

作物의 遺傳子 再組合을 위한 細胞株의 開發 研究**

蔡永岩*·崔奎煥*

Development of Cell Lines for Application of Recombinant DNA Techniques in Crops

Young Am Chae* and Kyu Whan Choi*

ABSTRACT

This experiment was carried out to know the processes of protoplast isolation, culture and plant regeneration in aims of introducing foreign genes into plant cells through plant gene vector, and cellular selection for plant improvement. The main results indicated that 2% cellulase plus 0.5% macerozyme is proper for isolation of protoplasts from leaf mesophyll cells of *N. plumbaginifolia*, plating efficiency was higher in $1.4-2.0 \times 10^4$ cells/ml, complete cell wall was regenerated after 2 days culture, cell division and cell mass were observed after 4 days and 2 weeks, respectively, colony was developed after 3 weeks culture, addition of 1-2mg/l BA promoted shoot differentiation while root differentiation did not required hormone and seeds were harvested from more than 100 cell lines for further investigation and study.

緒 言

細胞에서 얻은 植物體인 protoclones 은 그 자체만으로도 여러가지 形質에 대해 광범위한 變異性을 보여주기 때문에 細胞는 한 植物의 遺傳子 構成을 變更시킬 수 있고 또 이로부터 完全한 植物體를 얻을 수 있는 최소 단위 일 뿐만 아니라 細胞水準에서 育種選抜이 可能한 單位가 될 수 있다. 最近 유전자 재조합 기술의 발전으로 植物細胞에 外來의 유용한 遺傳子를 도입시킬 수 있게 될 것으로 생각된다. 그러나 이러한 目的을 이루기 위해서는 原形質體 배양에 의한 再分化 過程에 대한 검토가 필요하다.

Cocking¹⁾ 이 토마토의 뿌리에서 원형질체를 얻기 위하여 조효소를 사용한 이래 Ruesink & Thiman¹⁰⁾ 은 다른 組織으로부터 이 효소를 이용하여 원형질체를 分離하고자 하였다. 삼투압 조절제로서

sucrose 를 利用하여 깨끗한 원형질체를 얻을 수 있었다고 研究者들^{3,11,13)} 은 報告하고 있다. 現在 cellulase 와 pectinase 를 주로 利用하고 있으며 培養溫度는 일반적으로 25-30° C 범위로 보고되고 있다.¹¹⁾ 原形質體는 植物의 여러 組織에서 얻을 수 있으나 葉組織으로 부터 보다 쉽게 裸出시킬 수 있으며,³⁾ 培養하고 있는 組織이나 細胞에서도 원형질체를 얻을 수 있다.^{6,11,12)}

이와 같이 裸出된 원형질체는 세포막이 없어 양분 흡수가 용이하기 때문에 細胞培養 조건보다 무기염류의 농도를 낮게하여 사용하며 基本培地는 Mura-shige - Skoog (MS) 배지이며 여러가지 變更改良된 배지가 植物種에 따라 달리 쓰이고 있다. 원형질체 배양밀도는 $10^4 - 10^5 / ml$ 이며 주로 液體培養을 하고 있으나 固體培地를 利用하기도 하며 또 drop culture 方法도 쓰이고 있다.^{4,5,7)} 이와 같이 배양한 원형질체는 24 時間 정도 지나면 細胞隔을 再生시키고 세포 분열이 되면서 callus 를 形成

* 서울大學校 農科大學 (College of Agriculture, Seoul Nat'l Univ., Suwon 170, Korea).

** 이 研究는 農村振興廳 研究造成費(1983)에 의하여 遂行되었음. < 1985. 5.10 接受>

하고 이 callus로부터 器官을 分化시켜 完全한 植物體로 再分化시키게 되나 아직은 당근, 감귤류, 담배, 페닌세티아 등과 같이 제한된 植物種에서 可能하다.^{7,8,11)} 禾本科 植物에서도 원형질체를 나출시켰으나 再分化는 성공하지 못하였다.^{1,9)} 本 研究는 원형질체를 培養하여 再分化하는 過程을 밝히고 이로부터 有用한 細胞株를 양성하여 作物의 유전, 육종, 생리 등의 研究에 利用하고자 수행하였다.

材料 및 方法

本 實驗에 供試한 材料는 담배의 野生種인 *N. plumbaginifolia*이며 26 - 28°C에 2000 lux로 16時間 조명되는 生長조절실에서 생육시켰다.

잎이 10-15 cm 정도 되었을 때 sodium hypochloride 0.5 %와 2 %를 각각 3분과 10分 처리하여 表面消毒率을 調査하였다.

표면소독한 잎은 핀셋으로 表皮를 벗겨 1 g을 B5 배지에 750 ml/l CaCl₂, 12 % sucrose, 3mg/l NAA 및 1mg/l BA를 넣은 preplasmolysing 용액에 22°C에서 1時間 정도 처리한 다음 cellulase R-10과 macerozyme R-10의 농도를 달리한 酵素溶液으로 대체하여 22°C에서, 16時間과 45°C에서 2時間 培養하여 裸出し킨 原形質體를 100 g에서 5分間씩 2回 遠心分離하여 순수한 원형질체를 얻었다. Hemacytometer로 ml 당 完全한 原形質體 數만 調査하여 原形質體의 裸出效率를 調査하였다.

培養密度에 따른 置床效率를 알기 위하여 培養密度를 5個 水準으로 하여 B5 培地에 750 ml/l CaCl₂, 10 % sucrose, 3mg/l NAA 및 1mg/l BA를 첨가한 培地에 넣고 26°C 암상태에서 4日間 培養한 다음 細胞分裂을 관찰하였고 培養 4週 後 육안으로 colony의 形成 정도를 보아 치상 效율을 판단하였다.

최적 배양배지를 찾기 위하여 macro and micro nutrients, vitamin의 組成을 달리하고 또 sucrose, 홀농도 및 液體培地와 agar를 첨가한 固形培地 등 4個 배양배지 (表 1)를 使用하였다. 培養 밀도는 1.4 × 10⁴ protoplasts/ml로 고정하였으며 처리당 10 반복하였다. 培養 5週 後에 callus의 形成 정도, 크기 및 색택을 調査하였으며 배양은 26°C의 암상태에서 하였다.

Callus의 直徑이 1 - 2 mm 되었을 때 B5 培地에 750 mg/l CaCl₂, 3 % sucrose, 0.9 % agar를 첨가한 培地에 NAA와 BA의 濃度を 달리하여 組合한 6個 處理를 하여 shoot 分化에 미치는 影響을 調査하였다. 처리당 10 반복하였으며 10 日 後부터 callus의 크기와 shoot 形成을 調査하였다. Shoot의 길이 가 2 cm 정도 되었을 때 0.9 % agar를 첨가한 MS 培地에 옮겨 發根을 시킨 다음 잎이 3~4 枚 되었을 때 pot에 移植栽培하였다.

Table 1. Composition of media for protoplast culture (mg/l)

| Item | Medium 1 | Medium 2 | Medium 3 | Medium 4 |
|---|----------|----------|----------|----------|
| NH ₄ NO ₃ | 800 | 800 | — | — |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 440 | 440 | 220 | 440 |
| KNO ₃ | 1010 | 1010 | 950 | 1900 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 738 | 738 | 185 | 370 |
| KH ₂ PO ₄ | 136 | 136 | 85 | 170 |
| AlCl ₃ | 0.09 | 0.09 | — | — |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.09 | 0.09 | 0.02 | 0.02 |
| H ₃ BO ₃ | 3 | 3 | 3 | 6 |
| MnSO ₄ ·4H ₂ O | 0.3 | 0.3 | 10 | 20 |
| KI | 0.03 | 0.03 | 0.8 | 0.8 |
| NiCl ₂ ·6H ₂ O | 0.09 | 0.09 | — | — |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 3 | 3 | 9 | 9 |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0.01 | 0.01 | 0.03 | 0.03 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 0.2 |
| FeNa EDTA | 37 | 37 | 18 | 37 |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | — | — | 14 | 28 |
| Inositol | 100 | 100 | 50 | 100 |
| Biotin | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.02 |
| Thiamine HCl | 1 | 1 | 0.25 | 0.5 |
| Pyridoxine HCl | 1 | 1 | 0.25 | 0.5 |
| Nicotinic acid | 1 | 1 | 2.5 | 5.0 |
| Ca pantothenate | 1 | 1 | — | — |
| Glycine | — | — | 1 | 2 |
| Folic acid | — | — | 0.25 | 0.5 |
| Casein hydrolyzate | — | — | 500 | 1000 |
| Adenine sulfate | — | — | — | 40 |
| NAA | 0.1 | 0.1 | 1 | 0.05 |
| BA | 0.2 | 0.2 | 0.5 | 0.5 |
| Sucrose | 10% | 3% | — | 3% |
| Mannitol | — | — | 0.35M | 0.35M |
| Agar | — | — | 1.5% | 2% |

結果 및 考察

1. 表面消毒과 原形質體 標出

完全히 展開된 잎을 70% 알콜에 10초간 침적한 後 sodium hypochloride의 濃도와 消毒時間을 달리하여 처리하고 培養 10日 後의 오염정도를 調査한 結果는 表2와 같다. 表에서 보면 2% sodium hypochloride에 3分間 침지 소독한 것이 소독율 90% 이상을 나타냈고 10分 침지한 경우는 植物體가 시들어진 상태가 되어 表皮를 벗기기가 어려웠다.

Table 2. The effects of different concentration and time for surface sterilization of tobacco leaves.

| Sodium hypochloride concent | Damaged leaves(No.) | Contaminated leaves (No.) | Sterilization ratio (%) |
|-----------------------------|---------------------|---------------------------|-------------------------|
| 0.5% 3 min. | 0 | 5 | 50 |
| 0.5% 10 min. | 5 | 2 | 30 |
| 2.0% 3 min. | 0 | 1 | 90 |
| 2.0% 10 min. | 10 | 0 | - |

Table 3. Effects of enzyme concentration and incubation temperature for isolation of protoplasts from leaf mesophyll cells.

| Incubation | Enzyme concentration(%) | | No. of protoplasts/ml ($\times 10^5$) |
|------------|-------------------------|------------|---|
| | Cellulase | Macerozyme | |
| 22°C | 0.5 | 0.25 | 2.36 |
| | 1.0 | 0.25 | 2.86 |
| | 1.5 | 0.35 | 3.52 |
| | 2.0 | 0.50 | 4.22 |
| 45°C | 2.0 | - | 1.44 |
| | 0.5 | 0.25 | 2.72 |
| | 1.0 | 0.25 | 3.52 |
| | 1.5 | 0.35 | 3.02 |
| 2 hrs. | 2.0 | 0.50 | 4.42 |
| | 2.0 | - | 1.95 |

效果的인 原形質體 標출을 위한 최적 효소농도를 찾기 위한 實驗 結果는 表3과 같다. 表에서 보면 cellulase 單獨 使用보다는 macerozyme을 混用하는 것이 좋으며 최적 酵素 組合은 cellulase 2%와 macerozyme 0.5%를 使用한 경우로 이 농도 組合에서는 培養 溫度에 關係없이 제일 良好하였

다. 그러나 標出시킨 原形質體의 活力을 고려할 때 45°C 보다는 22°C에서 16時間 배양하는 것이 좋을 것으로 생각되며 실제로 45°C에서 標出시킨 原形質體는 細胞分裂이 좋지 않았다. 原形質體 標出時 삼투압의 농도는 完全한 原形質體를 얻는 데 重要한 影響을 미치고 있다. 여기서 使用한 12% sucrose 濃度에서는 細胞가 破壞되거나 워축되지 않은 原形質體를 얻을 수 있다(그림 1).

2. 原形質體의 培養密度

原形質體를 培養할 때 어느 일정한 水準의 濃도가 유지되어야 培養液에 있을지도 모르는 毒素나 細胞 相互間에 어떤 물질교환이 이루어 져서 細胞分裂과 生長이 可能해 질 것으로 생각된다. 表4는 標出시킨 原形質體를 培養液에서 4日間 培養한 後 培地 1(表1)에 옮겨 26°C의 암상태에서 배양하여 原形質體 배양밀도에 따른 置床 效率를 調査한 것이다.

Table 4. Effects of protoplast densities on the plating efficiency.

| Protoplasts/ml | Plating efficiency |
|-------------------|--------------------|
| 1.0×10^2 | poor |
| 5.0×10^3 | fair |
| 1.4×10^4 | very good |
| 2.0×10^4 | very good |
| 1.5×10^5 | poor |

Table 5. Distribution of calli after 4 weeks culture.

| Callus diameter (mm) | Frequency | |
|----------------------|-----------|-------|
| | No. | % |
| 0 - 0.4 | 12 | 7.1 |
| 0.4 - 0.6 | 16 | 9.5 |
| 0.6 - 0.8 | 23 | 13.7 |
| 0.8 - 1.0 | 39 | 23.2 |
| 1.0 - 1.2 | 48 | 28.6 |
| 1.2 - 1.4 | 22 | 13.1 |
| over 1.4 | 8 | 4.8 |
| | 168 | 100.0 |

表에서 보면 培養密度는 ml당 5×10^3 개는 되어야 하며 1.5×10^5 개에서는 오히려 colony의 形成이 나뉘었다. 이 實驗 結果 $1.4 - 2.0 \times 10^4 / ml$ 정도의 밀도가 效率的인 것으로 나타났다. 培養 2日 後에 細胞隔이 完全히 再生되었고(그림 2), 培養 4日 後에 細胞分裂이 일어나기 시작하였으며(그림 3) 세포분열이 일어남에 따라 葉綠素의 분

포양상이 변하고 세포의 크기도 증가되었다. 세포 분열은 계속되어 배양 2週 후에는 세포덩어리를 형성하였다 (그림 4).

배양 3週 후에 비로서 육안으로 볼 수 있는 colony (그림 5)를 형성하였고 4週 후에는 callus의 직경이 0.8-1.4 mm인 것이 65% 이상에 달하였으며 (그림 6), 이에 대한 분포는 표 5와 같다.

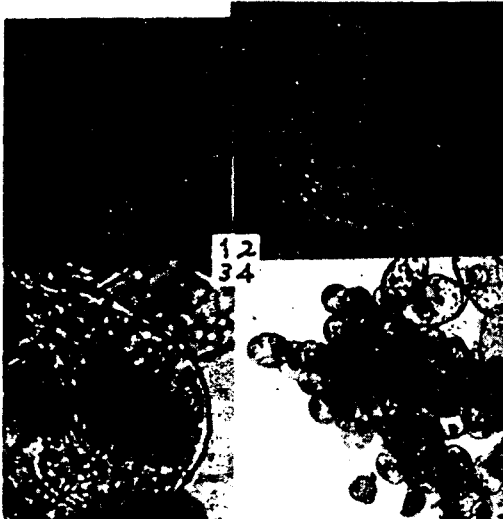


Fig. 1-4. (1) Isolated protoplasts, (2) Regenerated cell wall after 2 days culture, (3) Dividing cell after 4 days culture, (4) cell mass after 2 weeks culture.



Fig. 5-8. (5) Visible calli after 3 weeks, (6) calli growth after 4 weeks culture, (7) calli transferred on shooting medium, (8) Increase of calli 10 days after on shooting medium.

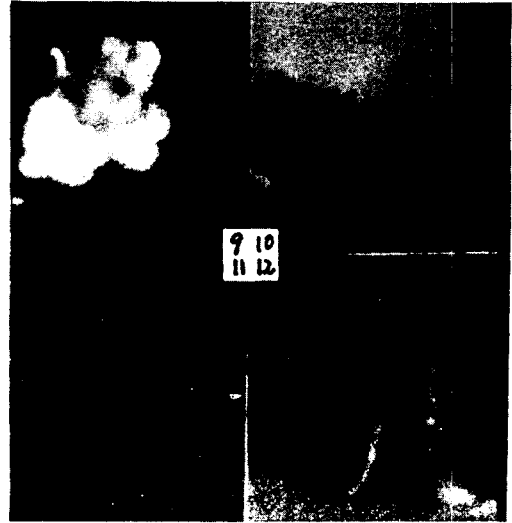


Fig. 9-12. (9) Appearance of bud after 25 days, (10) Formation of shoot-bud, (11) Shoots before transfer on rooting medium, (12) Shoot on rooting medium.

3. 培養培地와 器官分化

培地の 榮養組成을 달리한 4個 培地 (表 1) 에 대한 生長효율을 調査하기 위하여 1.4×10^6 cells/ml의 밀도로 각 배지에 置床하여 培養한 後 5週에 callus의 形成 정도와 크기 및 색택을 調査한 結果는 表 6과 같다. 冑에서 보면 培地 1과 2가 培地 3과 4보다 callus의 크기가 다소 작았으나 全般的인 callus 形成率이 높았다. 培地 1과 2에서 sucrose의 濃度 差異에 대한 反應은 差異가 없었으나 3%인 경우 callus의 크기가 다소 작아진 경향을 나타내었다. 培地 3과 4를 보면 培地 3에서 callus 形成이 좋았는데 이것은 培地 4에서 高濃度의 macro nutrients와 vitamin 使用에 의한 것으로 생각된다.

Table 6. Effects of media on the callus formation

| Media | Callus formation | Callus diameter | Color |
|----------|------------------|-----------------|-----------------|
| Medium 1 | very good | 1.0mm | Yellowish-brown |
| Medium 2 | very good | 0.8mm | light yellow |
| Medium 3 | good | 1.5mm | light green |
| Medium 4 | poor | 1.2mm | light green |

Callus의 직경이 1-1.4 mm 되었을 때 B5 培地에 750 mg/l CaCl_2 , 3% sucrose와 0.9%

agar를 첨가한 배지에 NAA와 BA의 농도를 달리한 shoot 분화 배지에 치상하여 (그림 7) shoot 분화에 대한 영향을 조사한 결과는 표 7과 같다. 置床 10日 후에는 callus의 직경이 2-3 mm로 커졌고 (그림 8), 置床 20日 후에는 7-8 mm로 분화되었으며 置床 25日 후에는 bud가 나타나기 시작하였다. (그림 9) 이후 그림 10에서 보는 것처럼 shoot가 분화되기 시작하여 그림 11에서와 같이 shoot가 뚜렷이 나타나기 시작하였다. Shoot 분화에 미치는 홀몬의 영향을 표 7에서 보면 BA를 2 mg/l로 단독 처리한 경우가 25日 후에 bud 형성이 70%로 제일 높았다. 그러나 시간이 경과함에 따라 NAA를 0.1 mg/l 그리고 BA를 1-2 mg/l로 한 처리 조합에서도 shoot 형성은 차츰 높아 갔다. 따라서 shoot 분화에는 BA 1-2 mg/l 정도면 충분한 것으로 생각된다. Shoot의 길이가 2 cm 정도 되었을 때 (그림 12) 0.9% agar를 첨가한 MS 배지에 置床하여 發根을 시켰고 잎이 4-5枚 되었을 때 pot에 移植 栽培하여 開花 結實을 시켰다. 현재 100여개의 細胞株로부터 種子를 수확하였으며 앞으로 이 들 세포주에 대한 特性, 變異 등을 調査할 計劃이다.

Table 7. Effects of NAA and BA on the shoot differentiation from calli plated on shooting medium.

| Hormone (mg/l) | Diameter of callus (mm) | | Budding (%) | |
|----------------|-------------------------|---------------|-------------|----|
| | After 10 days | After 20 days | | |
| NAA 0.1+BA | 0.5 | 2-3 | 6-7 | 10 |
| | 1.0 | 2-3 | 7-8 | 37 |
| | 2.0 | 2-3 | 6-7 | 40 |
| BA only | 0.5 | 2-3 | 4-5 | 30 |
| | 1.0 | 1-2 | 4-5 | 60 |
| | 2.0 | 1-2 | 3-4 | 70 |

摘 要

遺傳子 再組合 기술을 통하여 유용한 유전자를 細胞內로 이전시키거나 細胞 水準에서 育種選拔을 하기 위한 기술로서 原形質體를 裸出, 培養하고 再分화시키는 過程과 細胞株를 확보하기 위하여 實驗한 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 原形質體 裸出을 위한 일의 表面 消毒은 sodium hypochloride 2%에서 3分間 침지하는 것이 最適이었다.

2. 原形質體 裸出 最適 酵素濃度는 cellulase 2%와 macerozyme 0.5%의 혼용이다.

3. 原形質體의 培養密度는 $1.4 - 2.0 \times 10^4/ml$ 에서 置床效率이 높았다.

4. 培養培地는 培地 1에서 제일 良好하였다.

5. 培養 2日 후에는 細胞隔이 完全히 再生되고 培養 4日 후에는 세포분열이 시작되었다. 培養 2週 후에는 세포 덩어리를 形成하고 3週 후에는 육안으로 볼 수 있는 colony를 형성하였다.

6. Shoot 분화 배지에 置床한 calli는 置床後 25日에 bud가 나타나기 시작하였다. Shoot 분화에는 BA 1-2 mg/l로 첨가한 경우 shoot 분화率이 높았다.

7. 發根은 홀몬이 첨가되지 않은 MS 培地에서 양호하였고 現在 100여 개의 細胞株에서 種子를 수확하였으며 차후 세포주의 特性과 變異性 등을 調査할 計劃이다.

參 考 文 獻

- Cocking, E.C. 1960. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. Nature 187: 962-963.
- Cocking, E.C. 1978. Protoplast culture and somatic hybridisation. In Plant Tissue Cult. Peking. p. 255-263.
- Evans, P.K., A.G. Keates and E.C. Cocking. 1972. Isolation of protoplasts from cereal leaves. Planta 104:178-181.
- Gamborg, O.L., J.P. Shyluk and E.Q. Shahin. 1981. Isolation, fusion and culture of plant protoplasts. In Plant Tissue Culture, Academic Press. pp. 115-154.
- Gamborg, O.L. 1975. Callus and cell culture, eds. Gamborg, O.L. and L.R. Wetter, Plant tissue culture methods, chapter 1.
- Gamborg, O.L., F. Constabel, L.C. Fowke, K.N. Kao, K. Ohyama, K. Kartha and L. Pelcher. 1974. Protoplast and cell culture methods in somatic hybridization in higher plants. Can. J. Genet. Cytol. 16:737-750.
- Gamborg, H.J., K.N. Kao, R.A. Miller and O.L. Gamborg. 1972. Cell division and plant devel-

- opment from protoplasts of cell suspension culture. *Planta* 103:348-355.
8. Lorz, H., I. Potrykus and E. Thomas. 1977. Somatic embryogenesis from tobacco protoplasts. *Naturwissenschaften* 64:439-440.
 9. Pentel, D. and J.E. Gunkel. 1979. Cereals. In *Plant cell and tissue culture*, pp. 633-709. Ohio State Univ. Press.
 10. Ruesink, A.W. and K.W. Thiman. 1966. Protoplast from the *Avena* coleoptile. *Science* 154: 280-281.
 11. Vasil, V. and I.K. Vasil. 1980. Isolation and culture of cereal protoplast. *Theor. Appl. Genet* 56:97-99.
 12. Wakasa, K. 1973. Isolation of protoplasts from various plant organs. *Jap. J. Genetics* 48:279-290.
 13. White, D.W.R. and I.K. Vasil. 1979. Use of amino acid analogue-resistant cell lines for selection of *Nicotiana sylvestris* somatic cell hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 55:107-112.