

난과 식물의 형질전환 유도 및 다량증식에 관한 연구
(II) 자란의 원형질체 분리, 배양 및 Electroporation

*이 정 석 · 김 영 준 · 황 성 진 · 황 백
전남대학교 생물학과, *임학과

Studies on the Induction of Transformation and Multiplication
in Orchid Plants

(II) Isolation, Culture and Electroporation of Protoplasts in *Bletilla striata*.

Jung Seok Lee*, Young Jun Kim, Sung Jin Hwang, Baik Hwang
Department of Biology, *Department of Forestry,
Chonnam National University, Kwangju, Korea

ABSTRACT

We have investigated influencing factors on viability of *Bletilla striata* protoplasts electroporated in the presence of various electrical conditions. Cultures of embryogenic callus and embryogenic cell suspension were established with immature seeds of *Bletilla striata*.

Viability of electroporated protoplasts was decreased according to the increasing of electroporation voltage and capacitance. An optimal condition of electroporation for viable protoplasts was in HBM buffer at 4°C.

서 론

고등 식물체로의 외래 유전인자 도입을 통한 형질전환된 식물체(transgenic plant)의 유도에 있어서 보다 효율적인 방법의 개발과 응용은 난과식물을 포함한 여러 고등 식물체의 다량증식 뿐만 아니라 식물 유전인자의 발현과 조절에 대한 연구에 널리 이용될 수 있다. 최근에 와서 여러가지 방법들이 제안되어 그중 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 형질전환 유도 방법은 쌍자엽식물 과일부 단자엽 식물에서 이용되고 있으며(1, 2, 3), 대부분 단자엽 식물에 속하는 주요 경제작물에 있어서는 직접 유전인자 전달방식(direct gene transfer)인 PEG(polyethylene glycol) (4-7), electroporation(8-11), particle bombardment(12-14), microinjection(15-17)등과 같은 방법이 외래 유전인자의 도입에 사용되어지고 있다.

Electroporation은 식물 원형질체에 세포막의 구조를 변형시킬 수 있는 적절한 전기적 자극을 주어 형성된 막공(membrane pore)를 통하여 세포내로 외래 유전인자를 삽입시키는 방식으로 이와같은 전기적 자극은 막공(membrane pore)의 형성 뿐만 아니라 세포의 분열을 촉진시키는 효과를 갖는 것으로 알려지고 있다(18, 19). Electroporation을 포함한 직접유전자 전달방식(direct gene transfer)에 있어서는 반드시 전분화능(totipotency)을 갖는 배발생 세포(embryogenic cell)로부터 분리된 원형질체를 사용하므로써 형질전환된 개체의 유도율을 높일 수 있다.

난과식물의 경우 *Bletilla striata*를 포함한 일부 종에서 배발생 캘러스(embryogenic callus)를 유도 증식할 수 있었으며, 이와같은 배발생 캘러스로부터 유식물체를 유도하였다(20-24).

본 연구는 이와같은 연구결과를 토대로 난과식물의 다량증식 및 형질전환 유도에 대한 일련의 연구과정으로서 *Bletilla striata*의 미성숙 종자로부터 배발생 캘러스를 유도하였으며(24), 이의 현탁배양(embryogenic cell suspension culture)을 통하여 이로부터 분리된 원형질체(proto-plasts)를 몇가지 조건하에서 electroporation을 실시하였다. 이와같은 연구결과는 *Bletilla striata*의 원형질체 내로의 외래 유전인자를 효율적으로 도입시킬 수 있을 뿐만 아니라 도입된 유전인자의 발현율을 높일 수 있는 기초자료가 되리라 사료된다.

재료 및 방법

Embryogenic callus의 유도 및 배양

자란(*Bletilla striata*)의 green pod로부터 채취한 미성숙 종자를 3mg/l 2,4-D와 0.5mg/l BAP가 첨가된 VW 배지(25)에 치상하여 이로부터 배발생 캘러스를 유도하였다(24).

유도된 배발생 캘러스는 동일조성의 배지에서 4주간격으로 계대배양(27°C, in dark) 하였으며, 2회 이상 계대배양된 배발생 캘러스를 동일조성의 액체배지로 옮겨 5-6일 간격으로 현탁배양을 행하였다.

Embryogenic callus로 부터 재분화

자란의 미성숙 종자로부터 유도된 배발생 캘러스를 호르몬이 첨가되지 않은 VW배지로 옮겨 체세포배(somatic embryo)의 형성 및 유식물체로의 재분화를 유도하였다.

원형질체의 분리 및 배양

현탁배양 3-4일째 되는 배양세포(embryogenic cell suspensions)에 효소처리 (1.5% cellulase RS, 0.5% dricellase, 1% macerozyme, 0.05% pectolyase Y23, 0.4M mannitol, pH 5.3)하여 4-5시간 유지시킨 후 100, 50, 25 μ m stainless steel meshes로 기른 다음 0.4M mannitol 용액(1mM: CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM MES, 0.2% BSA, 0.4M mannitol, pH 5.3)으로 3회 세척한 후 원형질체 배양배지(VW: 3 mg/l 2,4-D, 0.5mg/l BAP, 0.4M sucrose, pH 5.3)로 1회 세척하고 1 \times 10⁶ protoplasts/ml로 배양 하였다.

Electroporation 및 생존율(viability) 조사

효소 처리에 의해 분리된 원형질체를 electroporation buffer [HBM buffer: 1mM HEPES, pH 7.0, 0.4M mannitol; PHBS buffer: 10mM HEPES, pH 7.0, 150mM

NaCl, 4mM CaCl₂, 0.4M mannitol; HBS buffer: 21mM HEPES, pH 7.0, 137 mM NaCl, 5mM KCl, 0.7mM Na₂HPO₄, 6mM glucose; MaMg buffer: 0.4 M mannitol, 30mM MgCl₂, 0.1% MES, pH 5.8]로 각각 1회 세척하고 제현탁(1 \times 10⁶ protoplasts/ml)시켜 electroporator(BRL Life Sci. Co.) chamber에 500 μ 씩 넣고 voltage와 capacity를 각기 다르게 하여 electroporation 하였다. Electroporation은 4°C와 25°C에서 수행하였으며, 원형질체의 viability는 electroporation이 끝난 원형질체를 4°C에서 10분 정도 유지하고 나서 24시간 후 1% FDA(fluorescein diacetate)용액으로 형광염색하여 UV하에서 원형질체의 생존율을 조사하였다(26).

결과 및 고찰

Embryogenic callus의 유도 및 배양

자란(*Bletilla striata*)의 green pod에서 채취한 미성숙 종자로부터 2주 후 희고 단단한 전형적인 배발생 세포(embryogenic cells)의 특징을 갖는(27) callus가 유기 되었으며(Fig. 1), 이와같은 배발생 캘러스는 동일 조성의 배지에서 지속적으로 증식을 하였다(data not shown). 또한, 고형배지에서 2-3회 계대배양한 배발생 캘러스를 동일조성의 액체배지로 옮겨 현탁배양시 배발생세포(embryogenic cells)의 유아가 가능하였다.

일반적으로 일부 식물의 조직이나 기관으로부터 callus 유도시 외부 형태에 따라 희고 단단한 배발생 캘러스와 부드러운 투명한 모양의 non-embryogenic callus가 동시에 유도되며 이와같은 두가지 형태의 callus는 해부현미경하에서 분리하거나, 또는 현탁배양을 통하여 filtration과 Ficoll gradient centrifuge 등과 같은 방법으로 분리,

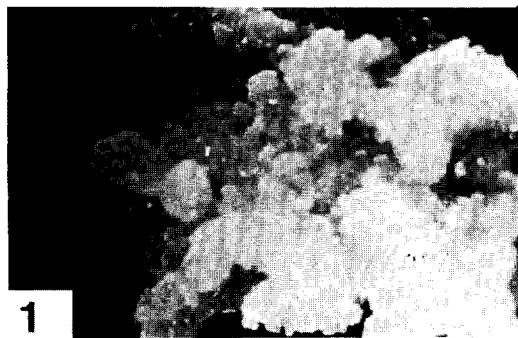


Fig. 1. Embryogenic callus induced from immature seeds in *Bletilla striata*.



Fig. 2-3. Plant regeneration from somatic embryos.

배발생 세포(embryogenic cells)만의 단독 배양이 가능하다(27).

외래 유전인자의 도입에 의한 형질전환 연구에 있어서 뿐만 아니라 식물의 발달과정에 대한 연구에 있어서 이와같이 절분화능(totipotency)을 갖는 배발생 세포는 반드시 필요하다(28).

본 실험 결과 자란의 미성숙 종자로부터 유도된 callus는 대부분 배발생 캘러스의 외형적 특징을 보여 주었으며, 이와같은 배발생 캘러스는 호르몬이 제거된 배지에서 체세포배(somatic embryo)를 형성하였고, 배양 6주 후 유식물체로 분화하였다(Fig. 2, 3). 또한, 이와같이 고형 배지에서 증식된 배발생 캘러스를 동일조성의 액체배지로 옮겨 배양하였을 때 배발생 세포만의 현탁배양(embryogenic cell suspension culture)이 가능하였다.

원형질체 분리 및 electroporation

액체배지에서 현탁배양된 배양세포(embryogenic cell suspensions)에 효소 처리하여 얻은 원형질체는 세포질이 충만하고 비교적 크기가 동일한 전형적인 배발생 세포(embryogenic cells)의 특징을 유지하고 있었다(Fig. 4). 이와같은 원형질체(embryogenic protoplasts)는 electroporation과 같은 직접 유전인자 전달방법(direct gene transfer methods)에 의한 외래 유전인자의 도입에 있어서 반드시 필요하며, 전기적 자극하에서 식물 세포막이 안정적으로 유지할 수 있는 조건하에서 electroporation을 하였을 때 보다 효율적으로 형질전환된 식물체를 유도할 수 있다.

본 실험에서는 자란의 현탁배양 세포로부터 분리된 원형질체로부터 효소액을 제거한 후 electroporation buffer로 1회 세척하고 electroporation chamber에 원형질체 현탁액을 500 μ 씩 넣은 다음 voltage와 capacitancy를 달리하여 electroporation 하였을 때 voltage와 capacitancy가 증가할

에 따라 원형질체의 생존율(viability)은 감소되었다(Fig. 5, 6).

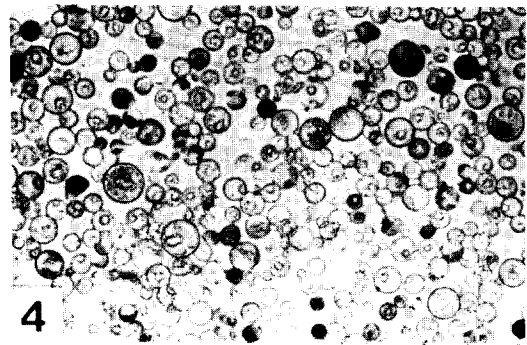


Fig. 4. Isolated protoplasts from embryogenic cell suspensions.

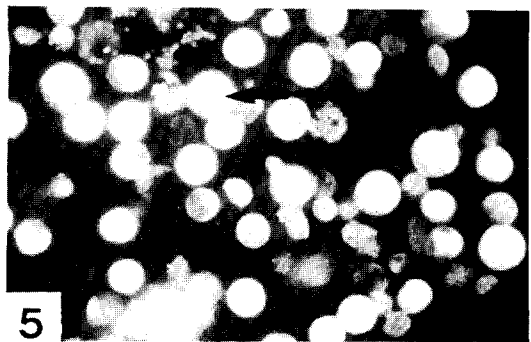


Fig. 5. Protoplasts in the presence of FDA illuminated with UV light. Viable protoplasts are fluorescent(arrow).

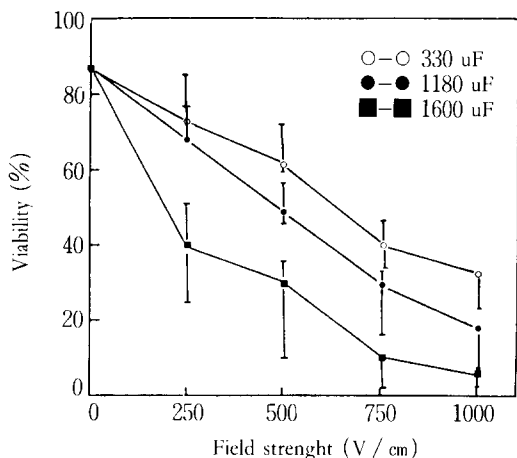


Fig. 6. Effect of increasing the voltage of electroporation on subsequent protoplast viability. Protoplasts viability (viable protoplasts expressed as percentage of intact protoplasts) was measured by FDA staining at 24 hours after electroporation.

Hauptmann 등(29)은 몇가지 단자엽 식물과 쌍자엽 식물의 원형질체에 관한 연구에서 electroporation 시 voltage 와 capacitancy를 증가시키면 pulse length의 증가와 함께 열의 발생으로 세포막의 안정성을 유지시키기 어렵다고 보았다. 이와같은 실험적 사실은 옥수수(30, 31), 벼(32, 26)등에서도 일치되고 있으나, 식물재료, 세포의 age 및 크기, 액포화의 정도 등과같은 요인들에 의해서 또한 차이를 가져올 수 있다(29, 33, 31). 본 실험에 있어서도 배양 3-4일된 세포에 있어서 보다 안정성을 보였으며, 동일한 전기적 자극하에서 자란의 원형질체는 담배나 당근 등의 원형질체에 비하여 유의한 안정성을 보여 주었다. 한편, electroporation buffer는 벼(26)에서와 마찬가지로 low ionic strength buffer인 HBM buffer가 원형질체의 안정성에 보다 효과적이었다(Fig. 7), electroporation 시 온도는 상온에서 보다는 4°C에서 행하는 것이 효과적이었다. Okada 등(34)은 벼의 원형질체에 관한 실험에서 ionic strength를 낮추고 voltage와 pulse를 짧고, 강하게 처리하는게 유전인자의 도입과 원형질체의 생존에 보다 좋은 결과를 가져올 수 있으며, Potter and Leder(35)는 상온에서 보다는 저온에서 electroporation을 수행하는 것이 원형질체의 생존율을 높일 수 있다고 보았다.

적 요

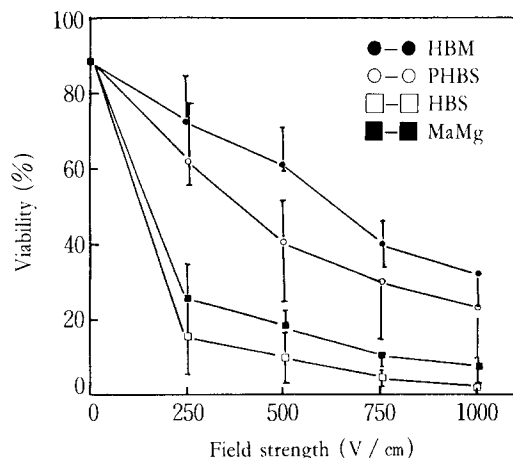


Fig. 7. Effect of electroporation medium at different voltages on protoplast viability.

난과식물의 형질전환 유도의 기초연구로서 자란(*Bletilla striata*)의 미성숙 종자로 부터 embryogenic callus를 유도하고, 이 배발생 클러스의 현탁배양을 하여 이로부터 분리한 원형질체에 여러가지 조건하에서 electroporation을 행하고 원형질체의 생존율(viability)을 조사하였다. Voltage와 capacitancy의 증가에 의해 생존율은 감소를 가져 왔으며, HBM buffer에서 4°C로 electroporation시 원형질체의 생존율에 있어서 안정성을 높일 수 있었다.

감 사

본 연구는 1990년도 교육부 유전공학연구소 학술연구 조성비로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

1. M. W. Bevan and M. D. Killton(1982) *Ann. Rev. Genet.*, **16**, 357
2. P. J. M. Elzen, J. Townsend, K. Y. Lee and J. R. Bedbrook(1985) *Plant Mole. Biol.* **5**,299
3. H. Hatamoto, M. E. Boulter, A. H. Shirsat, E. J. Croy and J. R. Ellis(1990) *Plant Cell Rep.*, **9**, 88
4. J. Paszkowski, R. D. Shilito, M. W. Saul, V. Mandak, T. Hohn, B. Hohn and I. Potrykus (1984) *EMBO J.* **3**, 2717
5. H. Lorz, B. Baker and J. Shell(1985) *Mole. Gen. Genet.*, **199**, 178
6. I. Potrykus, M. W. Saul, J. Petruska, J. Paszkowski

- and R. D. Shilito(1985) *Mole. Gen. Genet.*, **199**, 18
3.
7. C. Mass and W. Werr(1989) *Plant Cell. Rep.*, **8**, 1
48
8. M. Fromm, L. P. Taylor and V. Walbot(1985) *Proc
Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 5824
9. M. Fromm, L. P. Taylor and V. Walbot(1986) *Nature*,
319, 791
10. R. D. Shilito, M. W. Saul, J. Paszkowski, M. Muller
and I. Potrykus(1985) *Bio/Technology*, **3**, 1099
11. K. Lindsey and M. G. K. Jones(1987) *Planta*, **17**
2, 346
12. H. Morikawa, A. Iida and Y. Yamada(1989) *App.
Microbiol. Biotech.*, **31**, 320~321
13. D. Twell, T. M. Klein, M. E. Fromm and S. McCormick
(1989) *Plant Physiol.*, **91**, 1270
14. J. H. Oard, D. F. Paige, J. A. Simmond and T. M.
Gradziel(1990) *Plant Physiol.*, **92**, 334
15. W. A. Lawrence and D. R. Davis(1985) *Plant Cell
Rep.*, **4**, 33
16. M. A. Aly and L. D. Owen(1987) *Plant Cell, Tissue
& Organ Cult.*, **10**, 159
17. S. Joshi and A. M. Vincentini(1990) *Plant Cell Rep.*,
9, 117
18. A. Goldworthy and Rathore, K. S.(1985) *J. Exp.
Bot.*, **36**, 1134
19. P. K. Chand, S. J. Ochatt, E. L. Rech, J. B. Power
and M. R. Davey(1988) *J. Exp. Bot.*, **39**, 1267
20. K. Kukulczanka and U. Wojciechowaka (1983) *Acta.
Hort. Cult.*, **131**, 105
21. C. C. Lin (1986) *Lindleyana*, **1**, 158
22. G. B. Kerbaay (1984) *Plant Cell Rep.*, **3**, 27
23. J. S. Lee, B. Hwang and Y. J. Kim (1990) *Kor. J.
Biotech. Bioeng.*, **5**, 43
24. J. S. Lee, B. Hwang and Y. J. Kim (1991) *Kor. J.
Bot.*, **33**, 271
25. S. Ichihashi(1987) Investigation of Orchids Culture
Media., Proc. World Orchids Hiroshima Symposium,
pp. 60
26. S. J. Hwang and B. Hwang(1991) *Kor. J. Bot.*, **3**
4, 19
27. V. Vasil and I. K. Vasil(1984) In Cell Culture and
Somatic Genetics of Plants, Academic Press, vol. **1**, 3
4-42
28. I. K. Vasil(1988) *Biotech.*, **6**, 397
29. R. M. Hauptmann, P. Ozias Akins, V. Vasil, Z.
Tabaeiz adeh, S. G. Roger, R. B. Horsch, I. K. Vasil
and R. T. Fraley (1987) *Plant Cell Rep.*, **6**, 265
30. R. A. Boston, M. R. Becwar, R. D. Ryan, P. B.
Goldsbrough, B. A. Larkin and T. K. Hodges(198
7) *Plant Physiol.*, **83**, 742
31. Y. W. Haung and E. S. Dennis(1989) *Plant Cell,
Tissue & Organ Cult.*, **18**, 281
32. T. M. Ou-Lee, R. Turgeon and R. Wu(1986) *Proc.
Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6815
33. E. L. Rech, S. J. Ochatt, P. K. Chand, J. B. Power
and M. R. Davey(1987) *Protoplasma*, **141**, 169
34. K. Okada, T. Nagata and I. Takebe (1988) *Plant
Cell Rep.*, **7**, 333
35. H. Potter, L. Weir and P. Leder(1984) *Proc. Natl.
Acad. Sci. USA*, **81**, 7161

(Received; July 25, 1991, Accepted; August 8, 1991)