

# 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)의 엽육원형질체로부터 효율적인 식물체 재분화와 이들의 형태적 특성

김명덕 · 김준철\* · 진창덕 · 임창진 · 한태진<sup>1</sup>

강원대학교 자연과학대학 생명과학부, <sup>1</sup>한림대학교 자연과학대학 생물학과

## Efficient Plant Regeneration from Mesophyll Protoplast of *Arabidopsis thaliana* and Morphological Characterization of Regenerants

KIM, Myoung Duck · KIM, Joon Chul\* · JIN, Chang Duck · LIM, Chang Jin · HAN, Tae Jin<sup>1</sup>

Division of Life Science, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea

<sup>1</sup>Department of Biology, Hallym University, Chuncheon, 200-702, Korea

**ABSTRACT** Protoplasts were isolated from the leaf mesophyll tissue of *in vitro* 4-weeks-old *Arabidopsis thaliana* and cultured in MS liquid medium supplemented with 2.0 mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP and 9% mannitol in the dark at 25°C. When protoplast-derived microcolonies were dehydrated, the frequency of callus induction enhanced approximately 7-fold higher compared with non-dehydrated microcolonies in CP medium. Fifty callus lines were selected from dehydrated microcolonies. Shoots were efficiently initiated from the green spots of the selected shoot forming calli cultured on MS regeneration medium supplemented with 0.05 mg/L IAA, 7.0 mg/L 2-iP and 30 g/L sucrose under continuous illumination for 4 weeks. Shoot regeneration frequencies (calli regenerating at least one shoot) were 3.5%~56%. Histological observations of shoot forming callus revealed that tracheary elements initiated from inner compact cells, and that meristemoids developed to shoot primordia and shoots. Roots were induced from these regenerating shoots on MS medium without phytohormones. These regenerants were successfully transplanted into potting soil. Morphological characterization of 50 protoplast-derived plants showed that the frequency of normal type was 78%.

**Key words:** Protoplast-derived microcolonies, shoot forming calli, green spots, regenerants

### 서 론

재배중에 결핍되어 있는 내병충성, 내환경성 등의 유용한 형질들을 근연이나 원연간의 식물로부터 도입하기 위해 인공 교잡에 의한 후대선발과 돌연변이 선발방법이 오랫동안 이루어져 왔다. 그러나 교잡에 의한 품종개량은 성적화합 (sexual compatibility)인 경우에 한해서만 가능하므로 이러한 문제

점들을 해결하기 위해 기내 (*in vitro*)배양을 통한 원형질체의 배양과 이들을 이용한 유전자 운반과 발현, 체세포잡종의 생성은 많은 기여를 하였으며 식물분화기작의 해명을 위한 연구에 있어서도 분자생물학적 접근을 가능하게 하였다. 원형질체로부터 세포벽의 재생과 세포분열이 관찰되었고, 원형질체를 배양하여 최초로 식물체 재생에 성공 (Nagata et al. 1971)한 이래 중간 체세포 잡종식물 (interspecific somatic hybrid)과 원형질체를 융합하여 속간 체세포 잡종식물 (intergeneric somatic hybrid)을 얻는데 성공 (Melcher et al. 1978)하였다. 최근에 원형질체를 이용한 품종개량의 가능성이 높아져 가고 있으며 가지과, 십자화과, 산형과 식물들에 국한되어 있던 원

\*Corresponding author. Tel 0361-250-8526

E-mail jckim@kangwon.ac.kr

형질체 배양은 재분화가 가능한 단자엽 식물들이나 목본류로 점차 확대되어가고 있다. 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)는 십자화과에 속하는 전형적인 개화식물이면서 게놈 (genome)의 크기가 70,000 kb로 매우 작은 크기일 뿐만 아니라 (Leutwiler et al. 1984), 반복적인 DNA가 거의 없는 까닭으로 게놈 지도 (genomic map) 작성이 용이하며 (Pruitt and Meyerowitz 1986), 돌연변이의 유발과 선택이 용이하고 한 세대가 짧아 (Meyerowitz 1989) 식물분화기작을 구명하는 model system으로 이용되고 있다 (Pattom and Meinke 1988; Shirley et al. 1992). 이러한 여러 장점들 때문에 애기장대 (*Arabidopsis*)는 식물의 생리, 유전, 분자생물학적 연구에 많이 이용되고 있으며 본 연구에서도 애기장대의 엽육조직으로부터 원형질체를 분리, 배양하는 일련의 과정을 수행하여 효율적인 배양방법을 확립하고 *in vitro* 분화기작의 관련성 여부를 밝히코자 하였으며 육종개발의 관점에서도 원형질체 배양을 통한 체세포잡종 및 외래 유전자 도입에 의한 형질전환 식물체를 만드는 데 기초자료를 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 원형질체 분리 및 배양

애기장대 (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh. ecotype Columbia)의 종자를 4% NaOCl가 포함된 유한락스를 5%로 희석하여 20분 동안 가볍게 흔들어 주면서 표면을 소독한 뒤, 멸균증류수로 5회 세척하였다. 세척한 종자를 1% sucrose가 포함된 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지에서 무균 발아시켜 4주 동안 성장한 식물체로부터 0.5~1 cm<sup>2</sup> 크기로 절취한 잎절편체를 재료로 사용하였다. 원형질체 분리를 위해 채취한 잎을 해부칼로 2 mm 정도로 가늘게 잘라 잎의 뒷면이 CPW 13M 용액과 접하게 하여 1시간 동안 방치하였다. CPW 13M 용액을 제거한 후, 0.2 µm membrane filter로 걸러낸 용액 CM1 (0.75% Cellulase Onozuka R-10과 0.05% Macerozyme Onozuka R-10)과 CM2 (1% Cellulase Onozuka R-10과 0.25% Macerozyme Onozuka R-10) 효소 용액에 침지하여 25°C 암조건에서 2~8시간 동안 정체배양 및 진탕배양 (40 rpm)을 통해 원형질체를 분리하였다. 원형질체를 정제하기 위하여 원형질체가 포함되어 있는 효소 혼합액을 380 µm, 230 µm 190 µm, 74 µm, 46 µm 스테인레스체에 차례로 통과시켜 거르고 여과물은 5분간 800 rpm으로 원심 분리하여 상층의 효소액을 제거하였으며 분리된 원형질체는 CPW 13M 용액으로 다시 현탁한 후, 원심분리를 통해 세척하였다. 2회 세척한 원형질체는 CPW에 21% sucrose가 첨가된 CPW 21S의 상층부에 넣고 10분간 800 rpm으로 비중차 원심분리하여 건전한 원형질체를 얻었으며 CPW 13M 용액에 재현탁, 세척하여 배양하였다. 분리된 원형질체는  $5 \times 10^4$

cells/mL의 밀도가 되도록 희석하여 MS 기본배지에 삼투조절제로 9% mannitol과 MSA (0.5 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L BAP), MSB (2 mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP) 그리고 MSC (1 mg/L 2,4-D, 0.15 mg/L kinetin)의 MS액체배지에 암조건과 광조건으로 배양하여 세포분열을 유도하였으며 지속적인 원형질체의 분열을 위해 배양 5일 후부터는 원형질체의 분열 정도에 따라 mannitol의 농도를 3%씩 낮춘 동일배지를 첨가하여 microcolony의 형성을 유도하였다.

### Shoot forming 캘러스로부터

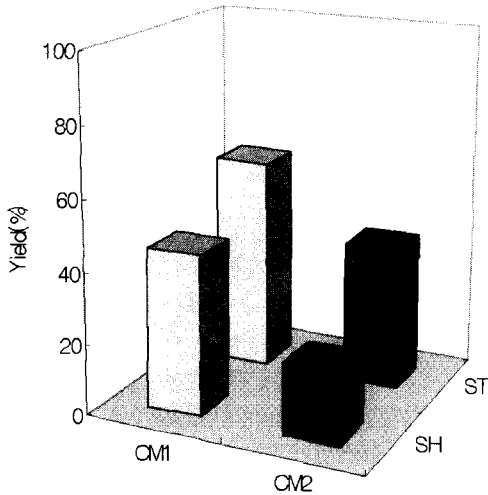
#### 식물체 재분화 및 조직학적 관찰

Microcolony는 0.5 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BAP 그리고 0.3% phytagel이 첨가된 CP 고체배지로 옮겨 캘러스를 증식시켰으며, microcolony에 대한 dehydration은 0.3% (정상배지), 0.5%, 0.8% 그리고 1.0% phytagel이 첨가된 고체배지에서 2주간 배양하여 처리하였다. CP 캘러스 증식배지에서 크기가 5 mm 이상 성장한 캘러스를 MS 기본배지에 IAA, 2-iP 그리고 kinetin이 첨가된 재분화 배지에 치상하여 25°C, 연속적인 광조건 ( $24 \mu\text{E} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ )에서 shoot 분화를 유도하였다. 분화된 shoot는 호르몬이 첨가되지 않은 MS배지로 옮겨 뿌리 형성을 유도하였으며 순화과정을 거친 후, 토양으로 이식하여 완전한 식물체로 성장시켰다. Shoot 형성과정의 해부학적 관찰을 위하여 재분화배지로 옮겨 배양된 캘러스를 FAA에 고정한 후 에탄올로 탈수하여 파라핀에 매몰시켰다. 이를 회전식 마이크로톰을 사용하여 10 µm 두께로 절단한 다음 Safranin-Fast Green으로 이중염색한 후 영구프레파라트를 제작하여 광학현미경으로 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

### 원형질체 분리 및 배양

원형질체 분리를 위한 식물체의 선택에서 중요한 것은 식물체의 나이와 성장조건 및 분리에 사용되는 식물체의 부위 (Wei and Xu 1993)라 할 수 있으며 대부분 온실이나 기내에서 생육기간 동안 스트레스 없이 성장한 어린 식물체를 사용했을 때 분열능력이 좋다고 알려져 있다. 본 실험에서도 애기장대의 종자를 기내 발아시켜 4주 성장한 잎으로부터 효과적으로 원형질체를 분리할 수 있었다. 원형질체 분리를 위한 효소용액의 농도와 배양방법을 달리하여 분리 효율을 비교한 결과, 0.75% Cellulase Onozuka R-10과 0.05% Macerozyme Onozuka R-10을 포함한 효소용액에서 4시간의 정체배양시 생체량 1 g 당  $10^7 \sim 10^8$ 개의 원형질체를 얻을 수 있어 분리 효율이 가장 높았으나, 40 rpm으로 진탕배양을 하는 경우는 기계적인 파괴로 인해 분리효율이 감소되었다 (Figure 1). 또한



**Figure 1.** Yield of intact protoplasts. Protoplasts were isolated from the leaves of *A. thaliana* in CM1 (0.75% Cellulase Onozuca R-10 and 0.05% Macerozyme Onozuca R-10) and CM2 (1% Cellulase Onozuca R-10 and 0.25% Macerozyme Onozuca R-10) with shaking for 2 h (SH) and stationary for 4 h (ST) in culture conditions. CM1 and CM2 contained 13% mannitol and 10 ml/L CPW solution.

효소용액에 처리하기 전에 4°C에서 CPW 13M용액에 1시간 동안 방치 (Evans et al. 1983)함으로써 건전한 원형질체 수율을 더욱 높일 수 있었는데, 이는 효소처리에 의한 생리적 장애를 최소화하며 효소용액의 세포내 침입을 방지하여 원형질체의 안정성이 증가되었기 때문이라고 생각되었다.

따라서 본 실험에서는 4시간의 정제배양을 통해 애기장대의 엽육조직으로부터 건전한 원형질체 (Figure 2A)를 분리하였으며, 효소액 제거동안에 분리된 원형질체의 자발적인 융합과 세포벽이 제거되지 않은 세포가 관찰되기도 하였는데 이들은 CPW 13M 용액을 이용한 정제과정에서 제거되었다. 초기에 분리된 원형질체의 크기는 20~65 μm였으나 sucrose를 이용한 비중차 원심분리로 인해 작은 원형질체의 손실이 많이 나타났으며 평균 세포의 크기는 38 μm였다.

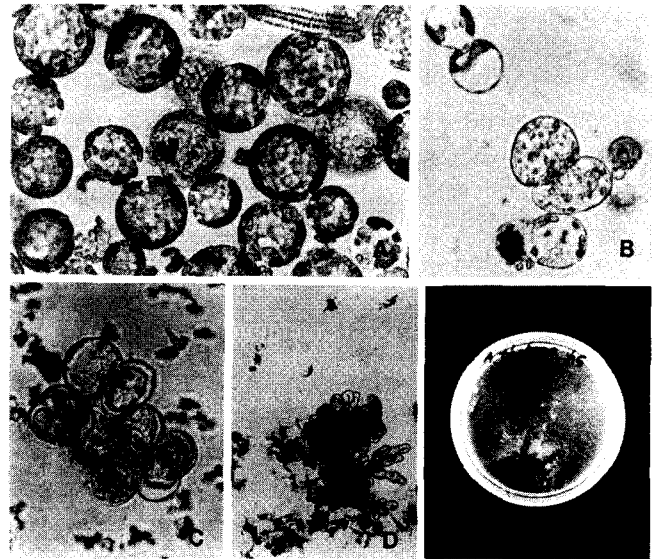
원형질체 배양에서 원형질체의 세포벽 재생 및 세포분열은 배지내 접종된 세포의 수와 첨가된 식물생장조절물질에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다 (Mayer et al. 1979). 본 실험에서 원형질체 분열에 효과적인 접종세포수의 범위는  $4 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 개로 나타났으며, 그 이하의 밀도에서는 지속적인 세포분열을 관찰할 수 없었다. 원형질체 배양은 MS 기본배지에 다양한 농도의 2,4-D, BAP, NAA 그리고 Kinetin의 처리구에서 배양하였는데 특히, 2.0 mg/L NAA와 0.5 mg/L BAP가 첨가된 MSB 액체배지에서 지속적인 세포분열을 유도 (Table 1)할 수 있었으며 배양 4주 후부터는 microcolony를 형성하였다. 반면에 MSA와 MSC 처리구에서는 1주 내지 3주까지 세포분열이 유도되었으나 그 이상의 분열은 진행되지 않고 갈변, 고사하는 것을 관찰할 수 있었다.

$5 \times 10^4$ 개의 밀도로 3~4일 배양된 원형질체는 구형의 모습

**Table 1.** Influence of MS different culture media on the division of *A. thaliana* mesophyll protoplasts.

Culture medium	Days of culture					
	0	7	14	21	28	35
MSA	Division			Death		
MSB	Division			Colony		
MSC	Division			Death		

<sup>a</sup>MSA, MS medium with 0.5 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L BAP and 9 g/L of glucose;  
 MSB, MS medium with 2 mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP and 15 g/L sucrose;  
 MSC, MS medium with 1 mg/L 2,4-D, 0.15 mg/L kinetin and 3.6 g/L glucose.



**Figure 2.** Cell division and microcolony formation of *A. thaliana* mesophyll protoplasts. A, Intact purified protoplasts. B, First cell division after 1 week of culture. C, Divided cells after 2 weeks of culture. D & E, Microcolonies formed after 4 weeks of culture.

이 변형되기 시작하였는데 이는 세포벽의 재생에 기인하는 것으로 보여지며 배양 5일 후부터는 대부분의 원형질체들이 세포 분열 (Figure 2B)을 시작하였으며 형태와 크기의 다양한 변화와 함께 엽록체의 감소현상을 나타냈다. 배양된 원형질체는 budding 현상이 관찰되었는데, 이러한 현상은 세포벽의 형성이 불완전하여 약한 부분이 생기기 때문 (Fowke and Gamborg 1980)인 것으로 사료된다.

원형질체는 빛에 민감하게 반응하는 배양체 중의 하나로 알려져 있는데, 본 실험에서도 암조건과 광조건에서 배양하였을 때 광조건에서는 초기에 세포분열이 왕성하게 일어났으나, 7일 후부터는 세포분열 빈도가 점차 감소하면서 갈변된 반면, 암조건에서는 지속적인 세포분열이 가능하였다. 암배양 2주

후부터는 빠른 세포 분열을 유도 (Figure 2C)하였으며 배양 4주 후에는 분열된 세포로부터 microcolony가 형성 (Figure 2D, 2E)되는 것을 관찰할 수 있었다.

### Shoot forming 캘러스로부터 식물체 재분화

엽육 원형질체로부터 형성된 microcolony는 CP (CLC /Ipomaea basal medium, Duchefa)배지를 기본으로 0.5 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BAP 그리고 0.3% phytagel이 첨가된 고체배지로 옮겨 캘러스를 증식 (Figure 3A)시켰다. Microcolony를 0.3%, 0.5%, 0.8% 그리고 1.0% phytagel이 첨가된 고체배지에서 2주간 각각 배양하여 dehydration 하였을 때 (Table 2), dehydration을 시키지 않은 microcolony에 비해 약 7배의 높은 캘러스 유도율을 나타냈다. 배양배지의 solidifying은 조직에 의해 흡수되는 물을 제한함으로써 조직을 더욱 밀집시키고 건조시키므로 인해 SF (shoot forming) 캘러스를 유도하는 중요 요인인 것으로 사료된다. 벼의 미숙 배로부터 형성된 캘러스를 재료로 하여 2년 동안 계대배양한 세포를 재분화시킬 때 0.8% agar 농도에서는 식물체를 얻지 못하였으나, 1.6% agar 함유 배지에서는 40%의 분화율을 보고 (Lai and Liu 1988)하였다. 또한 벼의 원형질체로부터 유도된 colony를 dehydration시킨 경우 dehydration을 시키지 않았을 때와 비교시 10~24% 이상의 재분화율을 향상시켰다고 보고하였고 (Lee et al. 1998), solidifying agent 처리에 의

**Table 2.** Effects of different solidified media on frequencies of shoot-forming calli from protoplast-derived microcolonies of *A. thaliana*.

Microcolony <sup>a</sup> culture media <sup>b</sup>	Frequency <sup>c</sup> of callus induction (%) (calli regenerating at least one shoot)
MSL→ CP03→ CP03	12.4%
MSL→ CP05→ CP03	16.4%
MSL→ CP08→ CP03	84.6%
MSL→ CP10→ CP03	78.5%

<sup>a</sup>Microcolonies were dehydrated in CP03, CP05, CP08 and CP10 media for 2 weeks in culture condition.

<sup>b</sup>MSL=MS liquid medium, CP03, CP05, CP08 and CP10=CP medium with 0.3%, 0.5%, 0.8% and 1.0% phytagel, respectively.

<sup>c</sup>For each experiment, 100 microcolonies were tested with five replications.

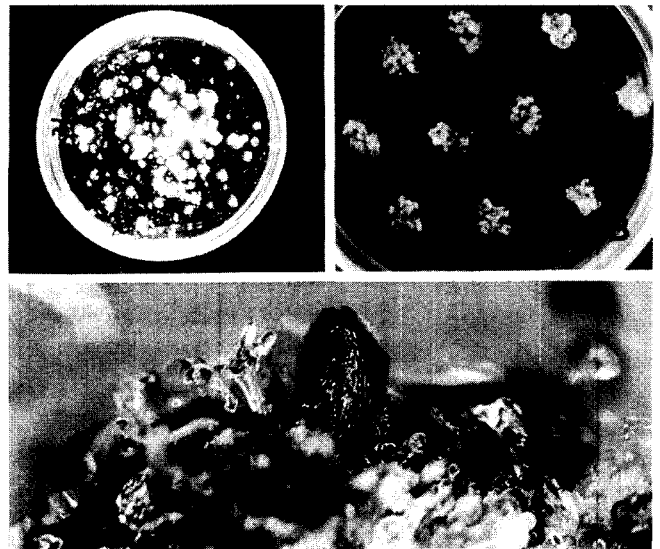
**Table 3.** Effects of phytohormones on shoot formation from protoplast-derived calli of *A. thaliana*.

Phytohormones (mg/L)			Frequency <sup>a</sup> of shoot formation (%) (calli regenerating at least one shoot)
IAA	2-iP	kinetin	
0.05	7	0	56.0%
0.15	5	0	29.0%
0.03	0	1	3.5%

<sup>a</sup>For each experiment, 10 callus segments were tested with five replications.

한 partial dehydration이 삼투물질의 농도를 증가시키고 체 세포 배발생의 빈도를 향상시킨다는 보고 (Lai and Liu 1988; Tsukahara and Hirose 1992; Rance et al. 1994)와도 일치하는 결과이다. Dehydration microcolonies에서 유도된 캘러스에서 표면이 매끈하고 잘 떨어지는 옅은 노란색을 띠는 SF 캘러스를 형태적으로 선별하여 다양한 농도의 IAA, 2-iP 그리고 kinetin이 첨가된 배지에서 배양한 결과 (Table 3), 0.05 mg/L IAA, 7.0 mg/L 2-iP 그리고 30 g/L sucrose가 첨가된 처리구에서 광배양하였을 때 배양 4주 후부터 캘러스에 녹점이 형성되기 시작하여 전체적으로 녹화된 캘러스 (Figure 3B)가 형성되었으며, 녹화된 SF 캘러스로부터 shoot원기 (Figure 3C)가 분화된 것을 관찰할 수 있었으며, auxin에 대한 cytokinin의 비율을 증가시킴으로 shoot 형성이 촉진됨을 알 수 있었다.

SF 캘러스를 장기간 계대배양할 경우 재분화율이 급격히 떨어졌으며, NSF (non-shoot forming) 캘러스는 부드럽고 투명하며 unorganized된 형태로 shoot로의 재분화가 어렵고 가끔 뿌리 형성이 유도되는 것을 관찰할 수 있었는데 이런 현상은 다른 식물의 보고 (Heyer and Nabors 1982)와 일치하는 것이었다. SF와 NSF 두 세포군의 외부형태적인 특징에 의해서 SF 캘러스를 선별, 배양하여 재분화 효율을 증가시킬 수 있었으며 SF 캘러스와 NSF 캘러스에 대한 shoot의 형성 정도와 세포분열 능력에 있어서도 현저한 차이가 나타남을 알 수 있었다. SF 캘러스로부터 식물체 재분화에 대한 auxin과 cytokinin의 영향을 살펴보면 0.015 mg/L IAA, 5 mg/L 2-iP가 첨가된 재분화배지에서는 29%의 재분화율을 보였으



**Figure 3.** Green calli and shoot formation from protoplast-derived calli of *A. thaliana*. A, Formation of calli on CP propagation medium supplemented with 0.5 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L BAP after 2 weeks of solid culture. B, Formation of green calli on MS regeneration medium supplemented with 0.05 mg/L IAA and 7 mg/L 2-iP after 4 weeks of culture. C, Green spots (GS) on shoot-forming calli and initial shoots.

며, 0.05 mg/L IAA, 7 mg/L 2-iP가 첨가된 재분화배지에서는 56%의 재분화율로 다소 높게 나타나 다른 십자화과에 속하는 종들에서와 같이 shoot형성에서 auxin에 대한 cytokinin의 비율을 증가시킴으로써 재분화율이 높아짐을 알 수 있었다.

기관발생의 조직학적 관찰과 재분화 식물체의 형태적 특성

재분화배지로 옮겨 배양한 후 생성된 캘러스를 paraffin 포매방법을 이용하여 shoot가 형성되는 발생과정을 발달 단계별로 조직학적인 측면에서 관찰하였다. 재분화배지에서 1주 동안 배양한 조직을 관찰한 결과, shoot로 발달할 시원세포(initial cell)의 집단은 형성되지 않았으며, 신장된 무정형의 세포들만이 관찰되었고 배양이 진전됨에 따라 주위 세포들과 구별이 뚜렷한 안쪽 compact 세포에서 도관요소(tracheary element)가 형성되었으며 축을 따라 발달하는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 4A, 4B). 도관요소는 배양이 진전됨에 따라 정상적인 형성층으로 발달하게 되는데 뿌리와 줄기는 도관조직이 있어야 기능을 하므로 배양으로부터 기관분화의 여부는 도관요소의 존재를 관찰하여 확인하며 도관분화에 작용하는 세포나 조직의 내외 조건들을 식물체 재생의 조건으로 생각할 수 있다. 배양조직으로부터 기관형성이 이루어질 때 조직을 구성하는 세포들 중 소수의 세포들이 일련의 급속한 세포분열에 의해 분열조직군(meristemoid)을 형성하여 기관발생 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이 시기에 형성된 세포집단은 shoot로 발달될 분열조직군임을 확인할 수 있었고 shoot primordia (Figure 4C, 4D)로 발달하는 것을 관찰하였으며 2주 동안 배양이 지속되면서 shoot (Figure 4E)가 분화되었다.

재분화된 식물체들의 형태적인 특징을 살펴보면 (Figure 5), rosette 형의 정상적인 식물체에 비해 잎의 두께가 2배나

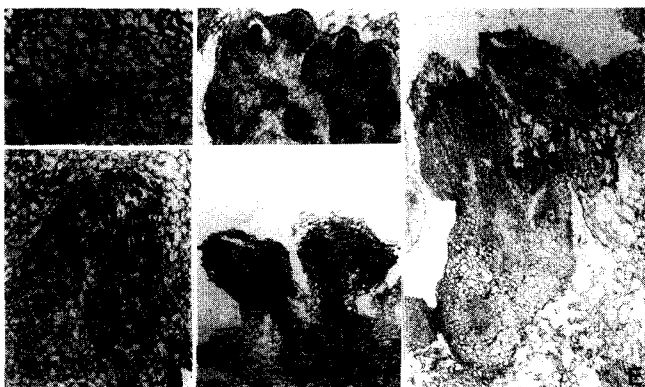


Figure 4. Histological observations of organogenesis from shoot forming calli of *A. thaliana*. A, Section of subcultured callus. B, Development of tracheary element. C, Initial stage of shoot primordia. D, Shoot primordia. E, Logititudinal section of 2-weeks-old shoot.

되는 다육성을 나타내고 꽃대 없이 화아가 형성되어 조기개화를 이루거나 잎이 대생으로 발달하는 비정상적인 모습을 나타내었다. 이는 유리화(vitrification) 같은 형태적인 특성과 생리적인 특성 즉, 물이 침투해 들어가는 수동적 현상과 대사의 혼란(perturbation)과 같은 능동적 현상(Paques 1991)에 의해 나타나는 것으로 보인다. 50개의 재분화된 식물체에서 39개체가 정상적인 식물체였으며 11개체는 비정상

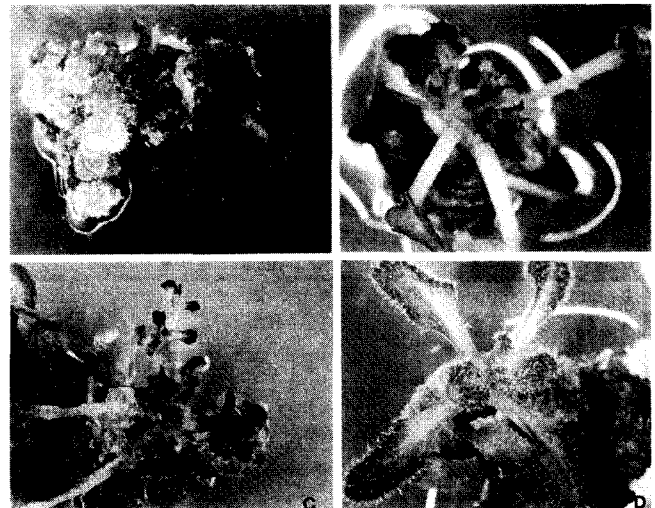


Figure 5. Morphological characterizations of the regenerant lines from protoplast-derived microcolonies of *A. thaliana*. A, Abnormal type with aberrant leaf. B, Abnormal shoot with floral bud without bolting. C, Two leaves appear at the opposite position in abnormal type. D, Normal leaves with normal shoots.

Table 4. Morphological observations of the regenerant lines from protoplast-derived microcolonies in *A. thaliana*.

Morphology	No. of regenerants (%) <sup>a</sup>
Normal	39 (78%)
Abnormal	11 (22%)

<sup>a</sup>For each experiment, 50 regenerant lines developed from protoplast-derived microcolonies were observed.

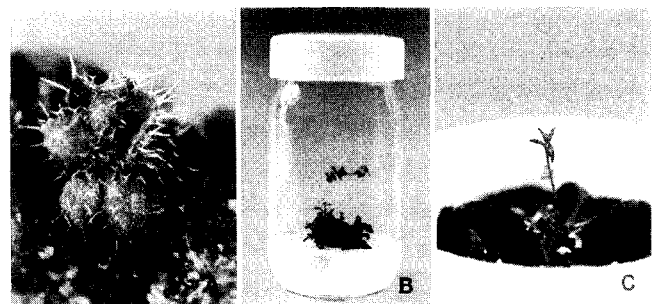


Figure 6. Plant regeneration from the protoplast-derived shoot of *A. thaliana*. A, Rosette leaf formation from differentiated shoot under continuous illumination. B, Regenerated plantlets with leaves and roots in MS medium without phytohormones. C, Regenerant potted in soil.

적인 식물체였는데 (Table 4), 정상적인 식물체에 비해 비정상적인 식물체는 형성된 shoot의 수와 증식율이 높았으나 새로운 배지로 옮겨 식물체로 발달하는 과정중에 고사하였다. 연속적인 광조건에서 6~8개의 rosette형의 잎이 형성 (Figure 6A)된 식물체를 호르몬이 첨가되지 않은 MS 배지에 옮겨 뿌리를 유도 (Figure 6B)하였으며, 이어 2주 후 토양으로 옮겨 완전한 식물체를 형성 (Figure 6C)하였다.

사사 - 본 연구는 1997년도 교육부 학술조성비 (97-4439)에 의하여 연구되었으며 연구비 지원에 감사 드립니다.

## 적 요

4주 배양된 에기장대의 엽육조직으로부터 원형질체를 분리하여 2.0 mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP 및 9% mannitol이 포함된 MS 액체배지에서 25°C, 암조건에서 배양하였다. 원형질체 유래 microcolonies를 dehydration 시켜 배양하였을 때 non-dehydration에 비해 7배의 높은 캘러스 유도율을 나타내었다. Dehydrated microcolonies들 중에서 50개의 캘러스를 선별하여 0.05 mg/L IAA, 7 mg/L 2-iP가 첨가된 MS배지에서 광조건으로 배양하였을 때 점차적으로 녹화되기 시작하였으며 배양 4주 후부터 전체적으로 녹화된 SF 캘러스에서 green spots이 형성되었다. Shoot 형성률은 식물생장조절물질의 종류에 따라 3.5%~56%로 나타났다. 재분화된 shoot는 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 MS배지에서 뿌리를 유도하였으며 이들을 토양에 이식하여 완전한 재분화 식물체를 얻을 수 있었다. Shoot 형성과정을 조직학적인 측면에서 관찰한 결과, 배양초기에는 신장된 무정형의 세포가 대부분이었으나 배양이 진전됨에 따라 주위 세포들과 구별이 뚜렷한 도관요소 (tracheary element)와 분열조직군 (meristemoid)이 형성되면서 shoot primordia가 shoot로 발달되는 것을 관찰할 수 있었다. 재분화 식물체는 형태적으로 normal type이 78%이고 abnormal type이 22%였다.

## 인용문헌

Evans DA, Bravo JE, Kut SA, Flick CE (1983) Genetic behavior of somatic in the genus *Nicotiana*: *N. otophora* + *N. tabacum* and *N. sylvestris* + *N. tabacum*. *Theor Appl Genet* **65**: 93-101

- Fowke LC, Gamburg OL (1980) Ultrastructural characteristics of intergeneric protoplast fusion. *Can J Bot* **53**:272-278
- Heyser JW, Nabors NW (1982) Long term plant regeneration somatic embryogenesis and green spot formation in secondary oat (*Avena sativa*) callus. *Z Pflanzenphysiol* **107**:153-160
- Lai KL, Liu LF (1988) Increased plant regeneration frequency in water-stressed rice tissue cultures. *Jap J Crop Sci* **57**:553-557
- Lee SH, Lee SI, Shon YG, Gal SW, Choi YJ, Cho MJ (1998) Efficient fertile plant regeneration from protoplasts of javanica rice and their ploidy determination by flow cytometry. *Kor J Plant Tiss Cult* **25**:81-88
- Leutwiler LS, Hough EB, Meyerowitz EM (1984) The DNA of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **194**:15-23
- Mayer Y, Cooke R (1979) Time course of hormonal control of first mitosis in tobacco mesophyll protoplasts cultivated *in vitro*. *Planta* **147**:181-185
- Melchers G, Sacristan MD, Holder AA (1978) Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Res Commum* **43**:203-218
- Meyerowitz EM (1989) *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell* **56**:263-269
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**:473-497
- Nagata T, Takebe L (1971) Planting of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta* **99**:12-20
- Pattom DA, Meinke DW (1988) High-frequency plant regeneration from cultured cotyledons of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* **7**:233-237
- Paques M (1991) Vitrification and micropropagation: causes, remedies and prospects. *Acta Hort* **289**:283-289
- Pruitt RE, Meyerowitz EM (1986) Characterization of the genome of *Arabidopsis thaliana*. *J Mol Biol* **187**:169-183
- Rance IM, Tian W, Mathews H, de Kochko A, Beachy RN, Fanquet C (1994) Partial desiccation of mature embryo-derived calli, a simple treatment that dramatically enhances the regeneration ability of indica rice. *Plant Cell Rep* **13**:647-651
- Shirley BW, Hanley S, Goodman HM (1992) Effect of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis* transparent testa mutations. *Plant Cell* **4**:333-347
- Tsukahara M, Hirosawa T (1992) Simple dehydration treatment promotes plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) callus. *Plant Cell Rep* **11**:550-553
- Wei ZM, Xu ZH (1993) Plant regeneration in peanut protoplast culture. *Plant Sci* **41**:61-68