

## 밀(*Triticum aestivum L.*)의 단세포 배양에 의한 식물체의 재분화

김 시 철 · 김 상 구

(서울대학교 자연과학대학 식물학과)

## Plant Regeneration from Single Cell Culture of Wheat (*Triticum aestivum L.*)

Kim, See Chul and Sang-Gu Kim

(Department of Botany, Seoul National University, Seoul)

### ABSTRACT

Single cells obtained from suspension culture of mature embryo-derived callus in wheat (*Triticum aestivum L.* cv Jang Kwang) were cultured to regenerate into the plantlet. Cell clusters and embryogenic calluses were efficiently developed from when the single cells cultured on the MS medium supplemented with 10  $\mu\text{m}$  2,4-D. Upon transfer to hormone-free MS medium containing 10 mg/l  $\text{AgNO}_3$ , embryogenic calluses gave rise to shoots, probably through somatic embryogenesis.

### 서 롬

식물조직배양을 통한 체세포 재분화에 관한 보고는 총 100여 종의 식물에 달하고 있다. 그러나 재분화된 대부분의 식물은 쌍자엽 식물이었으며 단자엽 식물에서는 극히 일부분의 식물종에서 성공사례가 발표된 바 있다(Binding, 1986).

지난 수년 동안에 단자엽 식물의 조직배양에 대한 꾸준한 연구가 계속되어 단세포 배양 및 원형질체 배양에서도 재분화의 성공사례가 보고되어, 보리, 옥수수, 등 유용작물에서 재분화를 성공시킨 바 있다(Sun *et al.*, 1983; Gaponenko *et al.*, 1988; Wang, 1987).

밀의 경우 출기절편과 근단유래 세포피를 혼탁배양하여 얻은 단세포를 배양하여 처음으로 세포피의 획득에 성공하였다(Shimada *et al.*, 1969). 또한 밀의 근단과 배에서 유래된 칼루스의 배양에서는 뿌리형성의 빈도가 높았으나 shoot 분화는 낮았음을 보고하였다(Bhojwani *et al.*, 1977; Pental and Gunckel, 1980). 이에 반해 잎의 기부 유래 칼루스에서는 shoot의 분화빈도가 높았으나 뿌리 형성의 빈도가 낮은 특징을 보였다(Ahuja *et al.*, 1982). 특히 최근에는 밀 칼루스로부터 체세포배를 유도시키기 위해서  $\text{AgNO}_3$ 를 배양배지에 첨가시킴으로써 재분화의 효율을 높일 수 있었으며(Purnhauser *et al.*, 1987), 미성숙한 배로부터 유리한 원형질체를 배양하여 2개체의 albino shoot를 획득한 바 있다(Hayashi and Shimamoto, 1988).

그러나 밀에서는 아직까지 단세포나 원형질체 배양을 통해 정상의 완전한 식물체를 재분화

시킨 사례는 보고된 바 없으며, 이 분야에 대한 연구가 계속적으로 진행되고 있는 형편이다. 이에 본 연구에서는 밀의 종자로 부터 유도된 칼루스에서 단세포를 유리 및 배양하여 재분화를 유도하고자 하였다.

### 재료 및 방법

**식물재료 및 시약** 밀(*Triticum aestivum L.*) 품종 장광(Jang Kwag)의 종자는 맥류 연구소에서 분양받았다. BAP, 2,4-D, NAA, *myo*-inositol, thiamine · HCl, nicotinic acid, pyridoxine · HCl, AgNO<sub>3</sub>는 Sigma Co.로부터 구입하여 사용하였으며, sucrose는 Junsei Chemical Co.로부터 구입하여 사용하였다.

**칼루스의 유도** 칼루스의 유도를 위해서 Murashige와 Skoog(1962)의 기본 염류에 30g/l sucrose, 100mg/l의 *myo*-inositol, 1mg/l의 thiamine-HCl, 5mg/l의 nicotinic acid 및 0.5mg/l의 pyridoxine · HCl을 첨가하여 사용하였다. 배지의 pH는 1N NaOH를 사용하여 5.8로 조정하였으며 Difco Bacto agar를 0.8%(w/v) 되게 첨가하여 agar를 용해시킨 후 100ml Erlenmeyer 플라스크에 50ml씩 나누어 넣고 121°C에서 15분간 습열멸균하여 사용하였다. 종자는 70% 에탄올에 30초간 소독한 후 1.7% sodium hypochlorite에서 15분간 표면 살균하여 사용하였다. 종자는 다양한 농도(0~20 μM)의 2,4-D가 포함된 MS 배지에 넣고 27°C, 암소에서 발아하는 종자로부터 칼루스를 유도하였다. 유도된 칼루스는 5주 간격으로 계대배양하였다.

**현탁배양** 단세포를 얻기 위하여 현탁배양법을 이용하였다. 현탁배양은 10 μM의 2,4-D가 포함된 MS배지를 250ml Erlenmeyer 플라스크에 50ml 씩 넣어 습열灭균한 후에 잘게 다진 1g의 칼루스를 넣고 27°C 암소에서 100rpm으로 진탕하면서 3일 간격으로 상징액 25ml을 제거하고 새로운 배지를 동량 첨가시키며 광학현미경으로 단세포가 유리되는 것을 관찰하였다. 배양 4~5주 후 배양액을 직경이 각각 200/μm, 100/μm, 및 50/μm나이론 망에 차례로 거른 후 60×<sup>g</sup>로 10분간 원심 분리하여 단세포를 얻었다.

단세포를 배양하기 위한 배지는 10 μM의 2,4-D가 첨가된 MS배지를 사용하였다. 단세포는 hemacytometer(Hausser Scientific Co. USA)를 사용하여  $1 \times 10^5$  cell/ml의 밀도가 되도록 조정하여 직경 60mm의 petri-dish에 3.5ml씩 넣고 parafilm으로 봉하여 27°C 암소에서 배양하였다. 일주일 간격으로 새로운 배지로 갈아주었으며, 세포피가 형성된 후에는 한천배지에 옮겨 배양하였다. 세포피 형성율(plating efficiency)은 밀도  $1 \times 10^5$  cell/ml의 단세포를 semi-solid법을 사용하여 27°C, 암소에서 4주간 배양한 후 형성되는 세포피의 수로 측정하였다(Kim and Kim, 1986). 단세포 배양으로 부터 얻은 세포피는 여러 농도의 NAA와 BAP, 2,4-D와 AgNO<sub>3</sub> 또는 AgNO<sub>3</sub>만을 첨가시킨 MS 한천배지 20ml을 넣어 준 직경 100mm petri-dish에 옮겨 광주기 16시간, 100uEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, 27°C 배양실에서 뿌리와 shoot의 분화를 유도하였다.

### 결 과

**칼루스의 유도** 밀 종자를 MS 한천배지에서 발아시키면서 칼루스를 유도하였다. 칼루스는 어린싹이 나오는 부위에서 동시에 유도되었고 5주 내에 직경 15~25mm의 크기까지 자랐으나 그 후에는 칼루스 주변이 갈색으로 변하며 더 이상 자라지 못했다. 형태와 색에 따라 노란색과

흰색으로 구별되는 두 종류의 칼루스가 관찰되었는데, 노란색의 칼루스는 쉽게 결절되는 특징을 보였으며 흰색의 반투명한 칼루스는 잘 자랐다. 칼루스 형성 4~5주 경과 후 노란색으로 보이는 칼루스를 선택하여 5주 간격으로 계대배양 하였다. 칼루스는  $10\text{ }\mu\text{M}$ 의 2,4-D를 첨가한 배지에서 가장 잘 자랐고,  $20\text{ }\mu\text{M}$ 의 2,4-D가 포함된 배지에서는 잘 자라지 못했으며 2,4-D가  $5\text{ }\mu\text{M}$ 이하 첨가된 배지에서는 모든 칼루스에서 뿌리가 형성되었다.

**현탁배양**  $10\text{ }\mu\text{M}$ 의 2,4-D가 포함된 배지에서 자란 노란색의 칼루스를 현탁배양하였다. 현탁배양 과정 중 광학현미경 하에서 유리된 세포를 관찰하였을 때 두 종류의 세포가 현탁 배양에서 관찰되었다. 한 종류의 세포는 직경  $40\text{ }\mu\text{m}$  크기의 타원형으로 보였고, 또 다른 세포는 직경  $20\sim60\text{ }\mu\text{m}$ , 길이  $100\sim400\text{ }\mu\text{m}$ 의 원통형으로 보였다(Fig. 1A, 1B). 타원형으로 보이눈 세포는 세포분열이 왕성하였기 때문에 현탁배양에서 이 세포의 수를 증가시키기 위해 고체배지로 옮겨 칼루스로 배양시켜 다시 현탁배양을 반복하였다. 이 과정에서 타원형 세포의 수는 처음 현탁배양에서보다 약 30배까지 증가시킬 수 있었다.

**단세포 배양** 현탁배양한 세포를  $200\text{ }\mu\text{m}$ ,  $100\text{ }\mu\text{m}$ ,  $50\text{ }\mu\text{m}$ 의 나일론 망에 차례로 걸러서 단세포를 분리하였다. 분리된 단세포를  $10\text{ }\mu\text{M}$ 의 2,4-D가 첨가된 MS 액체 또는 고체배지에서 배양하였을 때 배양 1주 후에는 세포가 분열하는 것을 관찰할 수 있었으며, 3~4주 후에는 육안으로 식별 가능한 세포피가 형성되었다(Fig. 2A, 2B). 단세포 배양 중 분열하지 않은 세포는 본래의 크기를 유지하거나 부피가 크게 증가하는 것이 관찰되었다. 단세포 배양으로 petri-dish마다 30~40 여개의 단세포 유래의 세포피를 얻을 수 있었는데 다양한 크기의 단일 세포피들은 전형적인 체세포배의 모양을 나타내었다(Fig. 2C). 현탁배양하여 얻은 노란색의 세포피는 2,4-D를 첨가하지 않은 배지로 옮겨 주었을 때 흰색으로 변화되면서 뿌리를 형성하였으며(Fig. 2D), 뿌리를 형성하기 시작하면서부터 세포피의 크기는 점차 작아졌다.  $5\text{ }\mu\text{M}$ 의 2,4-D를 첨가한 배지에서 자란 세포피는 직경  $0.5\sim1\text{ mm}$ 의 크기를 유지하였으며 간혹 뿌리가 관찰되기도 하였다. 한편,  $10\text{ }\mu\text{M}$ 의 2,4-D가 포함된 배지에서는 직경  $1.5\sim2.5\text{ mm}$ 의 크기를 계속 유지하였으며, 세포피의 수도 배양 1주일만에 2배로 증가하였다.

**재분화** 단세포 배양으로부터 얻은 균일한 크기의 세포피를 다양한 농도의 2,4-D +

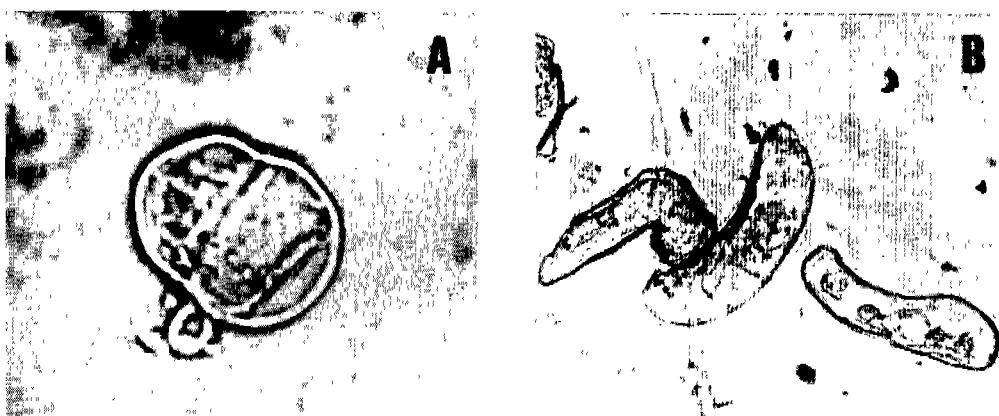
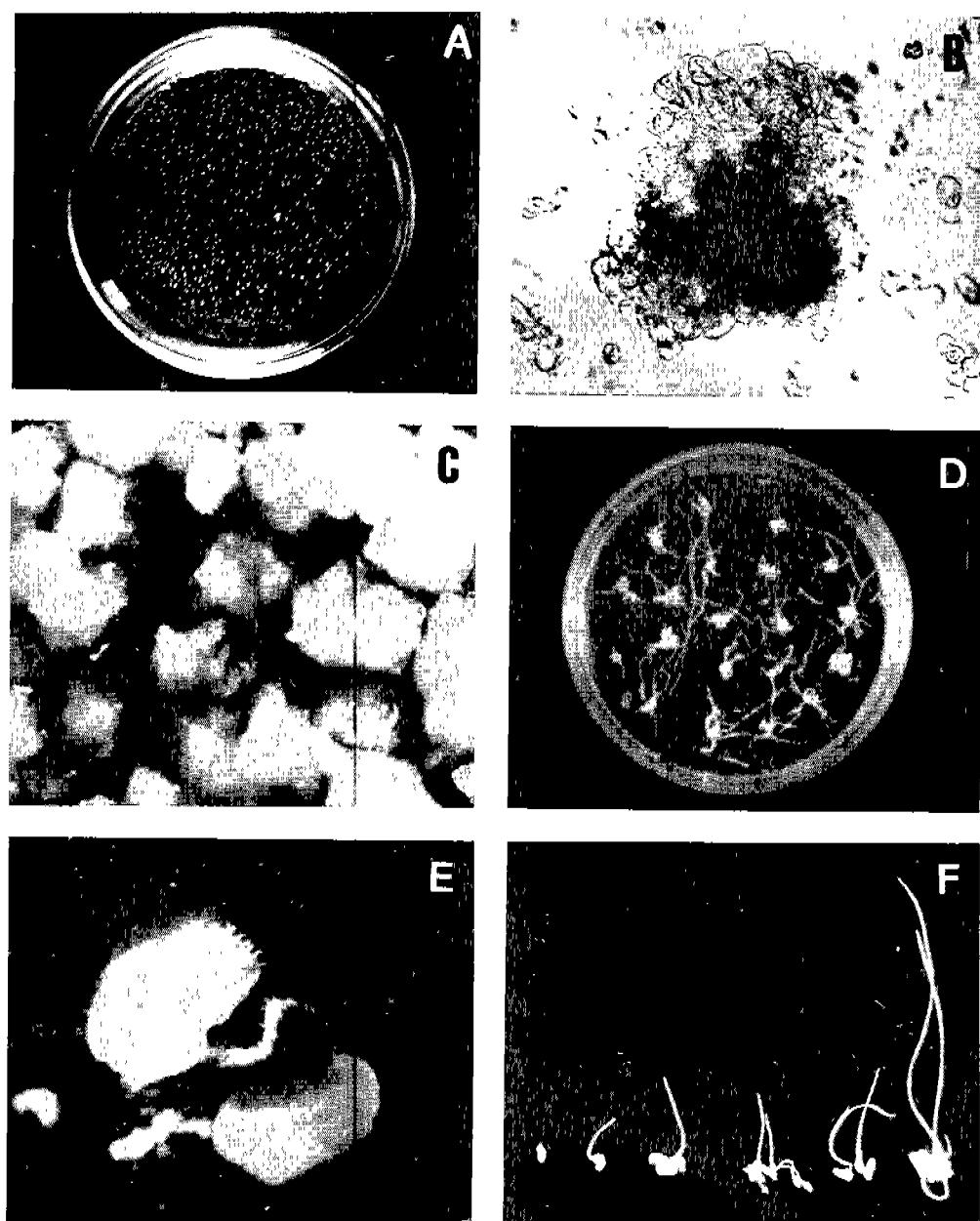
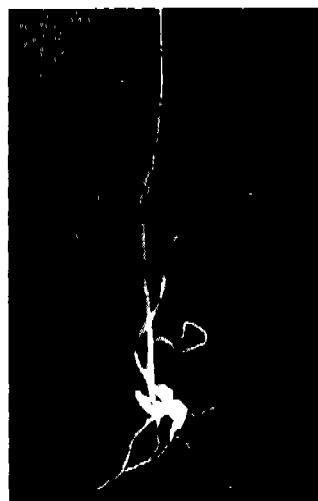


Fig. 1. Two types of single cells obtained from suspension culture of wheat callus, embryogenic (A) and non-embryoogenic cells(B).



**Fig. 2.** Differentiation stages in single cell culture of wheat. A, cell colony after three weeks of culture; B, cell cluster after 3-4 weeks of culture; C, embryogenic calluses on suspension culture; D, root induction from embryogenic calluses E, shoot regeneration from embryogenic calluses; F, serial process of shoot regeneration



**Fig. 3.** Plantlet regeneration from single cell-derived embryogenic callus

**Table 1.** Effect of 2,4-D and AgNO<sub>3</sub> on the shoot and root formation from single cell culture of wheat

| AgNO <sub>3</sub> (mg/1) \ 2,4-D | 0               | 5              | 10 | 20(μM) |
|----------------------------------|-----------------|----------------|----|--------|
| 0                                | 30 <sup>b</sup> | 9 <sup>b</sup> | 0  | 0      |
| 1                                | 2 <sup>c</sup>  | 0              | 0  | 0      |
| 10                               | 22 <sup>c</sup> | 0              | 0  | 0      |
| 50                               | 0               | 0              | 0  | 0      |
| 100                              | 0               | 0              | 0  | 0      |

a. data obtained from the test of 30 embryogenic calluses on each experiment

b. root formation

c. shoot formation

AgNO<sub>3</sub>, 또는 AgNO<sub>3</sub>만을 첨가한 MS배지에 옮겨 배양하면서 shoot의 재분화를 유도하였다. 각 농도당 30개의 세포괴를 실험하였을 때 1mg/1와 10mg/1의 AgNO<sub>3</sub>을 첨가한 배지에서 각각 2개와 22개의 세포괴에서 재분화가 관찰되었다(Table 1, Fig. 2E, 2F). 한편 NAA와 BAP의 다양한 농도에서는 4주내에 green spot를 형성하였으며, green spot의 부위를 중심으로 4~5개의 금은 뿌리의 분화는 있었으나 shoot의 재분화는 없었다. NAA와 BAP에 의해서 형성된 금은 뿌리는 2,4-D에 의해서 생기는 가는 뿌리와 형태적 차이를 나타냈다. Green spot는 3개월간 유지되다 사라졌으며, 세포괴는 계속 자랐다. 세포괴에서 shoot가 재분화될 때 뿌리의 분화는 일어나지 않았기 때문에 재분화된 shoot로부터 뿌리를 유도하기 위하여 호르몬을 넣지 않은 MS배지로 옮겨 뿌리를 유도하였다(Fig. 3).

## 고 칠

밀 종자로부터 유도된 칼루스는 흰색과 노란색으로 식별 가능하였으며 노란색 칼루스는  $10 \mu\text{M}$ 의 2,4-D가 첨가된 MS배지에서 잘 자랐다. 이와 같은 결과는 밀 종자의 발아시에 유도되는 전형적인 칼루스 형태로서 노란색의 칼루스는 체세포 배를 형성하며, 흰색 칼루스는 종종 뿌리를 분화시키나 shoot재분화의 가능성은 없는 세포피로 알려져 있다(Ozias-Akins and Vasil, 1982; Heyser et al., 1985).

벼, 밀, 옥수수와 같은 곡류의 세포배양시에는 타원형과 원통형 등 크게 두 가지 모양의 세포가 관찰되는데 이때 타원형의 세포는 크기가 작고 세포질이 풍부하여 체세포배로 발달한다고 하였다(Shimada et al., 1969; Nabor et al., 1983; Heyser et al., 1985). 본 연구에서도 노란색의 칼루스를 혼탁배양시켰을 때 두 종류의 세포가 관찰되었으며, 또한 타원형의 세포만을 분리하여 단세포 배양을 하였을 때 쉽게 체세포배 모양의 세포피를 얻을 수 있었다.

단자엽 식물의 조직배양시에는 에틸렌 생성이 왕성하기 때문에 shoot 재분화에 장애요인으로 지적되어 왔다. 따라서, 밀의 칼루스로부터 shoot 재분화를 촉진시키기 위해서 에틸렌 생성 억제제인  $\text{AgNO}_3$ 를 배지에 첨가시켰을 때 재분화의 효율을 높일 수 있었기 때문에 (Purnhauscr et al., 1987), 본 실험에서도 이를 적용시켜 연구 하였던 바,  $10\text{mg}/1$ 의  $\text{AgNO}_3$ 를 첨가시켰을 때 전체 30개의 세포피 중에서 22개의 세포피에서 shoot의 재분화를 유도시킬 수 있었기 때문에, 체세포배로부터 shoot의 분화를 위해  $\text{AgNO}_3$ 의 첨가는 효과적임을 뒷받침 할 수 있는 결과로 사료된다.

본 실험에서 관찰한 single shoot는 Ahuja 등(1982)이 밀의 잎 유래 칼루스를 혼탁배양하여 얻은 세포피의 재분화에서 관찰한 shoot와 같은 형태로 발생하였으며, 밀 칼루스에서의 배발생 과정과 유사하였다(Ozias-Akins and Vasil, 1982; Maddock et al., 1983; Gahba and Yamada, 1988). 밀의 단세포배양을 통한 shoot 재분화에 성공한 본연구의 결과는 아직까지 성공하지 못하고 있는 밀의 원형질체 배양의 기초자료로서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 적 요

밀(*Triticum aestivum L.*)품종 장광의 종자로부터 유래된 칼루스를 혼탁배양하여 단세포를 얻었으며, 이를 단세포를 배양하여 재분화 식물체를 얻었다. 밀 종자 유래 칼루스는  $10 \mu\text{M}$ 의 2,4-D를 첨가한 MS배지에서 가장 잘 자랐으며, 이를 칼루스를  $10 \mu\text{M}$ 의 2,4-D가 첨가된 MS배지에서 혼탁배양 하였을 때 분열이 왕성한 타원형의 단세포를 유리하였다. 단세포 배양으로부터 형성된 체세포배는 NAA, BAP 및  $\text{AgNO}_3$ 의 다양한 농도가 포함된 MS배지에서 재분화를 유도하였을 때  $10\text{mg}/1$   $\text{AgNO}_3$ 를 첨가한 MS배지에서 30개의 체세포배 중 22개의 체세포배에서 shoot가 분화되었다.

## 참 고 문 헌

- Ahuja, P. P., D. Pental and E. C. Cocking. 1982. Plant regeneration from leaf base callus and cell suspensions of *Triticum aestivum*. *Z. Pflanzenbau* **89** : 139-144.  
 Bhojwani, S. S. and C. Hayward. 1977. Some observations and comments on tissue culture of wheat. *Z. Pflanzenphysiol.* **85** : 41-47.

- Binding, H. 1986. Regeneration from protoplasts in cell culture and somatic cell genetics of plants(Vasail, I. K. ed.) Vol. . pp. 257-274. Academic Press.
- Gahba, G. and Y. Yamada. 1988. A novel method for increasing the frequency of somatic embryogenesis in wheat tissue culture by NaCl and KCl supplementation. *Plant Cell Reports* 7 : 55-58.
- Gaponenko, A. K., T. F. Fetrova, A. R. Iskakov and A. A. Sozinov. 1988. Cytogenetics of *in vitro* cultured somatic cells and regenerated plants of barley (*Hordeum vulgare L.*) *Theor. Appl. Genet.* 75 : 905-911.
- Hayashi, Y. and K. Shimamoto. 1988. Wheat protoplast culture: embryogenic colony formation from protoplasts. *Plant Cell Reports* 7 : 414-417.
- Heyser, J. W., M. W. Nabors, C. Mackinon, T. A. Dykes, K. J. Demott, D. C. Kautzman and A. Mujecb-Kazi. 1985. Long-term, high frequency plant regeneration and the induction of somatic embryogenesis in callus cultures of wheat(*Triticum aestivum L.*). *Z. Pflanzenzuchtg* 94 : 218-233.
- Kim, S. -G. and D. J. Kim. 1986. Protoplast culture in five cultivars of *N. tabacum L.* by modified Murashige and Skoog medium. *Kor. J. Bot.* 29 : 197-205.
- Maddock, S. E., V. A. Lancaster, R. Risiott and J. Franklin. 1983. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of 25 cultivars of wheat (*Triticum aestivum*). *J. Exp. Bot.* 4 : 915-926.
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.
- Nabor, M. W., J. W. Heyser, T. A. Dykes and K. J. Demot. 1983. Long-duration, high-frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. *Planta* 157 : 85-91.
- Ozias-Akins, P. and I. K. Vasil. 1982. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum L.* (Wheat): Evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma* 110 : 95-105.
- Pental, D. and J. E. Gunckel. 1980. Induction and differentiation of haploid *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring callus initiated from haploid embryos. *Can. J. Bot.* 58 : 741-744.
- Purnhauser, L., P. Medgyesy, M. Czako, P. J. Dix and L. Marton. 1987. Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* viv. tissue cultures using the ethylene inhibitor AgNO<sub>3</sub>. *Plant Cell Reports* 6 : 1-4.
- Shimada, T., T. Sasakuma and K. Tsuncwaki. 1969. *In vitro* culture of wheat tissues. 1. Callus formation, organ redifferentiation and single cell culture. *Can. J. Genet. Cytol.* 11 : 294-304.
- Sun, Z-x., C-z. Zhao, K-1. Zheng, X-f. Qi and Y-p. Fu. 1983. Somaclonal genetics of rice, *Oryza sativa L.* *Theor. Appl. Genet.* 67 : 67-73.
- Wang, A. S. 1987. Callus induction and plant regeneration from maize mature embryos. *Plant Cell Reports* 6 : 60-62.

(1989, 7.15 接受)