

철이온이 *Arabidopsis thaliana* 초기 원형질체배양의 세포분열 및 미세 캘러스 성장에 미치는 효과

박현용

조선대학교 자연과학대학 생물학과

Effect of Iron Ion on Cell Division and Microcallus Growth in Mesophyll Protoplast Cultures of *Arabidopsis thaliana*

Hyeon-Yong Park

Department of Biology, Chosun University, Kwangju, 501-759

This study was performed to investigate the effect of iron ion on the mesophyll protoplast culture of *Arabidopsis thaliana*. Mesophyll protoplasts were isolated and cultured in a modified IMH medium supplemented with various concentrations of Fe-EDTA. Relatively low concentration of Fe-EDTA (<0.02 mM) induced the low level (4.8%) of cell division. In addition, the cell division and microcallus growth were dose-dependently stimulated by 0 to 1 mM of Fe-EDTA. In 0.5 to 1 mM concentration range of Fe-EDTA, microcolonies were readily formed and the plating efficiency (8.5%) also showed maximal rate. However, more than 1 mM of Fe-EDTA inhibited the initial growth of protoplasts. The overall results suggest that Fe^{2+} -ion concentration plays an important role at the early developmental stage of protoplast regeneration.

Key words: Fe-EDTA, protoplast culture

철이온은 녹색식물의 성장에 필수적인 원소로서 특히, 엽록체와 미토콘드리아에 주로 분포하며, 엽록소의 합성과 광합성 및 호흡에 관여하는 여러 효소단백질 및 전자전달체인 catalase, peroxidase, nitrogenase와 cytochromes, ferredoxine 등과 같은 물질의 구성요소이다.

Fe^{3+} 는 토양에서 주로 복합체 형태로 존재하기 때문에 먼지 뿌리의 표면에서 $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$ 로 환원되어 흡수된 후 다시 물관에서 citrate 등과 같은 chelate와 함께 복합체를 이루어 이동하는 것으로 밝혀져 있다(Chaney et al., 1972). 한편 인위적으로 조합한 배지를 이용한 조직배양의 경우 철이온은 배지에 함유된 phosphate와 결합하여 용해하기 힘든 철 복합체를 이루어 침전되기 때문에 배양세포나 조직이 흡수할 수 없다(Viskot and Bezdek, 1984). 따라서 배양중에 있는 식물조직은 이온상태보다 chelate와 복합체를 이룬 형태의 철이온 흡수가 용이하기 때문에 철이온과 EDTA나 EGTA 등과 같은 적당한 chelate와 복합체를 형성시킨 후 배지에 첨가하여 사용하는 것이 효과적이다(Klein and Manos, 1960). 이러한 철복합체가 식물의 조직배양에 미치는 영향

의 하나로 Heberle-bors (1980)는 *Nicotiana tabacum*의 약배양에 Fe-EDTA를 첨가한 결과 반수체 식물의 형성이 증가하는 효과를 관찰하였다. 또한 *Nicotiana*의 화분배양에서 chelate 분자인 EDTA를 첨가한 결과 재분화가 촉진된다는 보고도 있다(Kyo and Harada, 1986, 1990).

이와 같이 철이온은 식물의 다양한 생리기작에 주요한 기능을 담당하고 있기 때문에, 식물의 조직배양에서 철이온이 재분화 또는 세포분열 등에 영향을 미치리라는 것은 확실하다. 그러나 이에 대한 철이온의 구체적인 효과와 조직배양시 사용해야할 적합한 농도에 대한 연구는 대단히 미흡한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 철이온의 농도가 원형질체배양에 미치는 영향, 즉 세포분열과 미세캘러스의 형성 등에 적합한 철이온 농도 등을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

재료식물

재료식물의 파종은 *Arabidopsis thaliana* L. (cv Landberg Erecta)의 종자를 4%의 sodium hypochlorite에 3분간 표면살균한 후, 2차중류살균수에서 3회 세척하여 1/2 MS배지(1/2 MS salts, 1/2 MS vitamine, 0.1 g/L inositol, 10 g/L sucrose, 0.8% agar, pH 6.0)위에 파종하였다. 식물의 생육은 17°C, 10 시간 광주조건($70 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), 14 시간 암조건의 환경조건 하에서 무균배양 하였다. 4-5주 성장한 총생형 식물체의 위쪽 0.5-1 cm 크기의 잎을 취하여 원형질체를 분리하였다.

원형질체의 분리 및 배양

원형질체 분리는 먼저 잎조직을 0.5-1×5 mm 크기로 자른 후 1%의 cellulase (Onozuka R-10), 0.25% Macerozyme 및 osmoticum (0.3 M glucose, 0.2 M sucrose, 50 mM CaCl₂, pH 5.5)으로 조합한 소화효소용액에 침지시켜 26°C 암조건에서 3-4시간 동안 소화시켰다. 70-80%가 소화된 잎조직은 50 μm nylon sieve에서 잔존하는 조직들을 제거한 후 7분 동안 75×g의 속도로 원심분리하였다. 그 후 상등액을 제거하고 가라앉은 원형질체에 2 mL의 세척액(0.4 M sucrose, 0.1 M glucose)을 주입한 후 조심스럽게 희석하였다. 원형질체 현탁액은 Loerz 등(1981)이 실행했던 percoll을 이용한 비중차원심분리 방법(density gradient centrifugation)을 변형하여 원형질체를 선별하였다. 준비된 4 mL의 분리용액(0.3 M sucrose, 0.2 M glucose, 50 mM CaCl₂, 20% percoll, pH 5.5) 위에 2 mL의 원형질체 현탁액을 층을 이루도록 조심스럽게 주입한 후 10분 동안 450×g에서 비중차 원심분리를 수행하였다. 비중이 다른 두 용액 사이의 중간층에 형성된 원형질체를 분리하여 실험에 사용하였다.

분리한 원형질체는 변형 Imbri-Milligan과 Hodges (1986)의 IMH 배지를 macro-elements, micro-elements, vitamine, diverse sugars, proline, 50 mM CaCl₂, 2.5 μM 2,4-D, 0.5 μM BAP, 0.3 M sucrose, 0.1 M glucose, pH 5.5로 조정한 5 mL의 배지가 든 배양접시(직경 6 cm)에 4-5×10⁴ protoplasts/mL의 밀도로 희석한 후 26°C에서 암배양하였다.

Fe-EDTA 및 EDTA의 영향

Fe-EDTA를 첨가한 후 배양중에 나타나는 세포의 상태 및 세포분열 등을 관찰하기 위하여, Fe-EDTA는 첫 실험에서 각각 0, 0.004, 0.02, 0.1, 0.5, 2.5 mM의 농도로 첨가하였고, 두번째 실험에서는 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mM의 농도로 첨가하여 원형질체를 배양시킨 후 13일 동안 나타나는 Fe-EDTA의 영향을 관찰하였다. 또한 배양중에 나타나는 Fe-EDTA의 영향이 철이온에 의한 것인지 혹은 chelate로 사용했던 EDTA (ethylen diamine tetra-acetic acid)로부터 비롯된 효과인지를 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행

하였다. 먼저 각 배지에 동일한 농도인 0.1 mM의 Fe-EDTA를 첨가한 후, 다시 이들 각 배지에 EDTA를 0, 0.1, 0.3, 0.7, 1.5, 3.1 mM 농도로 첨가하여 실험을 수행하였다.

서로 다른 농도의 Fe-EDTA 및 EDTA로 조성한 각 배지마다 2개의 배양접시에 배양하였으며, 세포분열률은 배양접시에서 5 곳을 무작위로 선정한 후 현미경 시야범위 내에 존재하는 약 150-200개의 세포를 각 배양접시에서 관찰하여 총 2000여개의 세포로부터 평균값으로 나타냈다. 이와 같은 동일한 실험을 2회 반복하였다. 세포분열 및 미세캘러스 생장은 역광현미경(Zeiss IM 35)을 이용하여 관찰하였으며, 배양 시작후 8, 12일째에 대부분의 미세캘러스가 나타내는 중간 크기를 선정하여 역광현미경 200× 배율로 사진촬영하여 비교하였다.

결 과

*Arabidopsis*의 원형질체를 배양하는 동안 세포분열에 미치는 철이온의 영향을 알아보기 위하여 서로 다른 농도의 Fe-EDTA를 첨가한 후 세포분열의 시작 시기와 세포분열률을 관찰하였다. 먼저, 0, 0.004, 0.02, 0.1, 0.5, 2.5 mM의 Fe-EDTA를 첨가한 후 나타나는 세포분열률을 Figure 1A에 나타내었다.

Figure 1A에서 보는 바와 같이 대조군에서는 세포분열이 전혀 일어나지 않았으며, 0.004, 0.02 mM의 Fe-EDTA 농도에서는 1.4%의 낮은 분열률이 관찰되었고, 세포분열은 8일째에 처음 관찰되었다. 그러나 철이온의 농도를 5배 증가시킨 0.1 mM Fe-EDTA 농도에서는 분열률이 4.2%로 높아졌고 처음 세포분열이 6일째에 관찰되었으며, 0.5 mM에서는 분열률이 7.2%로 증가됨과 동시에 5일째에 이미 분열세포가 관찰되었다. 이러한 분열세포에서 0.5 mM까지는 농도의 증가와 함께 미세캘러스의 성장이 뚜렷하게 빨라지는 것이 관찰되었다. 그러나 0.5 mM 이상의 높은 농도 즉, 2.5 mM에서는 분열률이 현저히 낮아지면서 미세캘러스의 성장 또한 느리게 진행되었다.

Figure 1A에 나타난 바와 같이 세포분열과 미세캘러스의 형성정도가 0.5 mM의 높은 Fe-EDTA 농도에서 가장 효과적으로 나타났기 때문에 좀더 세밀한 농도효과를 알아보기 위하여 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mM의 Fe-EDTA를 첨가한 배지에서 비교실험을 실시하였다. 가장 높은 세포분열률은 0.5-1 mM에서 나타났으며(8.4-8.6%), 이 농도보다 더 높거나(3-2%) 낮은(4.4-4.8%) Fe-EDTA 농도에서는 농도에 비례하여 분열률이 낮아졌다(Figure 1B). Figure 2에서 보는 바와 같이 배양 12일 후에 생성된 미세캘러스는 1 mM (Figure 2d)에서 가장 빠른 성장을 보였으며, 다음은 0.5 mM (Figure 2c)에서 그리고 그보다 높거나 낮은 농도에서는 미세캘러스의 성장이 현저히 느리게 진행되었다. Fe-

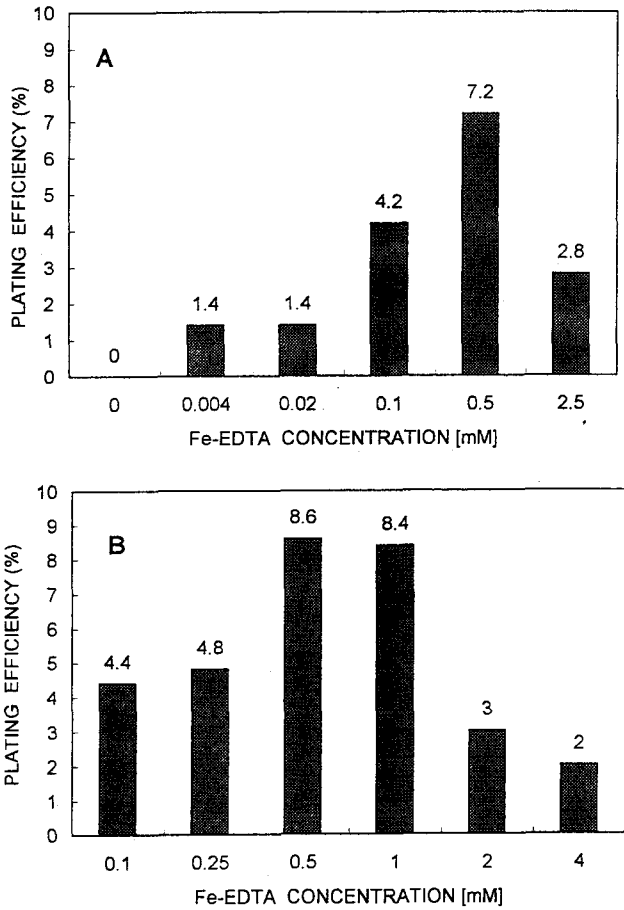


Figure 1. Plating efficiency of the protoplast of *Arabidopsis thaliana*. The protoplasts were cultured in IMH medium containing various concentrations of Fe-EDTA. The plating efficiency was calculated at the 13-day culture.

EDTA 농도에 따른 미세캘러스의 생장은 배양 12일 후 0.1 mM에서 100-110 μm (Figure 2a), 0.25 mM에서 150 μm (Figure 2b), 0.5 mM에서 180 μm (Figure 2c), 1 mM에서는 220 μm (Figure 2d)의 크기를 나타냈다. 그러나 이러한 Fe-EDTA 농도의 증가에 따른 미세캘러스의 성장속도는 2 mM에서 다시 170 μm (Figure 2e), 4 mM에서 70 μm (Figure 2f) 크기로 현저하게 감소하였으며, 세포분열률도 3-2%로 나타났다(Figure 1B). 이러한 결과가 실제 철이온에 의한 효과인지 EDTA에 의한 효과인지를 규명하기 위하여 배양배지에 각각 0.1 mM의 Fe-EDTA와 EDTA의 농도를 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 mM로 첨가한 후 세포의 양상과 세포분열률을 조사하였다(Table 1과 Figure 3). Table 1에 제시된 바와 같이 0.1 mM의 Fe-EDTA만을 첨가했던 대조군에서는 4.8%의 세포분열률을 보였고, EDTA의 농도를 0.2 mM로 배가하였을 경우 0.2%로 세포분열률이 현저히 감소하였다. 0.2 mM에서 나타난 분열세포들은 배양을 계속하는 동안 단지 느슨한 형태의 미세캘러스를 나타냈으며 밀집된

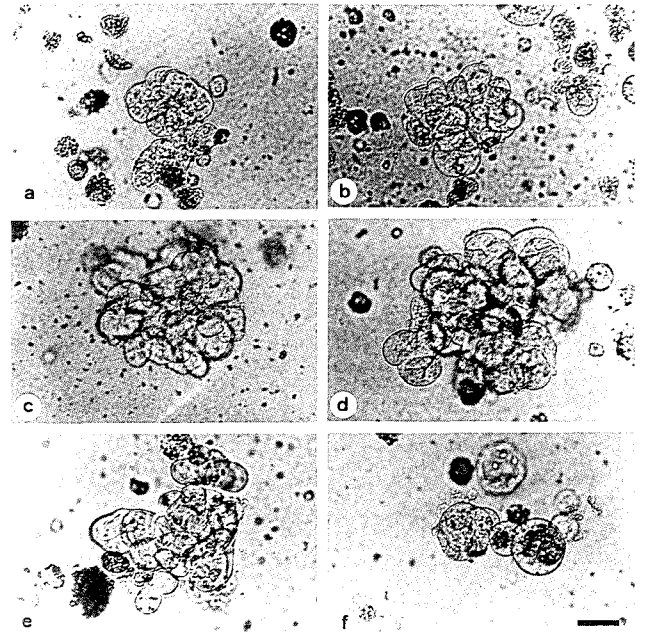


Figure 2. Effect of various Fe-EDTA concentrations on microcallus formation after 12-day culture. a, 0.1 mM Fe-EDTA; b, 0.25 mM Fe-EDTA; c, 0.5 mM Fe-EDTA; d, 1 mM Fe-EDTA; e, 2 mM Fe-EDTA; f, 4 mM Fe-EDTA. Optimal growth of microcallus showed in IMH medium containing 1 mM Fe-EDTA. Bar indicates 50 μm .

Table 1. Effect of various EDTA concentrations on the protoplast culture in IMH medium

EDTA conc [mM]	Days in culture					
	3	5	7	9	11	13
0.1	+ ^a	0.6	3.2	4.4	4.6	4.8
0.2	+	0.6	0.4	0.2	0.2	0.2
0.4	+	+	+	-	-	-
0.8	+	+	+	-	-	-
1.6	+	+	-	-	-	-
3.2	+	+	-	-	-	-

^a+, more than 8% lived cells, but not observed divided cells; -, less than 8% lived cells. Numbers indicate plating efficiency (%).

형태의 미세캘러스로의 지속적인 생장은 보이지 않았다(Figure 3). EDTA의 농도를 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 mM로 배가하였을 때 세포분열은 전혀 관찰되지 않았으며, 배양세포들은 배양기간이 지속되면서 극단적으로 액포화 되었고 EDTA 농도의 배가와 함께 세포의 생존기간 또한 단축되었다.

고 찰

조직 및 세포배양에서 사용되고 있는 필수원소인 철이온

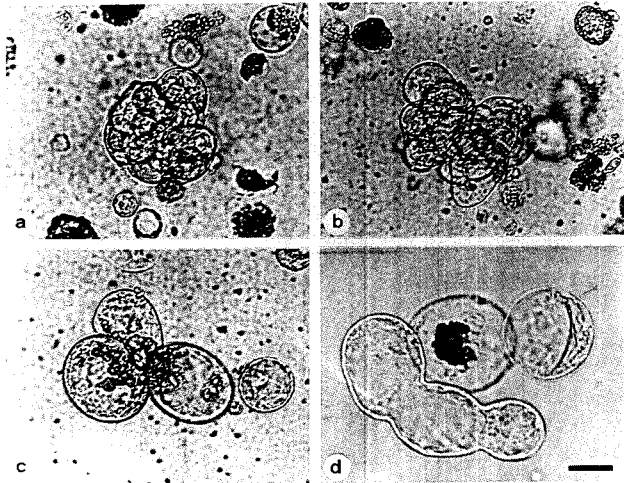


Figure 3. Effect of additional EDTA concentration on microcallus formation. a, 0.1 mM Fe-EDTA; b, 0.1 mM Fe-EDTA + 0.1 mM EDTA; c, 0.1 mM Fe-EDTA + 0.3 mM EDTA; d, 0.1 mM Fe-EDTA + 0.7 mM EDTA. Bar indicates 50 μ m.

의 농도가 세포분열과 미세캘러스의 형성과정에 미치는 영향을 조사하기 위하여 *A. thaliana*의 원형질체배양을 통하여 얻은 본 연구의 결과는 현재 일반적으로 사용되고 있는 배지들에 비교하여 높은 농도인 1 mM에서 세포분열이 높아지고 미세캘러스의 생장이 촉진되는 것으로 드러났다. 본 실험에서 사용한 IMH 배지에 함유되어 있는 Fe-EDTA의 농도는 지금까지 많이 사용하고 있는 MS (Murashige and Skoog, 1962), B5 (Gamborg, Miller and Ojima, 1968), Nitsch (Nitsch and Nitsch, 1969) 배지 등이 0.1 mM을 포함하고 있는데 비하여 0.02 mM를 함유하고 있다. 0.02 mM의 Fe-EDTA 농도에서는 원형질체 배양에서 아주 낮은 세포분열률(1.4%)을 나타냈으며, 다른 일반적인 배지에 포함하고 있는 농도인 0.1-0.25 mM에서는 세포분열률이 상승하였지만 여전히 2-3%로 낮았다. 본 연구 결과에서 나타난 것처럼 0-1 mM까지는 농도를 높일수록 세포분열률이 상승됨은 물론 미세캘러스의 성장 또한 빠르게 진행됨을 알 수 있었다.

철이온의 결핍은 배양세포나 혹은 식물에서 생리적인 병리현상(특히 엽록체의 합성과정에서)을 야기시키며, 과량의 철이온은 독성작용을 나타내는 것으로 보고되고 있다 (Viskot and Bezdek, 1984). 그러나 본 연구의 실험결과에서는 0.5-1 mM의 농도에서 가장 높은 84-86%의 세포분열률을 보였다. 이는 MS 배지보다 5-10배, IMH 배지에 비교하여 25-50배의 농도에 해당하는 것이며, 독성작용은 1 mM 이상의 농도에서 나타났다.

실험에 이용했던 Fe-EDTA 분자의 EDTA가 배양과정에서 나타낼 수 있는 영향에 대한 실험결과, 0.1 mM의 Fe-EDTA를 첨가했던 대조군에 비교하여 0.2 mM의 EDTA를 첨가했던 배지에서는 이미 현저한 세포분열의 억

제를 관찰하였으며, 0.4 mM과 그 이상의 EDTA 농도에서는 세포분열이 완전히 정지되었다. 따라서 실험에 사용했던 Fe-EDTA가 세포배양에 나타내는 효과는 Fe에 의한 것이라는 것을 확신할 수 있다. 이와 같은 결과는 Kyo (1990), Kyo와 Harada (1986)가 *Nicotiana*의 화분배양에서 1 mM의 EDTA농도에 의해 부정배의 유도과 식물의 재분화가 효과적이었다고 보고한 결과와는 다른 결과이다. Kyo (1990)는 EDTA의 양성적인 효과가 EDTA에 의한 배지내 pH 저하에 기인할 것이라고 추측하였지만, Hangarter와 Stasinopoulos (1991)는 *A. thaliana*를 이용한 실험에서 배지내의 EDTA분자가 산화과정에서 formaldehyde가 형성되어 배지에 집적되기 때문에 독성작용을 나타낼 수 있다고 추측한 바 있다.

본 실험을 통하여 고농도(1 mM)의 철이온은 원형질체배양의 초기단계에서 세포분열과 미세캘러스의 성장을 촉진함을 알 수 있었다. 본 연구의 결과는 *Arabidopsis*의 조직배양이나 세포배양을 더욱 효과적으로 수행할 수 있는 배지 조성의 기초가 되리라 기대된다.

적 요

철이온이 *Arabidopsis thaliana*의 mesophyll protoplasts 배양에 미치는 영향을 조사하기 위하여 mesophyll protoplasts를 분리한 후 변형시킨 IMH 배지에 서로 다른 농도의 Fe-EDTA를 조성하여 배양하는 동안 나타나는 현상들을 관찰하였다. 세포분열률, 미세캘러스의 성장 및 첫번째 세포분열의 시기 등이 Fe-EDTA 농도에 따라 현저히 달라짐을 확인하였다. 대조군에서는 전혀 세포분열이 관찰되지 않았으며, 0.02 mM 미만의 저농도에서는 세포분열률이 낮았다. 0.5-1 mM에서 가장 빠른 세포분열과 높은 분열률을 보였으며 미세캘러스의 형성과 성장도 가장 빨랐다. 낮은 농도(0-0.25 mM)의 Fe-EDTA가 첨가된 배지에서는 농도의 증가와 비례하여 분열률이 높아졌고, 첫 세포분열의 시기와 미세캘러스의 성장 또한 농도의 증가에 비례하여 촉진되는 것으로 나타났다. 그러나 이러한 현상은 1 mM에서 최고치를 보인 후 그 이상의 농도에서는 농도의 배가에 따라 효율이 현저히 감소되는 것으로 관찰되었다. 본 연구에서 엽육세포 원형질체의 세포분열 및 미세캘러스의 생장이 최대로 나타났던 0.5-1 mM 철이온 농도는 현재 일반적으로 사용되고 있는 배지들에 비해 5-10배의 높은 농도이다.

사 사 - 본 연구는 1994년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

- Chaney RL, Brown JC, Tiffin LO (1972) Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. *Plant Physiol* **50**: 208 – 213
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* **50**: 151 – 158
- Hangarter R, Stasinopoulos TC (1991) Effect of Fe – catalyzed photooxidation of EDTA on root growth in plant cell culture media. *Plant physiol* **96**: 843 – 847
- Heberle – bors, E (1980) Interaction of activated charcoal and iron chelates in anther culture of *Nicotiana tabacum* and *Atropa belladonna*. *Z Pflanzenphysiol* **99**: 339 – 347
- Imbri – Milligan CW, Hodges TK (1986) Microcallus formation from maize protoplasts prepared from embryogenic callus. *Planta* **168**: 395 – 401
- Klein RM, Manos GE (1960) Use of metal chelates for plant tissue culture media. *Ann N Y Acad Sci* **88**: 416 – 425
- Kyo M (1990) Effects of EDTA and acidified medium on the dedifferentiation of immature pollen in a tobacco pollen culture. *Plant Cell Physiol* **31**: 1249 – 1251
- Kyo M, Harada H (1986) Control of developmental pathway of the tobacco pollen *in vitro*. *Planta* **182**: 58 – 63
- Kyo M, Harada H (1990) Specific phosphoproteins in the initial period of tobacco pollen embryogenesis. *Planta* **182**: 58 – 63
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* **15** : 473 – 477
- Nitsch JP, Nitsch C (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science* **163**: 85 – 87
- Viskot B, Bezdek M (1984) Stabilization of the synthetic media for plant tissue and cell cultures. *Biologia Plantarum* **26** : 132 – 143

(1995년 12월 15일 접수)