

## 세 가지 고추속 식물의 원형질체 분리 및 배양에 미치는 요인

임학태\* · 염옥희 · 전익조 · 조미애 · 양승균<sup>1</sup>

강원대학교 식물응용과학부 & 한국감자 육종소재은행, <sup>1</sup>(주)농우 바이오

### Factors Influencing Protoplast Isolation and Culture in Three *Capsicum* Species

LIM, Hak-Tae\* · LIAN, Yu-Ji · CHUN, Ik-Jo · ZHAO, Mei-Ai · YANG, Seong-Kyun<sup>1</sup>

Division of Applied Plant Sciences & Center for the Korea Potato Genetic Resources (KPGR), Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea  
<sup>1</sup>Noongwoo seed Bio

**ABSTRACT** Protoplasts were isolated from cotyledons, hypocotyls, and mesophyll tissues of three species of *Capsicum* species (*C. annuum*, *C. baccatum*, and *C. chacoense*). Combination of Cellulysin (1%) and Macerozyme (0.25%) in 0.65 M sorbitol was found to be the most effective for the digestion of cell wall, regardless of the *Capsicum* species. Antioxidant MES (2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid) in the enzyme solution helped protoplasts overcome browning. After 5 days of initial culture, Cell division occurred in modified K8p medium containing 1~5 mg/L zeatin, 0.5 mg/L IAA, 0.1~0.5 mg/L TDZ, and 1 mg/L 2,4-D under continuous dark condition at 25°C. Semi-solid agarose culture method was more effective than liquid culture, and it also protected the cells from browning caused by polyphenolic compound released during protoplast culture. A total of 4000 calli were obtained from protoplast culture of different *Capsicum* species. All of these calli were transferred to the 100 combinations of regeneration media using various plant growth regulators; TDZ, IAA, Zip, BAP, NAA, and zeatin. These calli derived from protoplast of three species of *Capsicum* were, however, not differentiated into shoots.

**Key words:** Browning, *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chacoense*, cell culture, hot pepper, MES (2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid), Osmoticum, wild species

### 서 론

고추는 지난 10여 년간 재배면적이 채소 전체의 약 25~30% 정도로서 농업과 고추관련가공산업 및 소비자 물가에 크게 영향을 주었다. 그러나 고추의 생산량은 해에 따라 변동이 심한데, 그 주요원인은 병에 의한 수량 감소이다. 한국에서 고추에 피해를 주는 주요 병해는 역병, 바이러스, 탄저병 및 세균성 점무늬병 등으로서, 이들에 대한 복합 내병성 품종육성이 절실하다.

*Capsicum* species에서 *Capsicum baccatum*을 포함한 여러 가지 야생종들은 병저항성을 가지고 있으며 특별히 바이러스에 강하다. 비록 *Capsicum chinense*와 같은 야생종의 유용한 형질들이 재래적인 육종방법으로 재배종에 도입되기도 하였지만 이러한 교잡육종 방법들은 주로 자가불화합성 혹은 응성불임을 이용한 것으로서 식물 육종방법에 있어서 한계가 있다 (Diaz et al. 1988). 체세포 잡종기술을 이용하면 재래적인 방법으로는 불가능한 종속 간 혹은 원연 간의 교잡이 가능하고 또한 세포질 응성불임 특성 (CMS)과 같은 유용형질을 도입하는 것이 가능하다. 이러한 방법은 이미 십자화과 채소에서 적용되어 (Cardi and Earle 1997; Sigareva and Earle 1997) 상업적으로 F1잡종 종자생산에 이용되고 있다. 뿐만 아니라 체세포 잡종기술로 생산된 식물체들은 유전자

변형식물 (GMO)이 아니기 때문에 규제 없이 바로 실용화가 가능하다는 것이 큰 장점이다.

기내식물의 효율적인 재분화 조건체계 확립은 형질전환이나 원형질체 배양기술에 있어서 필수적인 선결조건이다 (Marla et al. 1996). 일반적으로 가지과에 속하는 감자와 토마토에서 식물조직배양기술을 이용한 재분화 및 원형질체 배양, 융합실험들이 활발하게 이루어져 왔으나 고추는 원형질체 분리 및 배양이 어려운 식물로 알려졌다 (Liu et al. 1990; Prakash et al. 1997). 고추 식물조직배양에 관련된 연구들이 원형질체 배양에 의한 캘러스 형성 (Niedz et al. 1987; Donato et al. 1989; Nishio et al. 1989), 식물체 재분화, 형질전환 식물체 재분화, 배배양에 의한 식물체 재분화에 관한 연구결과들이 발표된 바가 있지만 (Ochoia-Alijo and Ireta-Mereno, 1990; Christopher et al. 1991; Marla et al. 1996; Manoharan et al. 1998) 아직도 몇 가지 품종에만 국한되어 있어 아직 확실한 배양체계가 확립되어 있지 않는 상태이다. 더구나 고추 원형질체 배양에서 완전한 식물체로 재분화된 연구결과들은 *Capsicum annuum* v. *California wonder*와 *C. annuum* v. *Dulce Italiano* 두 가지 품종에서만 보고되어 (Diaz et al. 1988; Prakash et al. 1997) 이 분야에 관한 연구는 미흡한 상태이다. 이러한 고추 계통들은 피망계 (bell pepper)로 한국형 고추인 hot pepper와는 원형질체의 분리 배양조건이 아주 다르며 한국형 고추는 배양이 더 어려운 것으로 알려졌다 (Liu et al. 1990). 뿐만 아니라 고추 야생종을 소재로 한 원형질체 분리에 관한 연구보고는 아직까지 없는 상태이다.

본 실험은 세 가지 고추속 식물 (*C. annuum*, *C. bacatum*, *C. chacoense*)의 원형질체 분리에 미치는 삼투조절물질의 농도, 고추의 원형질체 분리에 적합한 효소농도와 함께 고추 원형질체의 배양조건을 확립하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 원형질체 분리재료

(주)농우 바이오에서 분양 받은 *C. annuum* (NW800, NW482), *C. bacatum* (NW1898), *C. chacoense* (NW1900)를 공시재료로 하였다. 종자들은 70% 에탄올로 1분 동안 흔들어서 주면서 소독한 다음 50% 유한락스 (물 : 유한락스 1 : 1)로 흔들어서 주면서 15분 동안 표면살균하였다. 다음 멸균수로 3~5회 세척하고 멸균된 petridish에서 최아시켰다. 최아시킨 종자들을 3% sucrose가 포함된 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지에서 무균발아시켜 7~10일 성장한 식물체의 하배축과 자엽, 그리고 기내에서 3~4주 성장한 식물체로부터 절취한 잎을 실험재료로 이용하였다.

### 원형질체 분리와 배양

삼투 조절제와 효소의 농도 및 종류가 원형질체의 분리에 미치는 영향을 알아보기 위하여 삼투조절제로 sorbitol을 0.4~0.7 M의 범위로 처리하였으며, 효소 농도는 Cellulysin Onozuka R-10을 1%로 고정시킨 후 Macerozyme Onozuka R-10의 농도를 0.1~0.5%로 하여 처리하였다. 하배축, 자엽과 잎들을 전처리 용액 (0.65 M sorbitol, 50 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, pH 5.6~5.8)에서 날카로운 해부칼로 사망 0.5~1 mm 정도로 잘게 자른 다음 한 시간 동안 방치하고 한 시간 후 피펫으로 전처리 용액을 제거한 후 0.2 μm 크기의 membrane filter로 여과 멸균한 효소용액을 첨가한 후 25°C 에서 30 rpm 속도로 12~16 시간 동안 회전 진탕 배양하였다. 원형질체를 분리, 정제하기 위하여 원형질체가 포함된 효소용액을 60 μm의 체로 거르고 원형질에 세척용액으로 현탁시켰다. 세포현탁액을 15 mL 원심분리 tube에 옮기고 800 rpm에서 10분 동안 원심분리시킨 후 원심분리 tube 상층의 원형질체 부분을 파스퇴르 피펫으로 조심스럽게 분리하여 새로운 원심분리 tube에 옮기고 다시 원형질체 세척용액으로 현탁시켜 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 버리고 가라앉은 부분을 배양배지로 현탁시켜 혈구계산기로 원형질체 수를 조사하였다.

원형질체는 2,4-D, NAA, TDZ, zeatin, IAA가 첨가된 수정된 k8p배지 (Glimelius et al. 1986)에서 최종농도가 5 × 10<sup>5</sup> protoplast/ml가 되게 희석하여 25°C 암상태에서 배양하였다.

## 결과 및 고찰

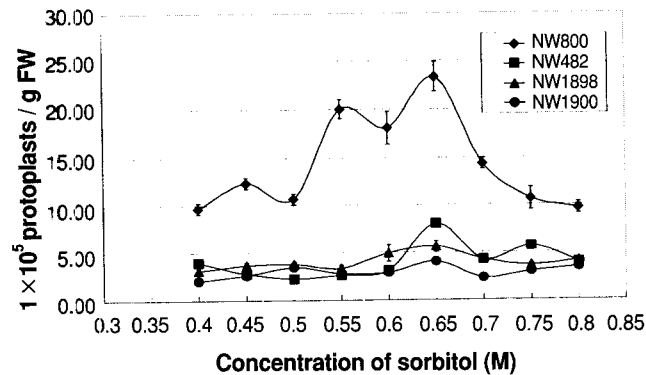
### 원형질체 분리

본 실험에서는 자엽과 하배축이 어린잎을 사용하였을 때보다 더 많은 양인 2 × 10<sup>6</sup> protoplasts/g 원형질체를 얻을 수 있었다. Prakash 등도 (1997) 고추의 *Capsicum annuum* L. cv *California wonder*를 실험재료로 하여 원형질체를 분리하였을 때 자엽과 잎에서 많은 원형질체를 얻었다고 보고한 바 있다. 삼투조절 물질의 농도가 원형질체 수량에 직접적인 영향을 줄 뿐만 아니라, 효소의 종류 및 농도 역시 원형질체의 생산량에 영향을 주는 중요한 요인 중의 하나이다. 고추 원형질체 분리에 적합한 삼투조절 물질의 농도를 알아보기 위하여 삼투조절 물질 중의 하나인 sorbitol을 0.4~0.7 M로 처리하였는데 *C. annuum*, *C. bacatum*, *C. chacoense*에서 원형질체 생산량 차이가 있었다. *C. annuum* (NW800)의 원형질체 생산량은 야생종인 *C. bacatum* (NW1898)과 *C. chacoense* (NW1900) 그리고 같은 *C. annuum*인 NW482에 비하여 뚜렷하게 높았으나 전체적인 경향으로 보아 원형질체 분리에서 가장 적합한 삼투조절제의 농도는 0.65 M로 나타났

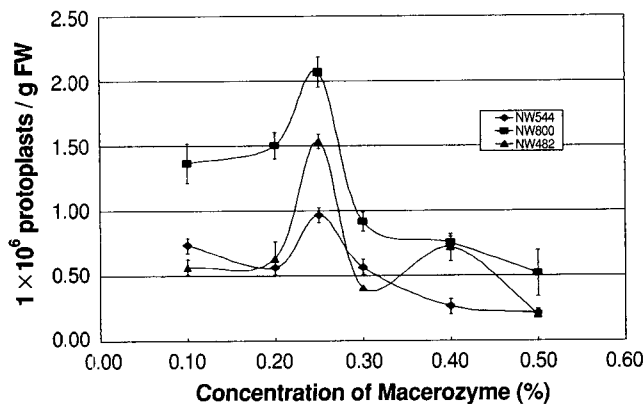
다 (Figure 1).

본 실험에서는 Macerozyme의 농도가 높아지면 원형질체의 수량이 적어지는 경향이 있었으며 Macerozyme 0.25%가 고추 원형질체 분리에 적합한 것으로 나타났다 (Figure 2).

고추의 원형질체 분리를 위한 효소처리 과정에서 식물조직이 갈변되면서 정상적인 원형질체를 생산할 수 없거나 혹은 아주 적은 원형질체만 생산되는 현상을 관찰할 수 있는데 이것은 세포벽 분리과정에서 파괴된 세포에서 분비되는 물질들이 효소용액의 pH를 낮추기 때문인 것으로 사료된다. 특히 고추의 원형질체 분리시 온도가 높아지면 원형질체 양이 뚜렷하게 감소되는데 25°C 이상의 온도에서는 식물 절편체들이 더 심하게 갈변되어 정상적인 원형질체를 거의 분리할 수 없었다. 이러한 갈변현상은 효소용액에 5 mM MES를 첨가하고 분리 시 온도를 25°C로 하여 방지할 수 있을 뿐만 아니라 다량의 원형질체 생산량을 높일 수 있었다 (Figure 3A).



**Figure 1.** Effects of sorbitol concentrations on protoplast yields when leaves of different species of *capsicum* were treated with enzyme mixture (1% Cellulysin, 0.25% Macerozyme). NW800, NW544: *C. annuum*, NW1898: *C. baccatum*, NW1900: *C. chaconense*



**Figure 2.** Effects of Macerozyme concentrations on protoplast yields when sorbitol (0.65 M) and Cellulysin (1%) were fixed at the digestion enzyme solution. NW800, NW544, NW482: *C. annuum*

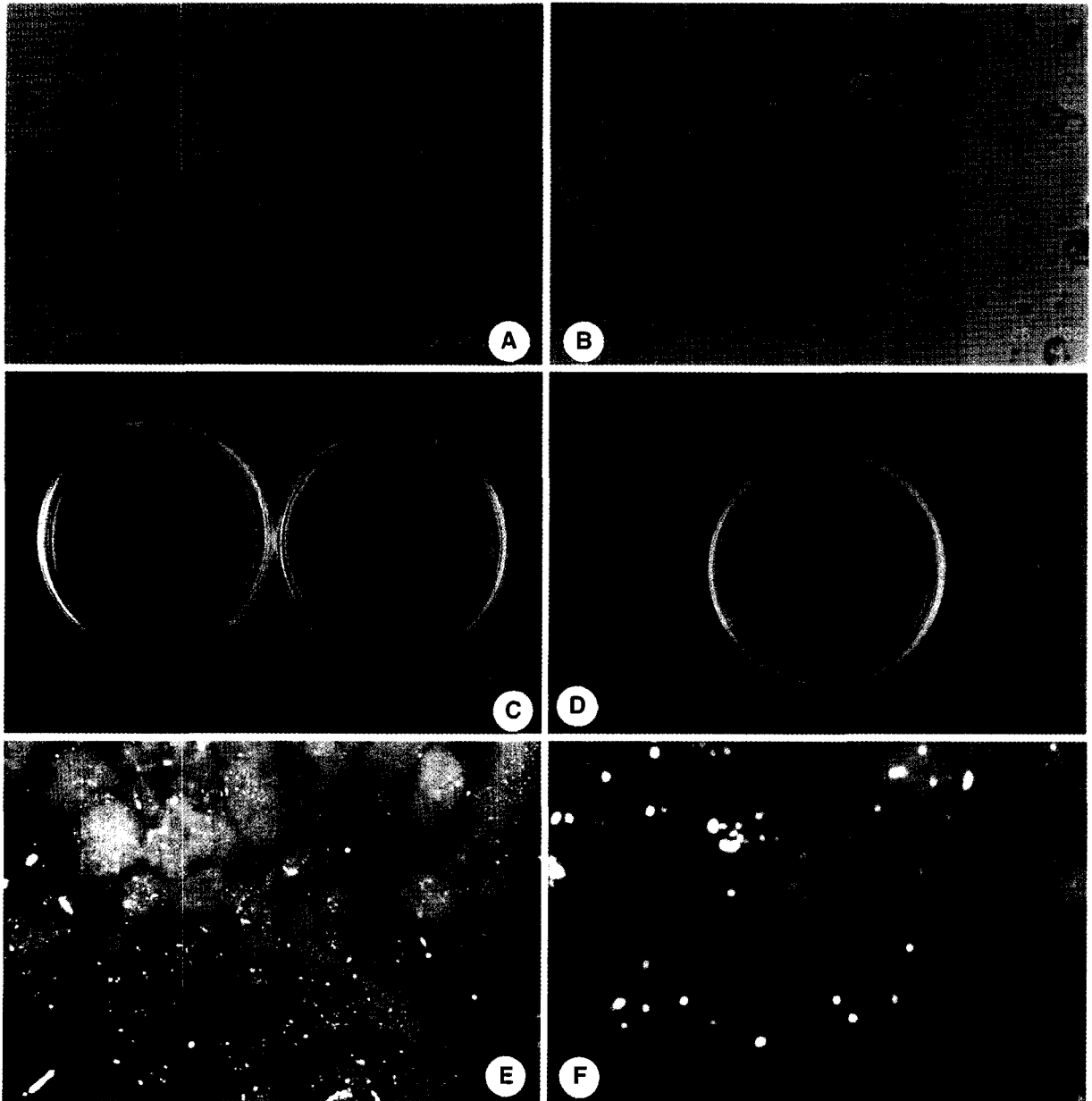
### 원형질체 배양 및 캘러스 형성

원형질체는 k8p배지에 1~5 mg/L zeatin, 0.5 mg/L IAA, 0.1~0.5 mg/L TDZ, 1 mg/L 2,4-D를 첨가하여 배양한 5일 후부터 분열하기 시작하였으며 배양 3~4주에 분열이 가장 활발한 것이 관찰되었다 (Figure 3B). 고추 원형질체 배양과정에서 많은 양의 페놀류 물질이 분비되면서 갈변현상이 나타났다 (Diaz et al. 1988; Prakash et al. 1997) 이들은 배지의 삼투조절방법과 Polyvinylpyrrolidone (PVP) 혹은 MES를 배지에 첨가하는 방법을 사용하여 효과적으로 갈변을 억제시킬 수 있다고 하였다.

원형질체 배양은 초기 액체배양에서 활발한 세포분열을 유기시킨 다음 액체배지에 정기적으로 신선한 배지를 넣어주는 방법과 분열하고 있는 세포들을 agarose 반고체 배지에 고정하여 배양하는 방법을 비교하여 수행하였다. 두 가지 방법을 비교하여 본 결과 신선한 배지를 첨가해 줌으로써 세포의 갈변을 어느 정도 억제할 수는 있었으나 배지를 교체해 주는 과정에서 원형질체가 파괴되거나 분열이 중지되면서 세포가 갈변되는 현상을 관찰할 수 있었을 뿐만 아니라 형성된 세포 colony의 생장도 느렸다. Agarose가 첨가된 반고체 배지에 고정하여 배양한 세포들은 세포생장이 액체에서보다 빨랐으며 (Figure 3C, 3D), 세포가 갈변되는 현상도 액체평판배지보다 효과적이었는데 (Figure 3E, 3F), 이것은 세포들이 agarose gel에 둘러싸여 있기에 세포들 사이의 물질 유동이 상대적으로 적어지면서 파괴된 세포 혹은 세포 자체에서 분비되는 페놀물질들이 인근세포와의 직접적인 접촉을 막아주기 때문인 것으로 사료된다.

배양에서 얻어진 4000여 개의 캘러스를 zeatin, TDZ, IAA 조합으로 한 재분화 배지에 옮겼다. IAA를 1 mg/L로 고정하고 TDZ를 0.01~0.05 mg/L의 농도로 처리하였을 때 TDZ의 농도가 높아질수록 NW800 캘러스는 연황색에서 점점 갈색으로 변하면서 캘러스의 크기도 점점 작아졌으며, NW1898 색깔은 모두 갈색을 띠면서 캘러스의 크기도 별 차이가 없었다. 같은 호르몬 조합에 2 mg/L의 zeatin을 첨가하여 배양하였을 때 NW800 캘러스는 TDZ의 농도가 높아질수록 캘러스 크기가 커지면서 연황색으로부터 녹색이 짙어지다가 TDZ 농도가 0.05 mg/L 농도에서 다시 갈색으로 변하는 경향이 있었으며 NW1898은 zeatin이 첨가된 배지 또는 첨가되지 않은 배지에서 캘러스의 색깔, 크기에서 차이가 없었다 (Table 1).

이와 달리 zeatin을 0.1~0.5 mg/L의 농도의 배지에서 캘러스를 배양하였을 때 NW800 (*C. annuum*)의 캘러스들은 거의 연황색을 띠었고 크기도 별다른 차이가 없이 비교적 일정하였으며 야생종 *C. baccatum* 계통인 NW1898은 zeatin 배지에서 캘러스들은 연 황색을 띠었고 캘러스도 TDZ배지에서 배양한 것보다 컸다. 또한 zeatin 배지에 TDZ를 0.2 mg/L로 고정하여 첨가한 배지에 캘러스들을 치상하였을 때 NW800은 전부 녹색으로 생장이 아주 좋았으나 기관형성이 관찰



**Figure 3.** Photographes of protopalsts isolation, callus formation, and root induction. A, Protoplasts isolated from hypocotyl and cotyledonary tissues of hot pepper; B, Cells at division after 3 weeks of initial protoplast culture; C, Calli derived from semi-solid agarose culture (Left) and liquid culture (Right); D, Calli derived from protopalsts of *C. baccatum*; E, Colonies embedded into semi-solid agarose medium were not browning; F, Calli transferred to liquid culture were turned brown in color.

되지 않았으며 NW1898은 TDZ를 첨가한 것과 첨가하지 않은 배지에서 캘러스의 생장이 별 차이가 없음을 관찰하였다. 이외에도 2ip, BAP, NAA 등 성장조절제들을 여러 가지 농도로 조합하여 캘러스에서 식물체 재분화를 유도하려고 시도 하였으나 (결과 생략) 대부분 위의 결과와 비슷하게 캘러스가 커지기만 하거나 고사하는 현상이 관찰되었다.

**적 요**

고추 *C. anuumm*, *C. bacatum*, *C. chacoense*의 하배축,

자엽 및 본엽을 원형질체 분리재료로 하여 실험한 결과, 원형질체 분리를 위해서 세포벽 분해효소로 1% Cellulysin과 0.25% Macerozyme 효소의 조합과 삼투조절제로 0.65 M sorbitol을 사용하였다. 항산화제인 MES를 효소용액에 첨가하여 줌으로써 원형질체 분리과정에서 발생하는 갈변을 억제시킬 수 있었다. 원형질체를 수정된 K8p 배지에 1~5 mg/L zeatin, 0.5 mg/L IAA, 0.1~0.5 mg/L TDZ, 1 mg/L 2,4-D를 첨가하여 배양하였을 때 5일에 분열을 시작하였으며 원형질체에서 얻어진 colony들을 agarose가 첨가된 반고체 배지에 고정하여 배양하는 방법이 액체평판배양 방법보다 더 효과적 이었으며 이 방법은 세포배양시 분비되는 페놀류 물질로 인

**Table 1.** The effects of TDZ and zeatin on callus growth and color when colonies derived from protoplast of two different species of *capsicum* were transferred to various cultural media.

Plant Growth Regulators (mg/L)			NW800 ( <i>C. annuum</i> )		NW1898 ( <i>C. baccatum</i> )	
			Callus Color	Callus Size	Callus Color	Callus Size
TDZ	IAA					
0.01	1		Light Yellow	*+++	Brown	++
0.02	1		Light Brown	+++	Brown	++
0.03	1		Light Brown	+++	Brown	++
0.04	1		Brown	++	Brown	++
0.05	1		Light Brown	++	Brown	++
TDZ	zeatin	IAA				
0.01	2	1	Yellow	++++	Brown	++
0.02	2	1	Light Green	++++	Brown	++
0.03	2	1	Green	+++	Brown	++
0.04	2	1	Dark Green	+++++	Brown	++
0.05	2	1	Brown	+++	Brown	++
zeatin	IAA					
0.1	1		Light Yellow	+++	Brown	++
0.2	1		Light Yellow	+++	Light Brown	+++
0.3	1		Light Brown	+++	Light Brown	+++
0.4	1		Light Brown	+++	Yellowsh	+++
0.5	1		Brown	+++	Yellowsh	+++
zeatin	TDZ	IAA				
0.1	0.2	1	Green	++++	Light Yellow	++
0.2	0.2	1	Green	++++	Light Brown	++
0.3	0.2	1	Green	+++	Light Yellow	+++
0.4	0.2	1	Green	++++	Light Yellow	++
0.5	0.2	1	Green	+++	Brown	++

+++ : More than 1 cm in diameter

++ : Between 0.5~1 cm in diameter

+ : Less than 0.5 cm in diameter

한 갈변을 방지할 수 있었다. 세 가지 다른 고추속의 원형질체 배양에서 얻어진 4000여 개의 캘러스를 식물생장조절제인 TDZ, IAA, 2ip, BAP, NAA, zeatin을 이용한 100가지 다양한 조합의 재분화 배지에 옮겼으나 캘러스가 커지거나 고사하는 현상만 관찰되었을 뿐 줄기로 재분화된 식물체는 얻을 수 없었다.

## 인용문헌

- Cardi T, Earle ED (1997) Production of new CMS *Brassica oleracea* by transfer of 'Anand' cytoplasm from *B. rapa* through protoplast fusion. *Theor Appl Genet* 94:204-212
- Christopher T, Polaram B, Subhash K (1991) Differential in vitro morphogenetic response in hypocotyl segments of *Capsicum annuum* L., India J. Exp. Bio. 29:68-69
- Danota MD, Perucco E, Mozzetti C (1989) Protoplast culture and callus proliferation from cotyledons of *Capsicum annuum* L., Adv. Hortic. Sci. 3:17-20
- Diaz I, Moreno R, Power JB (1988) Plant regeneration from protoplast of *Capsicum annuum*. *Plant Cell Rep* 7:210-212.
- Glimelius K, Mats D, Hugo FF (1986) Selection and enrichment of plant protoplasts heterokaryons of *Brassicaceae* by flow sorting. *Plant Sci* 45:133-14
- Liu W, Parrott WA, Hildebrand DF, Collins GB, Williams EG (1990) *Agrobacterium*-induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and formation of shoot-like structures expressing introduced genes. *Plant Cell Rep* 9:360-364
- Manoharan M, Sree Vidya CS, Lakshmi Site G (1998) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in hot chilli (*Capsicum annuum* L. var *pusa jwala*). *Plant Sci* 131:77-83
- Marla LB, Sankhla N, Joshi S, Sanhla D (1996) Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Rep* 15:536-540
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid grown and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Niedz RP, Stephans CT, Murakishi HH (1987) Isolation pepper protoplasts (Abstract): *Phytopathology* 77:17-47
- Nishio T, Sakata Y, Yamagishi H, Tabei Y, Salo T, Takayanagi K (1989) Protoplast culture in vegetable crops: Development and improvement of culture procedure; *Bull. Natl. Res. Inst. Veg. Ornamental plants* Tea In: Manoharan M, Sree Vidya CS, Lakshmi Site G (1998) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in hot chilli (*Capsicum annuum* L. var *pusa*

- jwala*). Plant Sci 131:77-83
- Oochuia-Alijo N, Ireta-Mereno L** (1990) Culture differences in shoot forming capacity of hypocotyl tissue of chill. Sci. Hortic 42:21-28.
- Prakash AH, Snakara Rao K, Ukaya Kumar M** (1997) Plant regeneration from protoplast of *Casicum annuum* L. cv California Wonder. J Biosci 22 (3): 339-344
- Sigareva MA, Earle ED** (1997) Direct transfer of a cold-tolerant Ogura male-sterile cytoplasm into cabbage (*Brassica oleracea* ssp. *capitata*) via protoplast fusion. Theor Appl Genet 94:213-220

(접수일자 2001년 5월 10일)