

벼 종자배양에서 Copper가 캘러스 형성 및 식물체 재분화에 미치는 영향

권용삼* · 손재근

경북대학교 농과대학 농학과

Effect of Copper on Callus Formation and Plant Regeneration in Seed Culture of Rice

KWON, Yong Sham* · SOHN, Jae Keun

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

ABSTRACT This study was conducted to improve the regeneration efficiency from seed-derived calli of rice by optimizing the copper concentrations in the media. Mature seeds were cultured on MS medium supplemented with copper sulphate (0 to 5.0 mg/L) and 2 mg/L 2,4-D. Callus growth was influenced by the levels of copper sulphate containing with medium. The addition of copper sulphate (2.5 mg/L) in regeneration medium enhanced dramatically the ability of plant regeneration from seed-derived calli. The mean frequency of plant regeneration of 6 *indica* rices was 27.4% on medium containing copper sulphate, whereas that of the cultivars on copper-free medium was 2.4%. These results suggest that copper sulphate may have an important role in improving regeneration ability of *indica* rices.

Key words: Copper, plant regeneration, rice, seed culture

서 론

벼의 미숙배, 뿌리, 엽초 등과 같은 체세포 조직을 이용하여 식물체를 재분화시키는 기법은 지난 수십 년 동안 연구되어 큰 성과를 얻고 있으나 배양환경, 배지조성, 생장조절제 등 여러 가지 요인이 관여하는 것으로 알려져 있고, 특히 모품종의 genotype 간에 배양효율이 다르다는 점은 앞으로 해결되어야 할 문제점으로 지적되고 있다 (Croughan and Chu 1991). 일반적으로 벼의 종자배양에서 식물체 재분화 능력은 *Indica* 품종보다는 *Japonica* 품종들이 높기 때문에 유용 유전자를 여러 가지 기법에 의해 전이시키는 형질전환 기술은 *Japonica* 품종이 많이 이용되고 있다 (Hiei et al. 1997). 따라서 *Indica* 품종들의 재분화 능력을 향상시키는 기술은 무엇보다도 중요한 것으로 지적되어 오고 있으나 아직까지도 식물체 분화율은 만족할 만한 수준에 이르지 못하고 있는 실정

이다. 배지 내에 첨가되는 미량원소의 하나인 copper는 배양 효율에 큰 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다. 특히, 밀, 트리티케일, 담배의 캘러스 배양에서 뿌리와 줄기의 분화에 매우 효과적이며, 유채의 경우 copper 첨가 효과가 크게 인정되지 않은 것으로 알려져 있다 (Purnhauser and Gyulai 1993). 보리의 경우 미숙배에서 유기된 캘러스 배양에서 MS 기본배지보다는 50 μ M (12.5 mg)의 copper가 첨가된 MS 배지에서 식물체 분화율이 크게 향상되었다는 보고도 있다 (Dahleen 1995). 최근에 *Indica* 벼 품종의 미숙배 배양에서 10~50 μ M (2.5~12.5 mg)의 copper를 첨가하면 캘러스 형성과 식물체 재분화 능력이 크게 증가하였다는 연구가 Sahrawat and Chand (1999)에 의해 보고된 바 있다. 이는 copper의 첨가 효과가 대상작물이나 배양조직에 따라 다르며 적정 농도 또한 일정하지 않다는 것을 제시하고 있다. 그러므로 여러 가지 *Indica* 품종의 종자배양에서 식물체 재분화 능력에 copper의 효과가 구명된다면 형질전환 효율 향상뿐만 아니라 체세포 변이체의 육종적 활용에도 기여할 수 있을 것이라고 생각된다.

*Corresponding author. Tel 053-950-5711 Fax 053-958-6880

E-mail ys4654@naver.com

따라서 본 연구에서는 벼의 종자배양에서 식물체 재분화 능력을 향상시키기 위하여 배지 내에 첨가되는 copper의 적정 농도와 배양효율의 품종간 차이 등에 대한 실험을 수행하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에서는 2000년 경북대학교 농과대학 실습포장에서 표준재배법으로 재배되어 채종된 *Japonica* 품종인 ‘일미벼’와 *Indica* 품종인 ‘삼강벼’, ‘청청벼’, ‘남천벼’, ‘IR 29’, ‘IR 36’ 및 ‘IR 841-76-1’을 공시하여 종자의 내영과 외영을 제거하고 70% ethanol에 30초간 표면살균하여, 2% sodium hydrochlorite 용액에 40분간 소독한 후, 멸균수로 3회 수세하였다.

캘러스 유도 및 식물체 재분화

벼 종자배양에서 copper 농도가 캘러스 형성 및 식물체 재분화 능력에 미치는 영향을 조사하기 위하여, ‘일미벼’와 ‘IR 36’의 멸균된 현미상태의 종자를 N₆ 배지 (Chu et al. 1975)와 copper의 농도가 0, 0.025 (MS 기본), 0.25, 2.5, 5.0 mg/L 농도로 첨가된 MS 배지 (Murashige and Skoog 1962)에 2 mg/L 2,4-D, 2 g/L casein hydrolysate, 30 g/L sucrose, 5 g/L gelrite를 첨가하여 petri-dish (φ 9 cm)에 20 mL씩 분주한 다음 10립씩 배양하였다. 공시재료를 26±1°C로 유지되는 암조건에서 40일간 배양한 다음 2.5 mg/L의 copper와 5 mg/L kinetin, 1 mg/L NAA, 30 g/L sucrose, 5 g/L gelrite가 첨가된 MS 배지에 캘러스를 이식하여 배양 25일 후의 식물체 재

분화 능력을 조사하였다. 캘러스 형성률은 배양된 종자수에 대한 캘러스를 형성한 종자수의 백분율로 나타내었으며, 캘러스 생체중은 배양 40일 후에 1립의 종자에서 유기된 캘러스의 무게를 조사하였다. 식물체 재분화는 26±1°C로 조절되고 1일 2,500 Lux로 조명되는 항온실에서 25일간 배양한 다음 이식된 캘러스로부터 shoot와 root가 1 cm 이상 자란 유식물을 재분화된 식물체로 조사하였다. 그리고 식물체 재분화율은 이식된 캘러스에 대한 식물체가 유기된 캘러스 수를 백분율로 나타내었다.

Copper 첨가에 따른 *Indica* 품종의 식물체 재분화 능력을 조사하기 위하여 ‘삼강벼’, ‘청청벼’, ‘남천벼’, ‘IR 29’, ‘IR 36’ 및 ‘IR 841-76-1’의 멸균된 현미상태의 종자를 2.5 mg/L의 copper가 첨가된 MS 배지에 2 mg/L의 2,4-D를 각각 첨가하여 캘러스를 유기시킨 다음 5 mg/L kinetin, 1 mg/L NAA, 30 g/L sucrose, 5 g/L gelrite가 첨가된 N₆ 배지와 2.5 mg/L의 copper가 함유된 MS 배지에서 식물체를 재분화시켰다.

결과 및 고찰

벼의 조직배양에서 가장 일반적으로 이용되는 N₆ 배지와 여러 가지 농도의 copper가 첨가된 MS 배지에 종자배양하여 캘러스 형성 및 식물체 재분화 능력을 조사한 바 (Table 1, Figure 1), 캘러스 형성은 공시 품종 모두 N₆ 배지에서 MS 배지보다 왕성한 경향을 보였으며, 2.5 mg/L의 copper가 첨가된 MS 배지에서 형성된 캘러스의 생체중이 가장 무거운 것으로 나타났고 5.0 mg/L의 copper가 첨가될 경우 캘러스 생체중은 감소하는 경향을 나타내었다. 그리고 캘러스 형성률은 copper 농도에 따라 다소간의 차이는 있었으나 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다. 식물체 재분화율의 경우 *Japonica*

Table 1. Effect of copper sulphate on callus growth and plant regeneration in seed culture of rice.

Cultivars	CuSO ₄ · 7H ₂ O (mg/L)	No. of seeds inoculated	% of callus formation	Callus weight of per a seed (mg)	No. of calli inoculated	% of plant regeneration
Ilmibyseo	N ₆	100	77.0	190.0 ±15.4 ¹	200	40.5 a ³
	Control	100	62.0	55.0 ±19.7	200	5.5 c
	0.025 ²	100	74.0	170.0 ±16.4	200	32.5 ab
	0.25	100	74.0	190.8 ±12.1	180	36.0 ab
	2.5	100	89.0	230.9 ±16.2	200	42.5 a
	5.0	100	83.0	196.4 ±10.3	200	36.0 ab
IR 36	N ₆	100	56.0	170.3 ±14.6	500	4.0 c
	Control	100	30.0	35.7 ±17.0	200	0.5 c
	0.025	100	52.0	160.3 ±15.5	200	1.0 c
	0.25	100	59.0	183.0 ±13.3	200	17.5 b
	2.5	100	62.0	220.0 ±13.1	200	37.5 a
	5.0	100	57.0	150.3 ±10.7	200	18.0 b

¹Mean ± SD. ²Copper sulphate in MS medium. ³Mean separation within columns by Duncans's Multiple Test at 5% level.

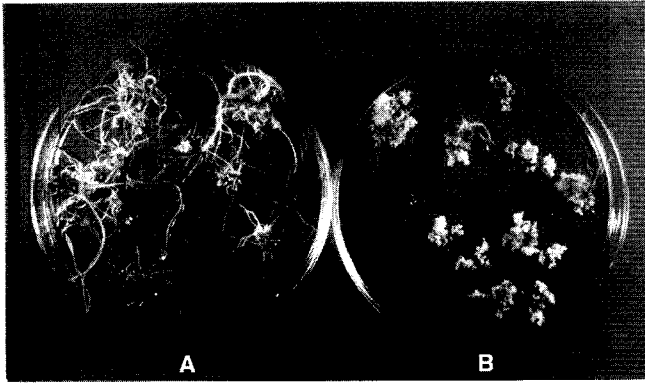


Figure 1. The ability of plant regeneration on MS medium (A) containing 2.5 mg/L copper sulphate and N₆ medium (B) in seed culture of rice (*Oryza sativa* L. cv. IR 36).

품종인 '일미벼' 보다는 *Indica* 품종인 'IR 36' 에서 그 효과가 크게 인정되었다. 'IR 36' 의 경우 N₆ 및 MS 배지에서에서 형성된 캘러스는 5% 미만의 식물체 분화율을 나타내었으나, copper의 처리에 의하여 식물체 재분화율이 증가하였고, 2.5 mg/L의 copper가 첨가된 MS 배지에서 형성된 캘러스의 재분화 능력이 37.5%로 가장 높았다. 그러나 MS 배지 내에 copper가 첨가되지 않을 경우 재분화율이 극히 낮은 양상을 보였으며, 5 mg/L 이상 첨가하면 식물체 분화율은 급격히 감소하는 경향을 나타내었다.

벼 종자배양에서 copper가 첨가된 배지에 캘러스를 유지시킨 다음, 이들 캘러스를 N₆ 배지와 2.5 mg/L의 copper가 첨가된 재분화 배지에 이식한 다음 식물체 분화 양상을 경시적으로 조사한 바 (Figure 2), copper가 첨가된 배지의 식물체 재분화율은 배양 10일 후에 재분화되는 식물체의 비율이 가장 많았으며, 배양기간이 경과될수록 식물체 분화율의 감소 정도는 크지 않은 것으로 나타났다. 그러나 N₆ 재분화 배지의 경우 배양 15일까지 식물체 분화율은 서서히 증가하다가 15일 이후에는 식물체 분화정도가 급격히 감소하는 양상을 나타내어, 재분화 배지에도 copper 첨가가 필요한 것으로 조사

되었다.

'삼강벼' 외 5 품종의 종자를 2.5 mg/L의 copper가 첨가된 MS 배지에 캘러스를 유지시킨 다음 copper가 첨가된 MS 및 N₆ 재분화 배지에 캘러스를 이식하여 배양 25일 후에 식물체 재분화율의 품종 간 차이를 조사한 바 (Table 2), N₆ 배지의 경우 6품종의 평균 재분화율이 5% 미만이었으나, 2.5 mg/L의 copper를 첨가할 경우 27.7%로 높게 나타나 재분화 배지 내에 copper의 첨가가 식물체 재분화에 중요한 역할을 하는 것으로 추정되었다.

본 연구에서 공시품종 모두 copper가 첨가되지 않은 MS 및 N₆ 배지보다는 2.5 mg/L의 copper가 첨가된 배지에서 캘러스 형성 정도와 식물체 분화율이 높게 나타났다. 이러한 연구결과는 보리의 미숙배 배양에서 50 μM (12.5 mg)의 copper가 첨가된 MS 배지에서 식물체 분화율이 크게 향상되었다는 Dahleen (1995)의 연구와 *Indica* 벼 품종의 미숙배 배양에서 10~50 μM (2.5~12.5 mg)의 copper를 첨가하면 캘러스 형성과 식물체 재분화 능력이 크게 증가하였다고 Sahrawat and Chand (1999)의 연구와 copper의 첨가 효과면에서 일치하는 경향을 나타내었다. 그러나 5 mg/L의 copper만 첨가되어도 식물체 분화율은 감소하는 경향을 나타내어 보리와 벼의 연구결과와 다소 상이하게 나타났는데 이는 배양조직 및 모식물의 genotype이 다른 데서 비롯된 결과라고 추정된다. 또한 copper가 첨가된 배지에서 식물체 재분화 양상은 기존 N₆ 배지보다 식물체 분화 기간도 빠르고 배양 전 기간에 걸쳐 식물체가 재분화되는 비율이 급격하게 감소되지 않는 양상을 보였는데 (Figure 2), 이러한 원인은 copper가 캘러스 표면에서 녹색체를 형성할 때 광합성 과정에 크게 영향을 미치며, carbohydrate metabolism에 있어서 몇몇 중요한 enzyme의 일부분으로 작용하기 때문에 나타난 결과라고 Sahrawat and Chand (1999)도 보고한 바 있으나 구체적인 원인에 대해서는 생리·생화학적으로 깊이 있는 연구가 있어야 될 것으로 생각된다.

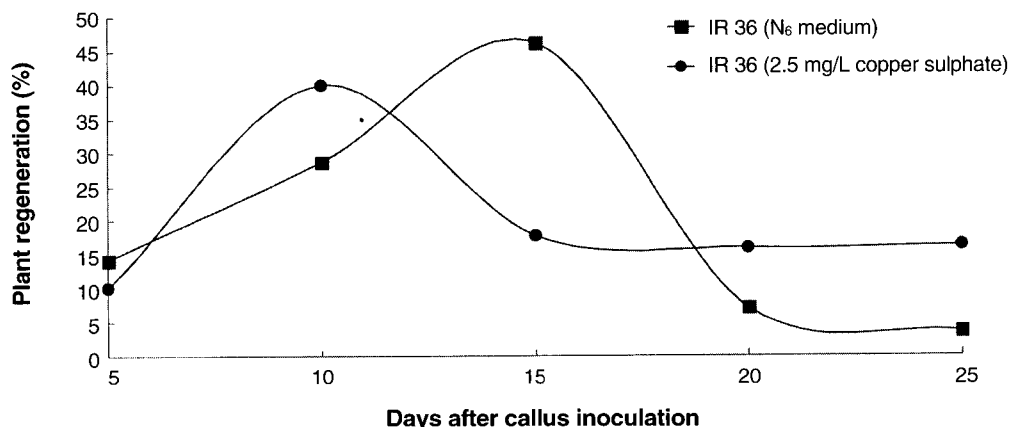


Figure 2. Frequency of plant regeneration to days after callus transferring of seed-derived calli formed on medium with copper sulphate.

Table 2. Varietal difference of plant regeneration from seed-derived calli formed on medium with copper sulphate.

Cultivars	No. of seeds inoculated	% of callus formation	Callus weight of per a seed (mg)	No. of calli inoculated	% of plant regeneration
Namcheonbyeo	100 ¹	54.0	126.0 ± 17.3 ⁴	120 ²	5.0
				200 ³	28.0**
Cheongcheongbyeo	100	60.0	94.9 ± 10.8	120 ²	3.3
				200 ³	17.0*
Samgangbyeo	100	58.0	168.8 ± 19.1	120 ²	3.3
				180 ³	38.0**
IR 36	100	68.0	220.0 ± 13.1	120 ²	1.2
				200 ³	37.5**
IR 29	100	60.0	156.7 ± 15.7	120 ²	0.2
				200 ³	16.0*
IR 841-76-1	100	56.0	97.9 ± 16.4	200 ²	1.8
				200 ³	28.0*

¹MS+2.5 mg/L CuSO₄ · 7H₂O+2 mg/L 2,4-D+2 g/L casein hydrolysate+30 g/L sucrose+5 g/L gelrite.

²N₆+1 mg/L NAA+5 mg/L kinetin+30 g/L sucrose+5 g/L gelrite.

³MS+2.5 mg/L CuSO₄ · 7H₂O+1 mg/L NAA+5 mg/L kineti+30 g/L sucrose+5 g/L gelrite.

⁴Mean ± SD. ** Significantly different from the control at P=0.05 and P=0.01, respectively.

Indica 품종의 경우 N₆ 배지를 이용하여 종자배양 하였을 때 식물체 분화율이 5% 미만이었으나 copper가 첨가된 배지를 이용할 경우 식물체 재분화 효율이 크게 향상되었으며 (Table 2), 특히 '삼강벼'와 'IR 36'은 30% 이상 식물체 분화율을 향상시킬 수 있는 것으로 나타나 *Indica* 품종의 형질전환에 매우 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 최근에 Nuutila et al. (2000) 등은 보리의 미숙배 배양에서 copper가 백색체 출현을 크게 억제하고 녹색체의 발생 빈도를 크게 향상시킨다고 하였는데, 이러한 연구결과를 바탕으로 벼의 약배양 배지에 copper를 첨가하면 화분과 작물의 약배양에서 가장 큰 문제점으로 지적되어 온 백색체 출현 빈도를 크게 줄일 수 있을 것으로 생각된다.

적 요

벼의 종자배양에서 식물체 재분화 능력을 향상시키기 위하여 2 mg/L의 2,4-D와 여러 가지 농도의 copper (0~5.0 mg/L)가 첨가된 MS 배지에 종자배양 한 바 캘러스 성장 정도는 copper 농도에 따라 다르게 나타났는데 특히, 2.5 mg/L의 copper가 첨가된 배지에서 가장 양호하였다. 그리고 캘러스 형성률과 copper 농도 간에는 유의성 있는 차이가 인정되지 않았다. 식물체 재분화 배지에 2.5 mg/L의 copper의 첨가는 *Indica* 품종들의 식물체 재분화 효율을 크게 향상시켰다. Copper가 첨가되지 않은 N₆ 배지에서 *Indica* 6품종의 평균 재분화율은 2.4%이었으나, copper가 첨가된 배지에서 27.4%로 높게 나타났다.

인용문헌

- 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 Sinica* **18**:659-668
- Croughan TP, Chu QR (1991) Rice (*Oryza sativa* L.): Establishment of callus culture and the regeneration of plants. In: Rice, Bajaj YPS, (ed), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol 14, Springer-Verlag, Berlin, pp19-37
- Dahleen LS (1995) Improved plant regeneration from barley callus cultures by increased copper levels. *Plant Cell Tiss and Org Cult* **43**:267-269
- Hiei Y, Komari T, Kubo T (1997) Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol* **35**:205-218
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **25**:473-497
- Nuutila AM, Hämäläinen J, Mannonen L (2000) Optimization of media nitrogen and copper concentrations for regeneration of green plants from polyembryogenic cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.) *Plant Sci* **151**:85-92
- Purnhauser L (1993) Stimulation of shoot and root regeneration in wheat (*Triticum aestivum*) callus cultures by copper. *Cereal Res Comm* **19**:419-423
- Purnhauser L, Gyulai G (1993) Effect of copper on shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue cultures. *Plant Cell Tiss and Org Cult* **35**:131-139
- Sahrawat AK, Chand S (1999) Stimulatory effect of copper on plant regeneration in indica rice (*Oryza sativa* L.). *J Plant Physiol* **154**:517-522