

食糧資源確保를 위한 遺傳子工學의 研究現況과 展望

李 榮 日

<韓國에너지研究所 放射線農學研究所>

나. 細胞融合에 의한 體細胞雜種 (somatic cell hybrid or cybrid)獲得

細胞融合에 의하여 體細胞雜種植物을 얻을 수 있게 되었는데 體細胞雜種은 交配에 의해서 有性的으로만 가능했던 雜種生産과는 달리 體細胞들끼리 無性的으로 試驗管內(in vitro)에서 人爲적으로 만들어진 것이다.

그런고로 交配에서 얻어진 有性的雜種植物과 體細胞融合에 의하여 만들어진 無性的雜種植物과는 核型(karyotype)과 細胞質(cytoplasm)의 構成面에서 완전히 다른데, 有性生殖을 거쳐 雜種이 생길 경우 일단 減數分裂(miosis)를 거치기 때문에 染色體數가 원래의 親과 똑같이 2倍性이 되고 細胞質은 母親의 것을 받게 되는데 반해 體細胞雜種은 2倍性體細胞끼리 無性的으로 融合이 되어 만들어짐으로 4倍體植物이 되는 셈이고 또 細胞質도 兩親의 것이 똑같이 합해지기 때문에 核內遺傳子와 細胞質遺傳子間의 關係는 한층 複雜해진다. 물론 n 性 生殖細胞끼리의 融合도 가능하지만 例外的인고로 여기서는 體細胞雜種에 관해서만 記述키로 하겠다.

體細胞雜種은 組織으로부터 細胞를 遊離해 내어 細胞膜을 除去시켜 原形質體(protoplast)로 만들고 이 原形質體끼리 融合케 하는 것이다. 이 融合原形質體에 다시 細胞膜을 再生시켜 雜種細胞集團을 얻고 여기서 植物體로 分化시키면 곧 體細胞融合에 의해 만들어진 體細胞雜種植物이다. 이와 같은 細胞融合은 細胞에서 細胞膜을 除去하는 技術의 발달로 가능하게 되었는데 처음은 機械的 方法에 의하여 細胞로부터 原形質體를 裸出시키던 것이 최근에는 各種 酵素를 이용한 方法이 등장하게 됨으로써 原形質體培養, 細胞融合, 形質轉換 등의 遺傳工學研究가 본격적으로 活潑히 進行되게 되었고 특히 細胞融合, 形質轉換面에서 큰 관심을 모으게 되었다.

高等植物에서 酵素를 써서 처음 原形質體를 얻은 것은 英國의 Cocking(1960)이었는데 그는 組織에서 單細胞를 遊離시켜 培養하려는

目的이었으나 우연히 약간의 原形質體를 얻게 되었고 그후 1965년 Jyung 등이 pectinase로 콩과 담배에서 單細胞를 遊離시켰다. 1968년 Takebe 등이 곰팡이에서 抽出한 Macerozyme 과 cellulase를 사용하여 담배 잎에서 單細胞와 原形質體를 얻었는데 이 때에 비로소 본격적인 原形質體裸出에 成功한 셈이다.

Power 및 Cocking (1970)은 pectinase와 cellulase를 混合處理하여 組織에서 직접 原形質體를 얻는 방법을 提示하였는데 植物의 組織細胞膜은 α -cellulose, hemicellulose, pectin, protein, lignin 등이 生長, 分化, 栽培環境에 따라 각각 다른 比率로 構成되어 있어 같은 植物이라도 酵素處理의 反應이 다르게 나타난다. 原形質體를 裸出시키면 견고한 細胞膜은 없어지고 극히 연약하고 신축성 있는 plasmalemma로 原形質體가 둘러 싸여 있게 되는데 외부의 環境에 극히 敏感하여 터지기 쉬우므로 적당한 plasmolysis를 維持시켜 주어야 하는데 이때 plasmolyticum으로는 mannitol, sorbitol, sugar 등을 사용하고 있다.

현재 植物組織에서 原形質體를 裸出시키는 것은 별 문제가 없으나 여하히 살아있는 狀態의 原形質體를 얻느냐 하는 것이 극히 어렵다. 철저한 無菌作業과 사용하는 培養器의 組成, 酵素의 純化, 物理的條件등 극히 細密하고 精巧한 專門의 技術이 要하게 된다.

細胞融合은 Power 등이 原形質體融合에 대한 可能性을 提示한 이래 Nagata 및 Takebe 와 Nitsch 및 Ohyama(1971)가 담배에서 각각 原形質體로부터 植物體를 再分化(Redifferen-

tiation)하는데 成功한데 이어 Carlson(1972) 등이 原形質體融合에 의한 體細胞雜種植物을 처음으로 獲得한 바 있으나 처음에는 認定받지 못하다가 그후 Smith 등이 똑같은 실험을 再確認함으로써 비로소 體細胞雜種의 成功을 認定받게 되었다.

Carlson 등이 처음 만든 體細胞雜種植物은 染色體數가 다른 담배의 種間雜種「*Nicotiana glauca* ($2n=24$)+*N. langsdorfii*($2n=18$)」이었고 雜種植物의 染色體數는 42~56個로 多樣하였다. 그후 Melchers 및 Labib(1973, 1974)가 種間雜種을 얻는데 成功하였고 1978년 Melchers 등은 감자와 도마도의 屬間體細胞雜種(Intergeneric somatic cell hybrid)를 만드는데 成功함으로써 本格的인 遺傳工學의 문이 열리게 된 셈이다.

Melchers는 감자와 도마도의 屬間體細胞雜種 중에 감자를 많이 닮은 것은 「Potatoes」, 도마도를 많이 닮은 것을 「Topatoes」라 명명하였다. 이 屬間雜種植物은 아직 農耕上 利用價値가 현재로서는 전혀 없는 植物이나 體細胞끼리의 細胞融合에 의해 만들어진 「人工雜種植物」이라는데 큰 意義가 있고 또 支配에 의해서는 불가능한 遠緣間雜種을 만들 수 있는 契機가 된다는 뜻에서 매우 重要한 것이며 植物育種分野의 紀新元을 이룬 셈이다.

Shepard(1981) 등도 감자와 도마도의 屬間體細胞雜種을 같은 방법으로 만들었는데 감자는 2~11cm의 길쭉한 모양의 것이 달리고, 도마도는 직경 2.5cm 가량의 황색 도마도가 한 植物體에 열리는데 이것 역시 아직 쓸모있는

표 1. Examples of somatic hybrid plants derived from intergeneric protoplast fusion

Somatic hybrids	Reference
<i>Solanum tuberosum</i> + <i>Lycopersicon esculentum</i>	Melchers et al., 1978
<i>Arabidopsis thaliana</i> + <i>Brassica napus</i>	Gleba and Hoffmann, 1978, 1979
<i>Datura innoxia</i> + <i>Atropa belladonna</i>	Krumbiegel and Schieder, 1979
<i>Nicotiana glauca</i> + <i>Glycine max</i>	Kao, 1977
<i>Petunia hybrida</i> + <i>Vicia faba</i>	Binding and Nehls, 1978
<i>Daucus carota</i> + <i>Aegopodium podagraria</i>	Dudits et al., 1979
<i>Lycopersicon esculentum</i> + <i>Solanum tuberosum</i>	Shepard et al., 1981
<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>Salpiglossis sinuata</i>	Nagao, 1982

것은 못된다. 1983년 현재까지 細胞融合에 의한 種內 또는 種間體細胞雜種植物의 획득만도 약 50여종이 되며 屬間體細胞雜種도 10여종이 발표된 바 있다(表 1 참조).

이 分野의 國內 研究로는 韓·崔(1972), 韓·金(1973), 韓·李(1974)가, 벼, 담배, 고려인삼에서 각각 原形質體標出 및 融合에 관한 研究가 있었고, 韓·李(1974)가 파와 양파의 異種間 原形質融合을 試圖한 바 있으나 雜種植物을 얻지는 못했고 근래 大學이나 研究所 등에서 이 分野에 관심을 모으게 되었다.

原形質體의 培養은 植物의 組織片 또 callus → 單細胞遊離 → 原形質體標出 → 培養 → 細胞膜再形成 → callus 또는 胚狀體(embryoid) → 器官 또는 植物體의 再分化의 體係(그림)가 確立됨에 따라 (1) 原形質體에 virus, phage, pla-

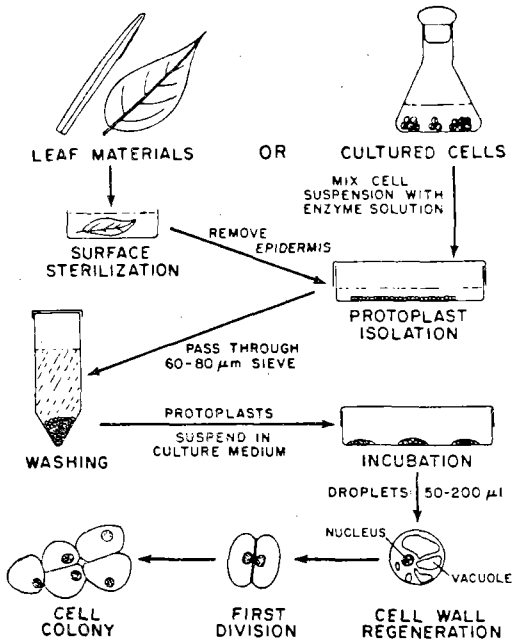
smid, DNA, 染色體, 核, 葉綠體, mitochondria. 같은 外來 物質을 집어 넣어 遺傳形質을 轉換하는 手段으로, (2) 細胞膜이 없이 裸出된 狀態이기 때문에 同種, 異種의 原形質體 뿐 아니라 遠緣植物, 나가서는 kingdom이 다른 것까지의 融合도 可能해서 雜種植物을 만드는 手段으로 (3) 遺傳工學의 尖端이라 할 수 있는 DNA의 稀植에 의한 形質轉換의 基本手段으로 活用이 크게 展望되고 있다.

특히 강조하고 싶은 것은 Melchers 등과 Shepard 등이 만든 감자와 도마도의 屬間雜種은 너무 遠緣間 體細胞雜種이 되었기 때문에 染色上의 不均衡으로 실지 農耕上 쓸모없는 植物이 되었으나 方向을 바꾸어 감자나 도마도의 片親에 放射線을 適正量 照射한 후 原形質融合을 시키면 소위 cybrid가 되는데 오히려 이 cybrid 쪽이 農耕上 利用價値가 있을 것으로 確信한다.

왜냐하면 현재 재배되고 있는 감자는 virus. 病 때문에 매년 種著를 새로운 것으로 바꾸어야 함으로 비용이 많이 들고 어려움이 따른다. 만일 virus病에 耐性이 강한 品種을 만들면 이러한 번거로움이 제거될 것인데 감자에 도마도의 細胞質만 導入하면 감자의 染色體는 그대로 存在하면서 도마도측의 細胞質만 받게되므로 (1) 감자의 PMV와 도마도의 TMV가 동시에 不活性化되는 경우, (2) 감자의 PMV만 不活性化되는 경우, (3) 도마도의 TMV만 不活性化되는 경우 등을 예상할 수 있겠는데 마지막 (4)項을 제외하고는 農耕上 쓸모있는 바람직한 植物이 될 것이다.

이러한 試圖은 放射線을 어느 程度 處理해야 cybrid를 얻을 수 있는 最適線量인가가 研究되어야 하겠고, 放射性同位元素를 利用해서 處理된 쪽의 染色體의 行動을 면밀히 追求해 나가야만 所期의 목적을 무난히 달성할 수가 있을 것이다.

PLANT PROTOPLASTS ISOLATION AND CULTURE



Outline of the steps used in the isolation and culture of plant protoplasts.

다. 半數體(haploid) 誘起

高等植物에서 半數體(haploid)가 되는 原因

은 여러가지가 있으나 여기서는 藥培養 또는 花粉培養에 의한 것만을 記述키로 한다. Guha 및 Maheshwari가 독말풀(Datura)의 花粉에서 半數體를 얻은 것이 契機가 되어 그후 담배의 藥培養으로 半數體를 만들어 냈고(Bourgin 및 Nitsch, 1967; Nitsch 등 1969; Tanaka 및 Nakata, 1969), Niizeki 및 Oono(1968, 1971)는 벼에서 半數體를 획득했다. 이어서 보리, 밀, Triticale, 도마도, 감자, 고추, 가지, asparagus, pelagonium 등 다수의 植物에서 半數體를 만들어 냈다.

藥培養이나 花粉培養에서 半數體가 나오는 과정은 花粉→callus→半數體植物의 과정과 花粉→embryoid→植物體로 분화되는 두가지 과정이 있는데 이는 培地의 組成이나 그 植物의 特性에 따라 달라진다. 花粉을 培養할 때 始初의 核分裂은 均等 혹은 不均等 分裂을 거쳐 callus나 embryoid로 자라게 되는데 이에 대한 發生學의 特性은 현재로서 전혀 알수가 없다. 또 藥培養에서 藥의 培養時期도 대단히 문제가 되는데 植物의 種類에 따라서 4分子期—核性小胞子期, 未熟花粉 등 培養의 適期가 각기 다르다는 報告가 있는가 하면 同一 植物에서도 適期가 다르다는 報告가 있어 아직 이 문제도 모르는 점이 많다.

國內의 研究進陟도 藥培養만은 상당한 業績을 남기게 되리만큼 커서 英國의 Street가 쓴 「plant tissue and cell culture」책에 國內論文이 여러편 引用된 바 있다. 韓은 *Solanum nigrum*을 재료로 藥培養에 成功했는데 國內外的으로 이 植物에서 처음 半數性植物體가 誘起된 셈이다. 이어서 담배, 벼, 고추, 도라지, 작약의 半數體誘起에 成功한 바 있는데 그중 까마중, 도라지, 작약은 國內外的으로 最初의 成功例가 되었고 고추는 中共과 거의 同時에 發表되었다.

植物育種에서의 半數體利用은 n 性 單細胞를 만들어 직접 利用하기 때문에 育種年限을 대폭 短縮시킬 수 있을 뿐만 아니라 polyploid의 획득, 純系育成등 극히 便利한 수단이 되는데 純系育成은 F_1 種子生産에 要하는 5~6

년의 期間을 1年 內에 만들 수 있는 유일한 方法이 된다. 현재 이 技法에 의하여 實用化된 예도 상당수 있으며 이 方向의 研究는 물론 實用化의 事例가 增加될 것으로 展望된다.

라. Vector를 利用한 形質轉換

微生物에서는 vector를 利用한 DNA의 移植이 보편화되어 가고 있는 실정이나 高等植物에서는 vector system의 開發이 늦어 遺傳子操作에 制限要因이 되고 있다. vector 開發에 制限을 받게 되는 原因은 形質轉換에 關係하는 標識因子(Marker gene)의 缺如 때문인데 alcohol dehydrogenase에 關係하는 遺傳子是 植物의 Host vector system에 매우 有用한 標識因子로 밝혀졌다(Freeling 및 Cheng, 1978).

微生物에서는 이러한 標識因子를 얻기 위해서 대부분 放射線을 利用해서 많은 標識因子를 探索해 왔지만 高等植物에서는 이 分野의 研究가 아직 제대로 遂行되질 못했기 때문에 앞으로 이 方向의 研究가 필히 進展되어야 高等植物의 遺傳子操作에 蹉跌이 없을 것으로 본다.

Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 植 自然狀態에서 매우 限定된 寄主範圍를 갖는데 *in vitro*에서 그 範圍를 약간 擴大시킬 수 있다고 하지만 轉寫(Transcription)나 複寫(Duplication) 機構가 매우 복잡하고 種子傳染이 전혀 안되는 virus라는 점과, genome의 크기에 制限을 받기 때문에 移植코저하는 DNA의 量에 많은 制限要因이 된다. 그러나 *Agrobacterium tumefaciens*는 상당히 廣範圍한 種類의 雙子葉 植物에 crown gall를 형성시키는 病菌으로 CaMV보다 植物 vector로 훨씬 유망한 것으로 判정되었다.

이 菌은 Ti plasmid (T-DNA)를 가지고 있는데 寄主體에 感染케 하면 寄主體의 核 DNA와 同化(integration)되는 特性을 지니고 있기 때문에 種子傳染이 可能하다. 그러나 담배 細胞에 이 T-DNA를 그대로 移植시키면 hormone의 不均衡으로 植物體再分화가 안되나 放射線을 處理하여 T-DNA에서 hormone에 關係하

는 한두개의 因子를 제거한 것을 사용하면 植物體再分化에 支障이 없게 된다.

또한 이들은 眞核細胞의 DNA에 잘 同化되어 種子繁殖作物의 遺傳子操作에 매우 바람직한 vector가 될 것으로 展望되고 있다. 이 외에 Dahlia Mosaic virus와 Caulimo virus 등이 CaMV보다 넓은 宿主範圍를 가지고 있는 vector로서 開發의 可能性이 높은 것으로 알려져 또한 mitochondria DNA, chloroplast DNA 등이 vector로 개발되고 있다.

마. 無病株生産 및 大量急速増殖

無病株生産과 大量増殖은 組織培養에서 가장 먼저 實用化된 分野의 하나이고 成果도 刮目할만한 것이다. 營養繁殖作物은 대부분 virus에 感染되어 있어 生育沮害에 의한 收量減少, 品質低下 등에서 오는 損失은 큰 것인데 Morel 및 Martin이 virus가 感染된 作物의 生長點培養을 한 결과 virus가 除去된다는 事實을 발견하였고 이어서 이 방향의 研究가 급속히 進展되어 일찍 1960年代에 先進國에서 實用化가 되었고 國內에서도 현재 實用化된 것도 있다. 처음에는 生長點培養만이 無病株生産手段으로 생각해 왔지만 현재에는 組織培養을 오랫동안 器內에서 계속하게 되면 病이 除去된다는 사실도 입증되어 이 方向의 實用化範圍는 점차 增加 될 展望이다.

현재 組織培養에서 企業化段階까지 이른 다른 分野는 大量急速増殖인데, 生長點, 腋芽, mericlone 등을 器內培養하면 1년에 百萬배까지 増殖시킬 수가 있어 種子繁殖보다도 増殖 効果도 높고 특히 多年生 林木이나 果樹처럼 種자를 얻기까지 4~5년 이상 걸리는 作物에서는 이와 같은 増殖法이 엄청난 效果를 가져온다. 현재 洋蘭, poinsettia, african-violet, syngonium, 林木 등에서 實用化가 되고 있는 實情이다.

이 分野의 國內研究도 상당히 보급이 되어 있는 편이고 企業化까지도 試圖하기에 이르렀다. 菜蔬나 花卉類의 他家受精作物은 오랫동안 品種改良을 해온 결과, 잎, 과실, 꽃 등만

발달해서 種子生産이 안되거나 種子로 繁殖해도 遺傳因子가 hetero로 構成되어 있어 원래의 特性을 維持할 수 없는 것이 많은데 이 경우 이 方法에 의해 増殖을 하면 원래의 親과 特性이 꼭 같은 個體를 다량 늘릴 수 있어 대단히 效果적이다.

또한 一代雜種生産에 있어서도 雄性不稔個體의 維持増殖은 F_1 種子生産에 重要な 要因이 되는데 힘들어 雄性不稔個體를 얻었다 하더라도 이에 맞는 花粉親이 없을 때에는 人爲的으로 核置換해서 만들어야 한다. 그러나 오랜 期間과 많은 努力 및 費用이 드는데 이 雄性不稔個體의 組織一部를 떼어 器內培養하여 多量増殖하면 쉽게 해결될 것이다.

5. 結 論

遺傳工學에 의한 農作物의 形質轉換에 의한 食糧増產은 細胞水準에서의 遺傳子操作技術과 既存育種技術을 併行해야 달성할 수 있음은 再言의 여지가 없는 것이다. 遺傳子操作은 細胞水準에서 이루어지기 때문에 單細胞培養, 原形質體培養, 半數體誘起와 大量増殖技術을 定着시켜야 함은 물론 이와 관련된 分子遺傳學, 細胞遺傳學, 生化學 등의 基礎學問의 발전이 뒷받침해 주어야 할 것이다.

單細胞培養과 原形質體培養은 遺傳變異幅을 대폭 增大시켜 줄 것이며 原形質體融合은 交雜이 불가능한 遠緣間의 雜種植物을 얻는 唯一의 方法일 뿐만 아니라 原形質體內에 外來物質을 쉽게 移植시키는 수단으로 이용되어 形質轉換에 매우 効果적인 方法이 된다. 그러나 農作物은 高等植物인고로 細胞水準에서 일단 遺傳子操作에 成功했다 하더라도 形質發現이 後代에 繼承되어야 하기 때문에 한층 複雜해지게 되어 이 分野의 發展은 微生物에서보다 느린 편이지만 계속 遺傳子操作에 필요한 vector의 開發이라던가 細胞融合에 의한 雜種植物作出, 外來 遺傳物質의 移植, 標識因子의 開發 등의 基礎研究가 活潑히 進行되고 있어 장차 農作物에서도 劃期的인 發展의 可能性은 대단히 높다고 판단되어진다. ■