식물조직배양학회지 제22권 제5호
Korean J. Plant Tissue Culture
Vol. 22, No. 5, 277~281 (1995)

# *Arabidopsis thaliana*의 엽육세포 원형질체배양에 미치는 칼슘이온의 영향

박현용
조선대학교 자연과학대학 생물학과

# Effect of Calcium Ion on Mesophyll Protoplast Culture of *Arabidopsis thaliana*

Hyeon-Yong PARK
Department of Biology, Chosun University, Kwangju, 501-759

**The present study was performed to investigate the effect of calcium ion on the mesophyll protoplast culture of *Arabidopsis thaliana*. The mesophyll protoplasts were isolated and cultured on an IMH medium supplemented with $CaCl_2$ of various concentrations. When the protoplasts were cultured on the medium containing 0 to 12.5 mM $CaCl_2$, extreme vacuolization occurred without cell division. When the protoplasts were cultured with higher levels of $CaCl_2$ up to 50 mM, vacuolization decreased dose-dependently, and the number of plasma-rich cells increased. Cell division was induced when the protoplasts were cultured on the medium with $CaCl_2$ higher than 25 mM. The highest plating efficiency (5-6%) was obtained with 50 mM $CaCl_2$. However, the plating efficiency was markedly inhibited by 100 mM $CaCl_2$ or above. These results suggest that the relatively high concentration (50 mM) of calcium ion may be required for the culture of protoplasts.**

**Key words: vacuolization**

식물세포에서 칼슘의 작용은 오랜 기간 연구되어 왔으며, 식물세포내로의 칼슘의 흡수는 능동수송계를 통하여 이루어지는 것으로 알려져 있다(Hepler, 1988). 칼슘은 세포막을 통하여 세포 밖으로 혹은 미토콘드리아, 소포체, 액포내로 이동하면서 세포의 신호전달(signal transduction)에 관여하는 것으로 생각되고 있다(Schroeder and Thuleau, 1991). 칼슘이온은 극성 생장, 가스교환의 조절, 분비 및 빛이나 phytohormone에 의해 조절되는 생장과 발달 등 식물세포내 주요 생리작용에 중요한 역할을 담당하고 있다(Hepler and Wayne, 1985 ; Schroeder and Thuleau, 1991). 특히 세포질과 세포막에 존재하는 단백질인 calmodulin은 칼슘이온과 결합하여 활성화된 형태로 전환된 후, proteinkinase, $Ca^{2+}$-ATPase, NAD-kinase 등과 같은 여러 효소들의 effector로서 작용하며(Allan and Trewavas, 1987), 세포분열 과정에서 핵분열과 세포벽 형성에 중요한 역할을 하는 미세소관의 방향 및 위치선정 등에 많은 영향을 나타낸다(Hepler 1989). 세포벽의 재생은 분리한 원형질체로부터 세포분열로 이어지는 과정중의 전제 조건인데, 이때 중요한 역할을 하는 1,3-$\beta$-glucansynthase는 $Ca^{2+}$에 의해 그 활성이 조절된다(Kauss 1987, Koehle et al., 1985).

이러한 여러 증거들로 보아 세포배양에서 칼슘이온이 대단히 중요한 역할을 할 것이라는 사실에는 의심할 여지가 없다. 실제로 *Daucus carota*의 현탁배양에서 칼슘 농도를 높였을 때 체세포배발생이 현저하게 증가하는 현상이 관찰된 바 있으며(Jansen et al. 1990), 이러한 결과로 미루어 칼슘이온이 식물의 생장조절에 "second messenger"로서 작용할 것이라는 추측이 가능하게 되었다(Bush and Jones, 1990).

*Arabidopsis thaliana*는 *Brassicaceae*에 속하며, genome의 크기가 작고, 다른 고등식물에 비해 식물체의 크기가 현저히 작다는 점, 한 세대의 기간이 짧다는 점 등의 연구에 용이한 장점들을 지니고 있다(Koorneef et al., 1987). 이러한 여러 장점들 때문에 *Arabidopsis*는 고등식물의 기초연구인 생리, 유전 등 많은 연구에 이용되고 있다(Shirley et al., 1992 ; Palme et al. 1992 ; Damm and Willmitzer 1989 ; Karesch et al., 1991). 이처럼 *Arabidopsis*가 식물의 생리, 유전, 분자생물학적 연구에 많이 이용되고 있지만 이 식물의 원형질체배양의 방법에 관한 보고는 소수에 불과하다. 또한 칼슘이온은 원형질체배양에서 일반적으로 원형질체의 안정

화를 위하여 주로 사용되고 있으나 칼슘이온이 원형질체배양에 미치는 직접적인 영향에 대한 연구는 별로 보고된 바 없다. 따라서 본 연구는 *Arabidopsis*의 원형질체에서 세포분열과 콜로니의 형성에 미치는 칼슘이온의 효과를 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료식물

재료식물인 *Arabidopsis thaliana* L. (cv Landberg Erecta)의 종자를 4%의 sodium hypochloride에 3분간 표면 살균한 후, 2차증류 살균수로 3회 세척하여 1/2MS 배지(0.8% agar) 위에 파종하였다. 식물의 생육은 17°C, 10시간 광조건(70 $\mu$ E/m2s) 14시간의 암조건하에서 무균배양을 하였다. 4-5주 생장한 총생형 식물의 위쪽 0.5-1 cm 크기의 잎을 원형질체 분리에 사용하였다.

### 원형질체의 분리 및 배양

채취한 잎조직에서 먼저 두꺼운 엽맥을 제거하고 0.5-1 mm 크기로 자른 후 1%의 cellulase (Onozuka R-10, Yakult Honsha), 0.25% macerozyme (R-10, Yakult Honsha) 및 osmoticum (0.3 M glucose ± 50 mM $CaCl_2$)으로 조성한 효소용액에 침지시켜 26°C의 암조건에서 3-4 시간 처리하였다. 이어서 50 $\mu$m nylon sieve에서 잔존하는 조직들을 제거한 후 7분 동안 75×g에서 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 가라앉은 원형질체에 2 ml의 세척액(0.4 M sucrose, 0.1 M glucose ± $CaCl_2$)을 주입한 후 조심스럽게 희석하였다. 준비된 4 ml의 분리용액(0.3 M sucrose, 0.2 M glucose, 20% percoll) 위에 2 ml의 원형질체 현탁액을 층을 이루도록 조심스럽게 주입한 후 10분 동안 비중차 원심분리(density gradient centrifugation)를 450×g에서 수행하였다. 비중이 다른 두 용액 사이의 중간층에 형성된 원형질체를 분리하여 실험에 사용하였다.

분리한 원형질체는 2.5 $\mu$M 2,4-D, 0.5 $\mu$M BAP, 0.3 M sucrose, 0.1 M glucose가 첨가된 Imbrie-Milligan과 Hodges (1986)의 변형된 IMH 배지 (대량원소, 미량원소, vitamine, diverse sugars, proline, ± $CaCl_2$, pH 5.5)를 5 ml 넣은 배양접시(직경 6 cm)에 원형질체를 넣어 4-5×$10^4$/ml 밀도로 희석한 후 26°C에서 암배양하였다.

### 칼슘이온의 영향

원형질체를 $CaCl_2$ (sigma co. USA)의 투여시기와 농도를 달리한 IMH 배지에 2주 동안 배양한 후 세포분열 및 콜로니의 형성과정 등을 관찰하였다. 먼저 효소용액에 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 mM의 $CaCl_2$를 첨가하여 3-4 시간 동안 소화시킨 후 원형질체를 분리하였다. 각 처리군에서 분리한 원형질체의 배양조건으로는, 칼슘이온을 전혀 첨가하지 않은 효소용액에서 분리한 원형질체를 다시 7가지 서로 다른 칼슘이온 농도(0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 mM)가 첨가된 배지에 배양시키고, 나머지 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 mM의 칼슘이온 농도를 첨가한 효소용액에서 분리한 원형질체도 각각 동일하게 배양시켜 총 49가지의 배양조건에서 원형질체배양을 수행하였다. 각각의 경우 동일한 조건 2개의 배양접시에 배양하였으며, 각 배양접시에서 2일마다 200개의 세포를 관찰하였다. 이와 같은 동일한 실험을 2회 반복하였다. 각 배양배지에 투여한 $CaCl_2$의 농도에 따라 glucose와 sucrose의 농도를 달리하여 최종적인 osmolarity는 650 mOs로 조정하였다. 배양후 각 배양배지에서 3, 5, 7, 9, 11, 13일에 세포 형태, 세포분열 시기 및 효율, 그리고 콜로니 형성 정도를 조사하였다.

## 결과 및 고찰

원형질체 배양에 미치는 칼슘이온의 영향을 조사하기 위하여 각 처리별 4개의 배양접시에서, 배양접시당 200개의 세포(각 처리당 총 800개의 세포)를 죽은 세포, 생존세포, 분열세포로 구분 조사하여 Table 1과 같이 나타내었다. 12.5 mM 이하의 칼슘이온 농도에서는 전혀 세포분열이 일어나지 않았으며, 특히 대조군에서는 극히 심한 액포화 현상이 나타났다. 각 농도별 차이점으로는 0 mM에 비하여 6.25 mM이, 6.25 mM에 비하여 12.5 mM에서 세포의 액포화현상이 적었고 세포들은 더 오랜 배양 기간 동안 생존하였다. 또한 12.5 mM 까지 칼슘이온 농도를 높일 수록 plasma rich cell의 비율이 높아졌으며 분열세포는 12.5 mM에서 아주 낮은 비율(<0.1%)로 나타났지만 곧 사멸하였다(Figure 1c).

분열세포는 25 mM에서부터 높은 비율로 나타났으며(4-5%), 50 mM에서 가장 높은 평판효율(plating efficiency) (6.0%)을 나타냈다. 분열세포들이 콜로니를 형성하는 정도도 농도에 따라 차이를 보였다. 즉 25 mM에 비하여 50 mM에서 콜로니의 성장이 약간 빠르게 진행되었으며, 콜로니를 구성하는 각 세포도 50 mM에서 더욱 밀집된 형태를 나타냈다(Figure 1d, e). 그러나 100 mM의 칼슘농도에서는 세포분열율이 현저히 낮아졌으며, 아주 느린 속도로 형성된 콜로니는 더욱 밀집된 형태를 보였으나 생장을 지속하지 못하고 배양 시작 약 3주 후에는 모든 세포들이 고사하였다 (Figure 1f). 더우기 200 mM의 농도에서는 세포분열과 콜로니를 전혀 관찰할 수 없었다.

칼슘이온을 원형질체 분리와 배양에 첨가했던 배양군과 배양배지에만 첨가했던 배양군과의 사이에서 나타나는 차

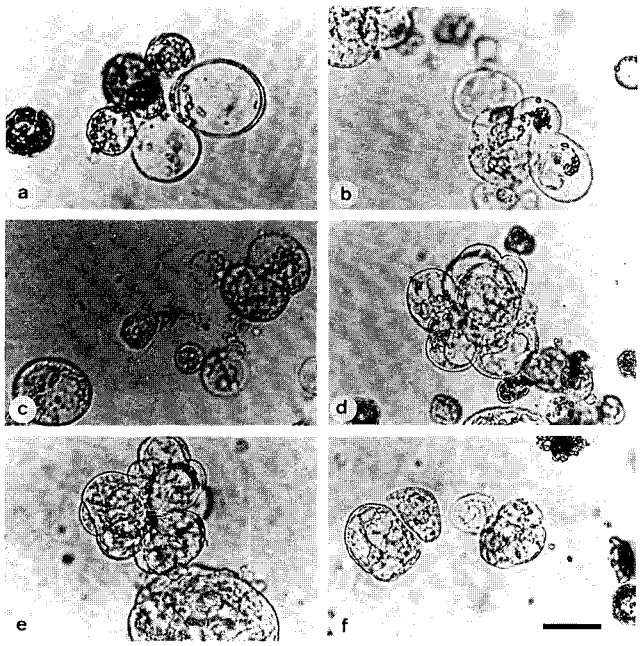


**Figure 1.** Feature of microcallus formation depending on various calcium concentrations in the early protoplast culture. Cells were cultured in IMH medium containing various $CaCl_2$ concentrations for 11 days. a, Highly vacuolized cells in a medium without calcium ion; b, Vacuolized cells in a medium containing 6.25 mM calcium ion; c, The occurrence of cell division in a medium containing 12.5 mM calcium ion; d and e, The occurrence of normal cell division and microcallus formation in a medium containing 25 mM (d) and 50 mM (e) calcium ion; f, Compact microcallus in a medium containing 100 mM calcium ion. Bar; 50 μm.

이점은 Table 1에서 보는 바와 같이 13일 후에 나타나는 세포분열률에는 커다란 차이점을 보이지 않았지만 세포분열이 시작하는 시기와 콜로니의 형성에서 뚜렷한 차이를 보였다. 대조군에서는 배양 시작 7일 후 90% 이상의 세포들이, 9일 후에는 전체의 세포가 사멸하였다. 0 mM에서 원형질체를 분리한 후 6.25 mM 농도로 $CaCl_2$를 첨가한 배지에서 배양을 한 경우는 세포들의 생존 기간이 약 4일 길어졌으나 세포분열은 전혀 관찰되지 않았다. 0 mM에서 분리한 후 배양배지에 12.5 mM 첨가한 배지에서는 세포의 생존 기간이 2일 정도 길어 지면서 9일 후에 최초로 0.6%의 세포분열률을 나타냈다. 하지만 이 분열세포들은 매우 액포화된 4-6개의 세포로 이루어진 콜로니를 형성하였지만 계속하여 생장하지 않고 13일 후 대부분이 사멸하여 더 이상 관찰할 수 없었다. *Arabidopsis*의 원형질체배양에 가장 효과적인 $CaCl_2$의 농도는 효소용액과 배양배지에 각각 25, 50 mM $CaCl_2$ 농도로 첨가했을 경우였다(Table 1).

원형질체 분리시 $CaCl_2$의 농도에 따른 세포분열이나 콜로니 형성 정도는 배양 시작후 13일이 경과했을 때에 거의 비슷했다. 그러나 저농도에서는 큰 세포들로 이루어진 느슨한 형태의 콜로니가 형성되었으며(Figure 2), 25-50 mM의

**Table 1.** Effect of various calcium-concentrations in cell wall hydrolytic enzyme solution (ES) and culture medium (CM) on the protoplast culture of *Arabidopsis thaliana*.

| Calcium conc [mM] | | Plating efficiency[a] | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ES | CM[b] | 3 | 5 | 7 | 9 | 11 | 13 (Days) |
| 0 | 0 | + | + | − | − | − | − |
| | 6.25 | + | + | + | + | + | − |
| | 12.5 | + | + | + | 0.6 | 0.2 | + |
| | 25 | + | 0.2 | 2.6 | 4.6 | 4.6 | 5.0 |
| | 50 | + | + | 2.2 | 5.6 | 5.6 | 5.6 |
| | 100 | + | + | + | 0.4 | 0.2 | 0.4 |
| | 200 | + | + | + | − | − | − |
| 6.25 | 0 | + | + | − | − | − | − |
| | 6.25 | + | + | + | + | − | − |
| | 12.5 | + | + | + | + | − | − |
| | 25 | + | 0.2 | 1.8 | 3.0 | 5.6 | 5.6 |
| | 50 | + | + | 3.4 | 3.8 | 4.6 | 4.6 |
| | 100 | + | + | + | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| | 200 | + | + | − | − | − | − |
| 12.5 | 0 | + | + | − | − | − | − |
| | 6.25 | + | + | + | + | − | − |
| | 12.5 | + | + | + | + | + | − |
| | 25 | + | 0.2 | 1.6 | 3.4 | 4.8 | 5.0 |
| | 50 | + | + | 2.6 | 5.0 | 5.8 | 5.8 |
| | 100 | + | + | + | + | − | − |
| | 200 | + | + | + | + | − | − |
| 25 | 0 | + | + | − | − | − | − |
| | 6.25 | + | + | + | + | − | − |
| | 12.5 | + | + | + | + | − | − |
| | 25 | + | 0.2 | 1.8 | 3.2 | 3.8 | 4.0 |
| | 50 | + | 0.8 | 1.2 | 3.2 | 5.8 | 6.2 |
| | 100 | + | + | + | + | − | − |
| | 200 | + | + | + | − | − | − |
| 50 | 0 | + | + | − | − | − | − |
| | 6.25 | + | + | + | + | − | − |
| | 12.5 | + | + | + | + | − | − |
| | 25 | + | + | 2.2 | 2.6 | 3.4 | 4.6 |
| | 50 | + | + | 2.4 | 3.2 | 5.2 | 6.2 |
| | 100 | + | + | + | − | − | − |
| | 200 | + | + | + | − | − | − |
| 100 | 0 | + | + | − | − | − | − |
| | 6.25 | + | + | + | + | − | − |
| | 12.5 | + | + | + | + | − | − |
| | 25 | + | + | 0.8 | 0.4 | 0.4 | 0.2 |
| | 50 | + | + | 0.4 | 0.8 | 3.0 | 3.0 |
| | 100 | + | + | + | − | − | − |
| | 200 | + | + | + | − | − | − |

[a]Numbers indicate plating efficiency (%).

[b]+, more than 8% lived cells, but not observed divided cells: −, less than 8% lived cells.

$CaCl_2$가 함유된 배지에서 배양하면 서서히 정상적인 콜로니로 변화하였다. 100 mM 농도의 $CaCl_2$에서 분리한 원형질체를 25-50 mM 농도의 배지에 배양했을 때에도 세포분열률은 급격히 저하되었다. 원형질체를 분리하는 동안 100

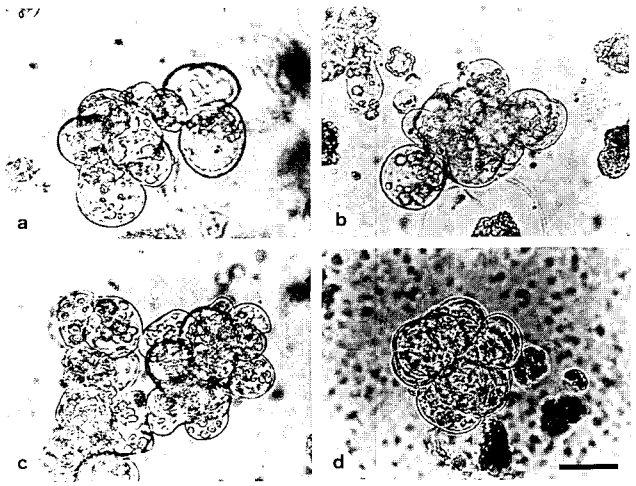


Figure 2. Microcallus formation from protoplasts. Protoplasts were isolated in the enzyme solution containing various concentrations of $CaCl_2$ and cultured in IMH medium containing 50 mM $CaCl_2$ for 13 days. a, Microcallus derived from isolated protoplast in the enzyme solution without calcium ion ; b-d, Microcallus from isolated protopast in the digestive enzyme solution containing 6.25 mM(b), 12.5 mM(c) and 50 mM(d) calcium ion. Bar; 50 μm.

mM 이상의 $CaCl_2$를 투여했을 경우 원형질체의 생존기간이 더욱 짧아졌다. 전체적으로 효소용액과 배양배지의 $CaCl_2$ 농도를 25-50 mM로 하였을 때 가장 높은 세포분열율과 효과적인 콜로니의 형성을 보였다.

본 연구결과에서 보는 바와 같이 *Arabidopsis*의 원형질체 배양에서 칼슘이온은 원형질체 분리와 배양 시작 후 첫번째 세포분열과 미세캘러스 형성에 많은 영향을 미치고 있음을 확인하였다. 실험결과에서 나타난 바와 같이 칼슘이온 농도를 25-50 mM로 높였을 때 세포분열이 유도되었다. 현재 일반적으로 이용하고 있는 배지인 MS와 IMH 배지 등에도 2-3 mM의 칼슘이온이 포함되어 있지만 이 농도는 본 실험결과 세포분열이 유도되지 않는 농도임을 확인하였다. 따라서 본 연구 결과에서 보여주는 바와 같이 기존 배지와 비교하여 20배 이상의 높은 농도인 25-50 mM의 칼슘이온을 배지에 첨가할 때 높은 평판효율을 얻을 수 있음을 알 수 있다. Hahm과 Saunders (1991)는 cytokinin (BA)과 $Ca^{2+}$과의 관계를 Funaria에서 실험한 결과, BA와 $Ca^{2+}$을 동시에 배지에 투여했을 때 세포내의 칼슘이온의 농도가 정상 세포에 비해 3배나 증가하였으며, 이러한 세포내의 칼슘농도 증가는 생장조절제의 처리를 통해 나타나는 여러 생리적 반응의 첫 단계라는 사실을 제시한 바 있다.

따라서 원형질체의 분리과정과 배양에서 나타내는 칼슘이온의 전체적인 영향은, 첫째 높은 칼슘이온의 공급은 이미 원형질체 분리과정에서 원형질체의 안정화에 크게 기여하며, 둘째 배양 초기에 원형질체 세포벽의 재생을 촉진시켜 원형질체의 온전한 세포로의 재생을 돕고, 셋째 배지에 투여했던 생장조절제의 활성조절을 통하여 체세포를 분열세포로 재분화하여 세포분열과 콜로니의 형성을 촉진하는 것으로 추측된다.

## 적 요

칼슘이온의 농도가 *Arabidopsis thaliana*의 원형질체배양에 미치는 영향을 조사하기 위해 *Arabidopsis thaliana*의 원형질체를 분리하여 서로 다른 농도의 CaCl2를 첨가한 IMH 배지에서 배양하면서 나타나는 현상을 관찰하였다. 대조군과 12.5 mM 이하의 농도에서는 배양세포들이 심하게 액포화되었으며 세포분열은 관찰되지 않았다. 0-50 mM 범위의 농도에서는 농도의 증가와 비례하여 세포의 액포화가 적었으며 이에 반하여 plasma rich cell의 비율은 높아졌다. 세포분열의 유도는 25 mM 이상의 농도에서 관찰되었고 50 mM에서 가장 높은 평판효율(5-6%)을 나타내었다. 그러나 100 mM 이상의 농도에서는 뚜렷한 저해효과를 나타내었다. 칼슘이온의 투여 시기가 세포분열과 콜로니 형성과정에 미치는 영향을 조사하기 위하여 서로 다른 농도의 칼슘이온을 각각 원형질체 분리용액과 배양액에 투여하고 배양한 결과, 투여 시기에 따른 영향은 콜로니의 형성과정에 다소 차이를 보였다. 이처럼 높은 칼슘 농도가 원형질체 배양시 요구되는 것은 원형질체가 배지로부터 생장조절물질을 흡수하여 재분화하는 과정에서 칼슘이온이 중요한 조절작용을 하기 때문인 것으로 추측된다.

사 사 - 본 연구는 한국 과학재단 '95 특정연구과제 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

## 인 용 문 헌

**Bush DS, Jones RL** (1990) Measuring intracelluar $Ca^{2+}$ levels in plant cells using the fluorescent probes, Indo-1 and Fura-2. Plant Physiol **93**: 841-845.

**Hahm SH, Saunders MJ** (1991) Cytokinin increases intracelluar $Ca^{2+}$ in *Funaria*: Detection with Indo-1. Cell Calcium **12**: 675-681.

**Hepler PK** (1989) Calcium transients during mitosis: observations in flux. J. Cell Biology **109**: 103-110.

**Hepler PK, Wayne RO** (1985) Calcium and plant development. Ann Rev Plant Physiol **36**: 397-439.

**Imbri-Milligan CW, Hodges TK** (1986) Microcallus formation from maize protoplasts prepared from embryogenic callus. Planta **168**: 395-401.

**Jansen MAK, Booij H, Schel, JHN, de Vries SC** (1990) Calcium increases the yield of somatic embryos in carrot embryogenic

suspension cultures. Plant Cell Reports **9**: 221-223.

**Kauss H** (1987) Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism. Ann Rev Plant Physiol **38**: 147-172.

**Koehle H, Jeblick W, Poten F, Blaschek W, Kauss H** (1985) Chitosan-elicited callose synthesis in soybean cells as a $Ca^{++}$-dependent process. Plant Physiol **77**: 544-555.

**Schroeder JI, Thuleau P** (1991) $Ca^{++}$channels in higher plant cells. Plant Cell **3**: 555-559.

**Shirley BW, Hanley S, Goodman HM** (1992) Effect of ionzing radiation on a plant genome: Analysis of two Arabidopsis transparent testa mutations. Plant Cell **4**: 333-347.

(1995년 9월 24일 접수)