

양배추 배축 원형질체로부터 식물체 재분화

이연희* · 조현석 · 서석철 · 김호일
농업 유전 공학 연구소

Plant Regeneration from Hypocotyl-Derived Protoplasts of *Brassica oleracea* var. *capitata*

Yeon Hee LEE*, Hyun Suk CHO, Suk Chul SUH, and Ho il KIM

Agricultural Biotechnology Institute, Rural Development Administration, Suwon, 441-707. *Corresponding author.

Protoplasts were isolated from hypocotyl tissues of 5-day-old *Brassica oleracea* var. *capitata* Green Challenger seedlings. Several media were used for protoplast culture and shoot regeneration. The shoot-regeneration capacity of protoplast-derived callus depended on the initial culture medium. Protoplasts were cultured in liquid medium (B5 medium supplemented with CaCl_2 , $2\text{H}_2\text{O}$ 600 mg/L, glucose 20 g/L, D-mannitol 70 g/L, NAA 1 mg/L, BA 1 mg/L, 2,4-D 0.25 mg/L) at 27°C under the dark. After 5 to 10 days, cultures were diluted with medium with a reduced osmotic stabilizer and then transferred to illuminated conditions. The culture medium was changed with the fresh medium at 7- to 10-day-intervals until the formation of microcallus. Hypocotyl protoplast-derived callus proliferated when transferred to MS medium supplemented with NAA 1 mg/L, BA 1 mg/L and GA_3 0.02 mg/L. Upon transfer to MS media with zeatin 3 mg/L, 1.6% T.C. agar, callus gave rise to shoots. When regenerated shoots were transferred to MS basal medium without growth regulators, roots were produced. In an attempt to increase the regeneration frequency, 10 g/L polyvinylpyrrolidone was added to the regeneration medium, but the shoot regeneration was not improved. The regenerated whole plants were acclimated in a sterilized soilless mixture (vermiculite 2: perlite 2: peat moss 1) in a culture room.

Keywords: polyvinylpyrrolidone

Brassica 속은 배추, 평지, 겨자같은 채소작물을 포함하고 있는 경제적으로 중요한 작물이라고 할 수 있다. 이러한 *Brassica* 속 작물의 품질 향상을 위해서 고전적인 육종방법을 대신해서 세포융합, 유용유전자의 형질전환 방법 등이 사용되어지고 있다. 특히 세포융합 방법이 세포질 내의 엽록체나 미토콘드리아에 있는 특성을 타 식물체로 전이하는 데 많이 사용되어지고 있다(Robertson et al., 1987; Jourdan et al., 1989; Sundberg and Glimelius, 1991). 또한 외래 유전자를 도입하는 형질전환에도 polyethylene glycol을 이용하여 원형질체에 DNA를 직접 도입한 보고가 있다(Mukhopadhyay et al., 1991). 이러한 세포융합이나 형질전환에 있어서 필수적이고 기본적으로 필요한 기술은 원형질체로부터 완전한 식물체로의 재분화가 재현성있게 일어나야 한다는 것이다. *B. oleracea* 원형질체로부터의 식물체 재분화에 관한 보고는 다음과 같다. Jourdan 등(1990)이 꽃양

배추 잎 원형질체에서 식물체를 재분화시켜 세포질 특성의 안정성을 보았고 Kao 등(1990)은 브로콜리 배축 원형질체로부터 식물체를 재분화시켰으며 Walter와 Earle (1990)는 꽃양배추와 브로콜리 잎 원형질체에서 feeder layer system을 이용하여 식물체를 재분화시켰고 *B. oerriqter*와 Elsenga (1992)는 꽃양배추와 브로콜리의 배축과 잎 원형질체를 nurse culture system을 사용하여 배양하였다. 또한 Yang 등(1994)은 꽃양배추 화기로 부터 원형질체를 분리하여 식물체를 얻었다. 양배추에서는 Fu 등(1985)과 Nishio 등(1987)이 엽육조직 원형질체로부터 식물체를 재분화 시켰고 Xiong 등(1988)은 엽육조직 원형질체 배양에서 나온 protoclone의 변이를 보았다. 본 실험에서는 양배추 품종 Green Challenger 배축으로부터 원형질체를 분리하고 완전한 식물체를 얻었기에 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

양배추(*Brassica oleracea* var. *capitata*, 'Green Challenger') 종자는 흥농종묘 주식회사에서 분양을 받아 사용하였다. 양배추 품종종자를 70% 에탄올에서 30초간 1차 소독한 후 50% 유한락스 용액에 15-20분 동안 담그어 흔들어 주면서 표면 살균하였다. 살균후 멸균수로 3회 세척한 후 성장조절제가 첨가되지 않은 한천 0.8%의 MS 기본배지(Murashige and Skoog, 1962)에 치상하였다.

원형질체 분리는 발아후 5일된 양배추의 배축을 0.5-1 mm로 절단하여 효소용액에 넣고 27-30°C에서 40 rpm으로 흔들어 주면서 4-5시간 처리하였다. 효소용액은(Cellulase Ono-zuka RS (Yakult Honshu) 1%, Pectolyase Y23 (Seshin Pharmaceuticals) 0.1%를 mannitol 9% 첨가된 CPW 9M 용액(Freearson et al., 1973)에 녹여 pH 5.8로 조정후 사용하였다. 효소처리가 끝난 후 원형질체와 효소 혼합 용액을 62 μ m나 75 μ m 스테인레스체를 통과시켜 15 ml tube에 옮긴 후 700-800 rpm에서 10분간 원심분리하여 원형질체만을 모은 후 CPW 9M 용액을 0.5-1 ml 넣어 흔들어준 다음 21% sucrose가 첨가된 CPW 21S 용액을 6-7 ml 서서히 넣어주어 700-800 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 원심분리후 tube에 있는 용액의 맨 위에 온전한 원형질체만이 있는 밴드가 형성되는데 이 밴드를 pasteur pipette으로 채취하여 CPW 9M 용액으로 1번, 원형질체 배양 배지로 1번 세척하였다. 원형질체 수를 Haemocytometer로 세어 농도를 3.5×10^4 /ml로 조정후 35 mm \times 10 mm petri dish에 1 ml 씩 치상하여 27°C, 암상태에서 5-10일 배양하였다. 이때 원형질체 배양 및 캘러스 형성은 Mukhopadhyay 등(1991)이 꽃양배추 배축 원형질체 배양에 사용한 PC1, PC2와 PC3 배지, Kao 등(1990)이 브로콜리 배축 원형질체 배양시 사용한 K9, F5, F13 배지, Pelletier 등(1983)이 십자화과에서 원형질체 융합시 사용한 B, C, D배지를 사용하였다. PC1, K9, B는 원형질체 초기 배양배지로 PC1, K9은 Kao 배지(Kao, 1977)를 기본으로 한 것이고 B배지는 B5 배지 (Gamborg et al., 1976)를 기본으로 한 것이다. PC2, PC3, F5, F13, C, D는 원형질체 배양시 일정한 간격으로 첨가해 주는 삼투압이 감소된 배지이다. 본 실험에서는 F5 배지의 구성성분인 K3 배지 대신 B5 배지를, E 배지의 호르몬에서 IPA대신 BA를 사용하였다. 각 배지 당 10개의 35 mm \times 10 mm petri dish에 원형질체를 치상하였고 plating efficiency는 초기 원형질체 배양 15일 후에 도립 현미경의 100배 field에서 원형질체 수를 센 다음 분열하고 있는 원형질체 수를 세어 백분율로 하여 계산하였으며 5반복으로 하였다. 배양후 삼투압을 떨어뜨린 배지를 1 ml 첨가한 후 약광하로 옮겨 15-20일 배양한 다음 0.5-1 ml 정도의 배지를 제거 후 삼투압이 더 감소된 배지를 0.5-1 ml 첨가하였다. 30일 정도 더 배양한 후 agarose가 첨가된 고체 배지에 옮겨 캘러스가 직경 1 mm

이상 될 때까지 배양하였다. 직경 1 mm 이상 된 캘러스를 재분화 배지로 옮겨 식물체 재분화를 유도하였다. 식물체 재분화에는 MS 기본배지에 zeatin 1, 3, 5 mg/L, BA 0.5, 1, 2, 3, 5, 10 mg/L, kinetin 1, 3, 5, mg/L, GA₃ 0.02, 0.1 mg/L, NAA 0.1 mg/L를 여러 조합으로 하여 만든 25종류의 배지를 사용하였다. 또한 캘러스의 갈변방지와 재분화율을 향상시키기 위해서 polyvinylpyrrolidone을 10 g/L과 agar농도를 1.6% 재분화 배지에 첨가하여 그 영향을 보았다. 재분화된 shoot는 성장 조절제가 없는 MSO배지에 옮겨 뿌리를 유기하였고 뿌리가 유기된 식물체는 vermiculite(2):perlite(2):peatmoss(1) 비율로 섞인 멸균된 토양에 이식하여 순화시킨 후 포장에서 재배하였다.

결과 및 고찰

양배추 원형질체 배양시 종자에서 발아한지 5일된 배축을 사용한 것은 원형질체 배양에 영향을 줄 수 있는 식물체 자체의 생리적, 환경적인 변이를 최소화 줄일 수 있다는 것과 배축 원형질체는 세포질로 가득차 있어서 분열능력이 왕성하다는 것, 배축 원형질체가 비교적 안정하여 융합이나 형질전환시에 안정하다는 것에 있다(Kao et al., 1990). 양배추 배축 원형질체 배양은 브로콜리와 꽃양배추 배축 원형질체 배양에 이미 사용된 배지를 몇가지 선발하여 사용하였다. 그 결과 Table 1에서와 같이 원형질체 분열능력을 나타내는 plating efficiency는 Kao 배지에 2,4-D 1 mg/L, kinetin 1 mg/L가 첨가된 PC1 배지(Mukhopadhyay et al., 1991)에서 가장 높아서 원형질체 분열 및 캘러스 형성이 잘 되었고, 기본배지가 B5 배지인 B 배지(Pelletier et al., 1983)에서는 52%로 가장 낮았다. 이렇게 각각의 배지에서 형성된 캘러스를 같은 재분화 배지에 옮겨볼때 실제 식물체로의 재분화율은 B 배지에서 원형질체를 배양했을때 가장 높게 나타났다. PC1 배지에서는 원형질체 분열능력과 캘러스 형성이 아주 높게 나타났으나 캘러스의 갈변되는 정도가 심했으며 사용된 어느 재분화 배지 조합에서도 shoot 형성은 되지 않았다. K9 배지(Kao et al., 1990)에서 배양된 원형질체로 부터 형성된 캘러스를 MS 기본배지에 zeatin 1, 3, 5 mg/L, BA 0.5, 1, 2, 3, 5, 10 mg/L, kinetin 1, 3, 5 mg/L, GA₃ 0.02, 0.1 mg/L, NAA 0.1 mg/L를 여러 조합으로 하여 만든 25종류의 재분화 배지로 옮겨 재분화율을 본 결과 Table 2에서와 같이 MSZ 1 (MS + Zeatin 1 mg/L) 배지에서 1%, MSZ 3 (MS + Zeatin 3 mg/L)에서 3%, MSBG (MS + BA 1 mg/L + GA₃ 0.1 mg/L) 배지에서 1%, MSBN (MS + BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L) 배지에서 0.6%의 재분화율을 보였을 뿐 대부분의 재분화 배지에서 shoot 형성은 거의 일어나지 않았다. 반면 B 배지에서 배양된 원형질체 유래 캘러스로부터는 식물체 재분화가 가장 높은 빈도로

Table 1. Plant regeneration from hypocotyl protoplast culture of *B. oleracea* var. *capitata* Green Challenger on different culture and regeneration medium.

Culture medium ^a	Plating efficiency(%) ^b	Regeneration medium ^c	Regeneration frequency(%)
PC1, PC2, PC3	75	MSZ3 2A MSNB 2A	0.003 0.001
K9, F5, F13	63	MSZ3 2A MSNB 2A	4.3 2.0
B, C, D	52	MSZ3 2A MSNB 2A	17.1 8.3

^aPC1, PC2, PC3: Mukhopadhyay et al. (1991)

K9, F5, F13: Kao et al. (1990)

B, C, D: Pelletier et al. (1983)

^bPlating efficiency = $\frac{\text{No. of dividing protoplasts}}{\text{No. of protoplasts plated}} \times 100$.

^cMSZ3 2A: MS + 1% sucrose + 1.6% T.C. agar + zeatin 3 mg/L; MSNB 2A: MS + 1% sucrose + 1.6% T.C. agar + NAA 0.1 mg/L + BA 0.5 mg/L.

Table 2. Plant regeneration from protoplast culture of *B. oleracea* var. *capitata* Green Challenger on the various regeneration medium. K9 medium was used for protoplast culture.

Regeneration medium ^a	No. of callus plated	Regeneration(%)	
		Shoots	Roots
MSZ1 2A	104	1(1.0)	9(8.6)
MSZ3 2A	100	3(3.0)	4(4.0)
MSBG 2A	110	1(1.0)	8(7.2)
MSNB 2A	330	2(0.6)	4(12.1)

^a MSZ1 2A: MS + 1% sucrose + 1.6% T.C. agar + zeatin 1 mg/L;

MSZ3 2A: MS + 1% sucrose + 1.6 % T.C. agar + zeatin 3 mg/L;

MSBG 2A: MS + 1% sucrose + 1.6% T.C. agar + BA 1 mg/L + GA 0.1 mg/L;

MSNB 2A: MS + 1% sucrose + 1.6% T.C. agar + BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L.

일어났다.

Table 3은 B 배지에서 형성된 캘러스로부터 식물체 재분화에 미치는 PVP와 agar 농도의 영향을 보았는데 대체로 agar 농도가 보통의 0.8%보다 2배로 높게 첨가된 1.6%에서 재분화율이 높게 나타났고 PVP 영향은 크지 않은 것으로 나타났다. 이러한 결과로 볼때 원형질체로부터 형성된 캘러스에서 식물체를 재분화 시키는데는 재분화 배지보다는 처음부터 원형질체 배양에 사용된 배지조성과 희석배지, 생장 조절제의 영향이 크다고 할 수 있다. 즉 원형질체 배양의 초기단계가 후의 재분화 능력에 상당한 영향을 끼친다고 할 수 있다. 이러한 현상은 Nishio 등(1987)과 Fransz 등(1991)이 양배추 원형질체 배양에서의 초기단계가 shoot 재

Table 3. Effects of concentration of PVP and agar on plant regeneration of *B. oleracea* var. *capitata* Green Challenger hypocotyl protoplasts.

Culture medium ^a	Regeneration medium ^b	Regeneration frequency(%)
B, C, D	MSZ 3 PVP	8.6
	MSZ 3	9.3
	MSZ 3 2A PVP	17.5
	MSZ 3 2A	26.2
	MSNB PVP	8.0
	MSNB	10.0
	MSNB 2A PVP	6.4
	MSNB 2A	14.0

^aProtoplasts were cultured in medium B, C, D (Pelletier et al. 1983) IPA was replaced by BA in medium E.

^bMSZ 3 PVP: MS + 1% sucrose + PVP 10 g/L + zeatin 3 mg/L + 0.8% T.C. agar;

MSZ 3 2A PVP: MS + 1% sucrose + PVP 10 g/L + zeatin 3 mg/L + 1.6% T.C. agar;

MSZ 3: MS + 1% sucrose + zeatin 3 mg/L + 0.8% T.C. agar;

MSZ 3 2A: MS + 1% sucrose + zeatin 3 mg/L + 1.6% T.C. agar;

MSNB PVP: MS + 1% sucrose + NAA 0.1 mg/L + BA 0.5 mg/L + PVP 10 g/L + 0.8% T.C. agar;

MSNB: MS + 1% sucrose + NAA 0.1 mg/L + BA 0.5 mg/L + 0.8% T.C. agar;

MSNB 2A PVP: MS + 1% sucrose + NAA 0.1 mg/L + BA 0.5 mg/L + PVP 10 g/L + 1.6% T.C. agar;

MSNB 2A: MS + 1 % sucrose + NAA 0.1 mg/L + BA 0.5 mg/L + 1.6% T.C. agar.

분화 능력을 결정한다고 언급한 것과 같다고 할 수 있다.

최초의 양배추 배추 원형질체 분열은 배양 배지에 원형질체를 치상 후 3-5일, 늦게는 7-10일이 지나면 관찰되었으며 이후 분열을 계속하여 약 20-30일 정도가 되면 육안으로 볼 수 있을 정도의 아주 작은 미소 캘러스가 형성된다(Fig. 1, A, B, C). Figure 1의 D는 35 mm × 10 mm petri dish에 치상 후 약 60일 후에 형성된 캘러스로 이미 녹색체가 형성되고 있으며 Figure 1의 E는 65 mm × 15 mm petri dish에서 증식을 하고 있는 캘러스의 모습으로 지름 1 mm 이상 될 때까지 배양한다. Figure 2의 A는 원형질체로부터 형성된 캘러스를 agar 농도가 각각 0.8%(a), 1.6%(b) 첨가된 재분화 배지에 옮긴 후의 캘러스 상태와 shoot 형성을 본 것으로 캘러스의 겉모양이 확연히 다르게 나타났다. 0.8% agar가 첨가된 배지에서 캘러스는 물의 함량이 많아 보이고 재분화 효율도 낮은 반면 agar 농도가 1.6% 첨가된 재분화 배지에서는 캘러스의 겉모습이 부드러운 모습으로 보이는데 이러한 것은 배지내의 water stress의 영향으로 생각된다. 이렇게 형성된 shoot를 뿌리를 유지시키기 위해서 shoot 크기가 1-1.5 cm되면 MSO배지로 옮기게 된다(Fig. 2, B). 뿌리가 유지된 완전한 식물체를 토양에 옮겨 순화를 시켰다(Fig. 2, C). 이렇게 순화된 식물체는 모두 150여 개체로서 현재 재

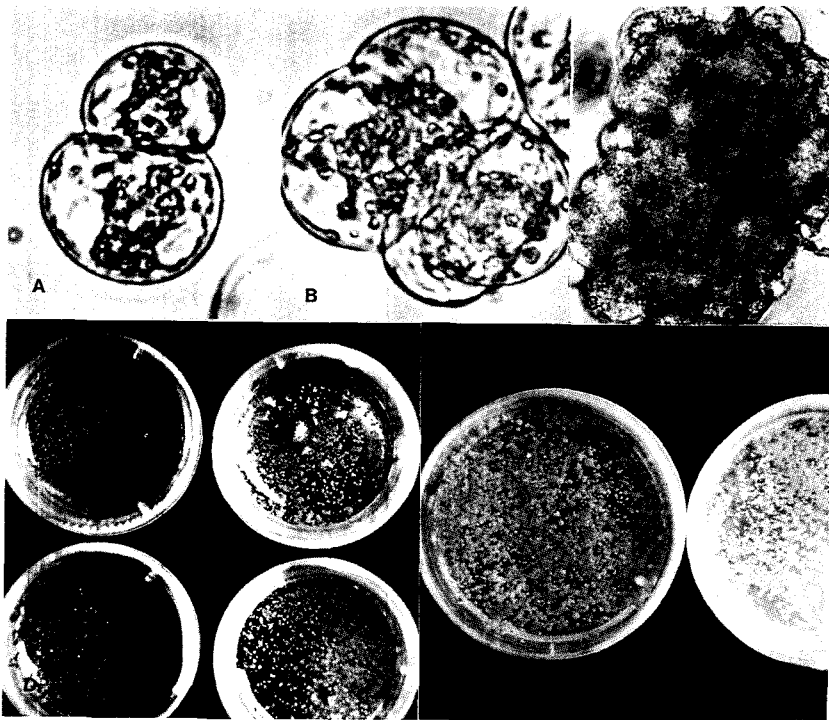


Figure 1. A: Initial division after 7-10 day culture in liquid culture medium; B: Second division; C: Microcallus after several division; D: Microcallus from hypocotyl protoplasts isolated from hypocotyl segments after 60 day culture under the light; E: Hypocotyl Protoplast-derived callus (colony diameter 1 mm or >1 mm) on the proliferation medium.

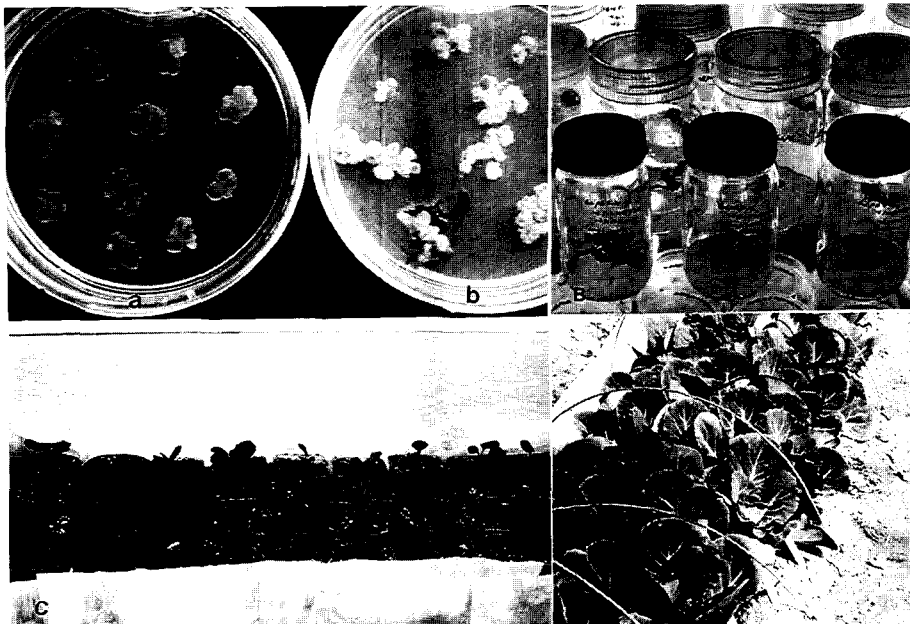


Figure 2. A: Effects of agar concentration on the shoot regeneration. a: Regeneration medium with 0.8% T.C. agar; b: Regeneration medium with 1.6% T.C. agar; B: Transferred shoots for root formation on the MS medium without growth regulators; C: The regenerated whole plants habituated on the sterilized soil in a culture room; D: Cabbage plants regenerated from protoplast culture in the field.

배중에 있다(Fig. 2, D).

양배추 배축 원형질체 배양에 있어서 중요한 점은 처음 5-10일 배양후 삼투압이 감소된 배지를 첨가해 준 후 암상태에서 약광하로 옮기는데 이것이 원형질체 분열을 촉진시켜 주는 것으로 생각된다. 이러한 현상은 Fu 등(1985)이 양배추의 엽육조직 원형질체를 배양시에도 관찰되었던 것과 같은 결과이다. 또한 원형질체 치상농도를 $3.5 \times 10^4/ml$ 로

하여 액체 배양을 하면서 7-10일 간격으로 새로운 배지로 교환해 주어야 한다 그렇지 않을 경우 phenolic compound 같은 물질로 세포들의 갈변정도가 빠르고 심하게 일어남을 관찰할 수 있었다. 재분화 배지에 옮기고 나서 캘러스의 갈변 방지 및 재분화율을 높여보기 위해서 재분화 배지에 PVP를 첨가하여 보았으나 큰 효과가 없게 나타난 것으로 보아(Table 3) 원형질체 최초 배양 후 계속 일정한 간격으

로 새로운 배지로 교환해 주는 것이 갈변방지에 가장 효과적인 것으로 생각된다.

적 요

종자발아 후 5일된 양배추 그린첼린저 배축으로부터 분리된 원형질체로부터 완전한 식물체를 재분화 시켰다. Kao 배지와 B5 배지를 기본으로 한 기존의 몇가지 배지에서 원형질체를 배양한 결과 변형시킨 B5배지에서 plating efficiency는 낮았으나 식물체 재분화율은 가장 높게 나타나 초기의 원형질체 배양배지 조성, 성장조절제 농도 등이 재분화에 상당한 영향을 주는 것으로 나타났다. 또한 사용된 25가지 종류의 재분화 배지중에서 MS배지에 1% sucrose, zeatin 3 mg/L, 1.6% T.C. agar가 첨가된 배지에서 재분화율이 가장 좋았다. 식물체 재분화에 미치는 PVP (polyvinyl polypyrrolidone)와 agar 농도의 영향으로는 PVP는 큰 효과가 없었고 agar 농도를 1.6%로 2배 증가시켰을 때 재분화율이 다소 높아졌다. 현재까지 재분화된 식물체는 150여 개체로서 포장에서 재배중에 있다.

인 용 문 헌

- Boerrigter HS, Elsenga, A (1991) A simple nurse culture system for low density protoplast culture of *Brassica oleracea* L. *Physiol Plant* **82**: A9
- Delpierre N, Boccon-Gibod, J (1992) An extensive hairy root production precedes shoot regeneration in protoplast-derived calli of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Plant Cell Reports* **11**: 351-354
- Franz P, Leunissen E, Zaal M, Kik C (1991) The effect of early culture conditions on protoplast regeneration of different genotypes from *Brassica oleracea* and *Brassica campestris*. *Physiol Plant* **82**: A9
- Frearson EM, Power JB, Cocking EC (1973) The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Developmental Biology* **33**: 130-137
- Fu YY, Jia SR, Lin Y (1985) Plant regeneration from mesophyll protoplast culture of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Theor Appl Genet* **71**: 495-499
- Gamborg OL, Murashige T, Yhorpe TA, Vasil IK (1976) Plant tissue culture media. *In Vitro* **12**: 473-478
- Glimelius K (1984) High growth rate and regeneration capacity of hypocotyl protoplasts in some Brassicaceae. *Physiol Plant* **61**: 38-44
- Jourdan PS, Earle ED, Mutschler MA (1990) Improved protoplast culture and stability of cytoplasmic traits in plants regenerated from leaf protoplasts of cauliflower (*Brassica oleracea* ssp. *botrytis*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **21**: 227-236
- Kao HM, Keller WA, Gleddie S, Brown GG (1990) Efficient plant regeneration from hypocotyl protoplasts of broccoli (*Brassica oleracea* L. ssp. *italica* Plenck). *Plant Cell Reports* **9**: 311-315
- Kao KN (1977) Chromosomal behavior in somatic hybrids of soybean-Nicotiana glauca. *Molecular and General Genetics* **150**: 225-230
- Mukhopadhyay A, Topfer R, Pradhan AK, Sodhi YS, Steinbis HH, Schell J, Pental D (1991) Efficient regeneration of *Brassica oleracea* hypocotyl protoplasts and high frequency genetic transformation by direct DNA uptake. *Plant Cell Reports* **10**: 375-379
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497
- Nishio T, Yamagishi H, Takayanagi K (1987) Shoot regeneration capacity destined by early stage of protoplast culture in cabbage. *Japan J Breed* **37**: 22-28
- Pelletier G, Primard C, Vedel F, Chetrit P, Reny R, Rousselle, Renard M (1983) Intergeneric cytoplasmic hybridization in cruciferae by protoplast fusion. *Mol Gen Genet* **191**: 244-250
- Walters TW, Earle ED (1990) A simple, versatile feeder layer system for *Brassica oleracea* protoplast culture. *Plant Cell Reports* **9**: 316-319
- Xiong Xs, Jia SR, Fu YY (1988) Protoclonal variation in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). *Acta Horticulturae Sinica* **15**: 2 120-124
- Yang ZN, Xu ZH, Wei ZM (1994) Cauliflower inflorescence protoplast culture and plant regeneration. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **36**: 2 191-195

(1994년 12월 21일 접수)