정종자에 접근하는 것이었다.

그러나 지금까지 보고된 인공종자는 대부분 쌍자엽 식물의 체세포배를 대상으로 한 것이며 단자엽 식물 특히 곡류에서는 체세포배의 대량생산에 대한 연구가 부족하여 인공종자개발이 심도있게 이루어지지 못하고 있다. 최근에 이르러 곡류에서는 처음으로 보리의 소포자로부터 체세포배를 유도하여 알진산 캡슐화하였을 때 80%의 발아율이 보고되었으며(Datta and Potrykus, 1989), 벼(*Oryza sativa* L.)에서는 묘조원기를 알진산 캡슐에 넣어 인공종자화하였으나 발

아율 및 대량생산에 대하여는 언급되지 않았다(Yoshida, 1989). 그러나 소포자법으로는 인공종자의 대량생산체계를 확립하기 어려우며 묘조원기법으로는 진정종자와 같은 저장이 가능한 건조형으로 개발하는데 한계를 가지고 있다. 따라서 인공종자의 연구는 높은 재분화율을 가지고 체세포배를 대량생산할 수 있는 배양계를 이용하여야 한다. 우리는 이미 태백벼의 현탁배양세포로부터 체세포배를 대량생산하는 시스템을 확립한 바 있다(Jeong et al., 1991; Min et al., 1991; Kim et al., 1992). 본 연구에서는 이 시스템으로 생산된 체세포배를 알진산(sodium alginate)으로 캡슐화하여 인공종자를 제조한 후 발아율을 조사하였다.

재료 및 방법

현탁배양세포로부터의 체세포배발생

배발생 캘러스는 충청남도 농촌진흥원에서 수분 후 14일 썬된 태백벼(*O. sativa* L.)의 미성숙종자로부터 유도된 현탁

배양세포주(Jeong et al., 1991)를 사용하였다. 현탁배양세포를 1 mg/L NAA, 5 mg/L kinetin, 5 mg/L ABA, 6 mM proline, 100 mg/L casein hydrolysate 및 0.6% Gelrite을 첨가하고 100 mM nitrogen이 함유된 N6 (Chu et al., 1975) 배지에 치상하여 25°C, cool-white 형광등(약 1,000 lux, 16시간 광주기)에서 인공종자를 위한 체세포배를 유도하였다. 배양 30일 후 배반이 뚜렷이 보이고 자엽초 및 유근이 충분히 성숙된 체세포배를 선별하여 인공종자의 제조에 사용하였다.

인공종자 제조 및 발아율 조사

인공종자 제조는 Jeon 등(1986)의 방법에 준하였으며 1/2 N6 기본배양액에 알긴산(sodium alginate: low viscosity: Sigma)을 2.5%로 용해하였다. 멸균한 알긴산 용액에 체세포배를 1개씩 넣어 50 mM CaCl₂용액에 15-20 cm 높이에서 떨어뜨려 5-10분간 교반하고 1/2 N6배지에서 잔존의 CaCl₂를 제거하여 수화형 인공종자를 제조하였다. 멸균된 흡수지로 수화형 인공종자에 잔존한 여분의 물기를 제거한 후 1/2 MS (Murashige and Skoog, 1962) 기본배지 및 멸균하지 않은 증류수로 적신 여과지상에 치상하여 상기한 명조건에서 일주일간 배양한 후 발아율을 조사하였다. 대조구로서 알긴산 캡슐화하지 않은 체세포배와 농촌진흥청 작물시험장에서 분양받은 태백벼의 성숙된 진정종자, 진정종자로부터 적출한 성숙배를 캡슐화한 재료 등을 사용하여 동일한 배양 조건에서 발아율을 비교하였다. 각 처리구는 페트리디쉬에 10립씩 넣어 10 반복으로 치상하였다. 배양 7일 후 체세포배 및 진정종자가 수화겔을 뚫고 나와 shoot과 뿌리가 모두 1 cm 이상 자란 것을 발아한 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

태백벼의 현탁배양세포주를 체세포배생산배지에서 30일 배양한 후 배반과 자엽초 및 유근의 발달이 뚜렷한 성숙한 체세포배를 선별하여 1개씩 알긴산 캡슐화하였다(Fig. 1). 인공종자는 직경이 약 5 mm, 무게가 약 140 mg을 나타냈으며(Fig. 1C), 진정종자가 종피를 벗고 발아하는 것과 유사하게 인공종자의 체세포배는 shoot과 뿌리가 알긴산 캡슐을 깨고 발아하였다(Fig. 1D). 1/2 MS배지상에서 알긴산 캡슐화한 수화형 인공종자는 73%의 발아율을 나타내었으며(Table 1) 캡슐화하지 않은 체세포배와 차이가 없어서, 알긴산 캡슐이 체세포배의 발아에 영향을 주지 않음을 알 수 있다. 그러나 수분이 공급된 여과지에서 발아는 시작되지만 양분공급의 부족 및 무균조건이 아니므로 알긴산 캡슐의 표면이 주로 곰팡이에 의해 오염되어 생존치 못한 것이 많아 발아율이 60%로 배지상에서보다 저조하였다. 그러나 진정종자에서는 여과지에서 이러한 미생물 오염정도에 영

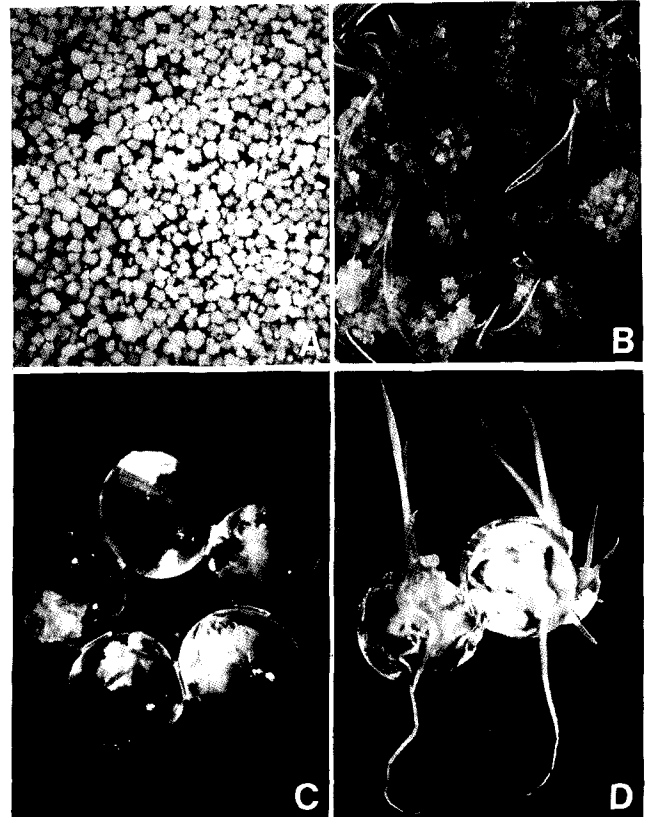


Figure 1. Artificial seeds produced by alginate-encapsulation of rice somatic embryos. A: Suspension cultures: B: Somatic embryo formation: C: Encapsulated somatic embryos: D: Germination of encapsulated somatic embryos.

Table 1. Germination frequency of encapsulated and “naked” somatic and zygotic embryos under different conditions^a

Embryo	Condition of germination	% Germination frequency ^d
Encapsulated somatic embryo	Filter paper ^b	62/103 (60)
	1/2 MS ^c	88/120 (73)
Naked somatic embryo	1/2 MS	74/100 (74)
Encapsulated zygotic embryo	Filter paper	150/160 (94)
	1/2 MS	81/90 (90)
Naked zygotic embryo	1/2 MS	96/100 (96)

^aData were collected after 7 days of incubation.

^bWrapped with moistured non-sterile filter paper.

^cPlaced on half strength MS solid medium in petridish.

^d100 × germinated embryos/total embryos

향을 크게 받지 않고 높은 발아율을 나타내었다(Table 1). 따라서 여과지에서 체세포배의 발아율이 낮은 것은 인공종자가 진정종자와는 달리 오염에 매우 민감하기 때문인 것으로 사료된다. 인공종자를 수분공급만으로 발아율을 높이기 위해서는 발아초기에 오염에 의한 해를 줄이는 방법이 강구되어야 할 것이다. 한 방안으로서 당근에서의 건조형 인공종자(Liu et al., 1992)처럼 벼에서도 인공종자를 건조시키면 발아시에 오염에 의한 영향을 줄일 수 있을 것이다.

한편 기존에 보고된 보리의 소포자 유래 인공종자는 최고 80%의 발아율을 나타냈으며(Datta and Potrykus, 1989), 벼의 묘조원기를 이용한 인공종자는 발아율 및 대량생산에 대해서는 언급되지 않았다(Yoshida, 1988). 본 연구에서는 현탁배양제로 유지되며 안정적으로 높은 재분화율을 나타내는 벼의 배발생세포주로부터 유도된 체세포배를 인공종자화하였을 때 73%의 발아율을 나타내었다. 이것은 대량생산이 용이하지 않은 보리의 소포자유래 체세포배의 인공종자나 진정종자처럼 건조시킴으로써 저장성을 갖도록 하기 어려운 벼의 묘조원기를 이용한 인공종자의 한계를 극복할 수 있음을 시사한 것이다. 현재 진행되고 있는 벼의 수화형 인공종자를 건조형으로 전환하는 연구결과는 추후에 발표할 예정이다.

적 요

태백벼의 현탁배양세포주로부터 유도된 체세포배를 날개로 알진산 캡슐화하여 인공종자화하였다. 인공종자는 1/2 MS 고체배지에서 73%의 발아율을 나타내었으며 알진산 캡슐은 체세포배의 발아율에 영향을 주지 않았다. 그러나 멸균되지 않은 여과지에서는 발아율이 60%로 낮아졌다. 캡슐화된 진정종자는 무균상태여부에 관계없이 높은 발아율을 나타내었다. 이상의 결과로 무균상태가 유지되지 않을 때 인공종자 발아율이 낮아지는 것은 체세포배가 진정종자의 접합자배보다 오염을 견디기 어렵기 때문인 것으로 사료된다.

사 사

본 논문은 과학기술처 특정과제(N80410)의 연구결과이다. 실험재료인 태백벼의 미숙종자를 제공하여준 충남 농촌진흥원 시험국 답작계와 성숙종자를 제공해준 농촌진흥청 작물시험장 직원 여러분과 원고에 대해 세심한 논평과 수정을 가해준 광상수, 이문순 박사에게 감사한다.

인 용 문 헌

- 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
- 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
- Datta SK, Potrykus I (1989) Artificial seeds in barley: encapsulation of microspore-derived embryos. *Theor Appl Genet* 77: 820-824
- Gray DJ, Conger, BV, Songstad DD (1987) Desiccation quiescent somatic embryos of orchardgrass for use as synthetic seeds. *In Vitro Cellular Development Biol* 23: 29-38
- Gray DJ, Purohit A (1991) Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. *Crit Rev Plant Sci* 10: 33-61
- 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 alginate. *Korean J Plant Tissue Culture* 13: 119-128
- 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
- Kim MK, Min SR, Jeong WJ, Song NH, Liu JR (1992) High frequency plant regeneration from cell suspension cultures of Japonica × Indica rice (*Oryza sativa* L.). *Korean J Plant Tissue Culture* 19: 305-309
- Kim YH, Janick J (1989) ABA and polyox-encapsulation or high humidity increases survival of desiccated somatic embryos of celery. *HortScience* 24: 674-676
- Kitto SL, Janick J (1985) Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot. *J Amer Soc Hort Sci* 110: 277-282
- 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, Tautorius 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
- 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** : 478-497

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

Redenbaugh K, Nichol J, Kossler ME, Paasch B (1984) Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production. *In Vitro* **20** : 256-257

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

Yoshida T (1989) イネ F₁의 大量増殖培養法. *Brain テクノニユ-ス* **13** : 1-3

(1994년 4월 22일 접수)