

강남콩(*Phaseolus vulgaris* L.) Callus의 原形質體 遊離 및 培養

金相九·禹濟昌·李光雄
(서울대학교 自然科學大學 植物學科)

Isolation and Culture of *Phaseolus vulgaris* L. Callus Protoplasts

Kim, Sang-Gu, Je Chang Woo and Kwang-Woong Lee

(Department of Botany, Seoul National University, Seoul)

ABSTRACT

The isolation and culture of protoplasts from hypocotyl originated callus of *Phaseolus vulgaris* cv. Damyang were carried out. The maximum protoplast yield of 4.6×10^5 per gram fresh callus, using the 13-day-old callus, was obtained by digestion for 6 hours in the enzyme solution. After 10 day-culture of the isolated callus protoplasts, plating efficiency was 50%. Thereafter, cell cluster formation was effectively stimulated by eliminating mannitol from the liquid culture medium, and followed by leading to callus formation on an agar medium after 3 weeks of the liquid culture.

緒 論

植物體에서 遊離된 原形質體는 實驗植物學의 諸 分野에 널리 응용되어 오고 있으며, 특히 植物 育種의 차원에서는 이미 여러 곡물과 소채류에서 원형질체의 유리 및 배양이 成功의으로 수행되어 일부 식물체에서는 原形質體로부터 完全한 식물체로의 再分化가 이루어진 바 있다 (Vasil and Vasil, 1980; Gamborg *et al.*, 1981).

콩科 植物은 重要 작물에 속하고 있으나 組織培養을 통한 完全한 식물체로의 再分化에는 많은 어려운 점이 지적되어 왔다. *Phaseolus*屬에 있어서의 원형질체 배양에 관한 研究는, *P. vulgaris* cv. Pinto의 葉肉組織으로부터 유리한 원형질체를 배양한 結果 60時間 후에 제 1 분열이 시작되었으며 약 3주 후에 細胞塊(cell cluster)를 形成하였으나 callus의 生長은 관찰하지 못하였으며 (Pelcher *et al.*, 1974), *P. aureus*의 뿌리로부터 원형질체를 유리, 배양한 결과 액체배지에서 3주 후에 callus로 生長하였음을 보고한 것 (Xu *et al.*, 1981)이 있다.

강남콩의 조직배양을 利用한 cytokinin 代謝에 관한 研究를 최근 수년간 수행하여 온 저자들은 (Mok *et al.*, 1980; Armstrong *et al.*, 1981; Kim *et al.*, 1982) 이와 관련하여 본 연구에서는 *P. vulgaris* cv. Damyang의 下胚軸으로부터 유래된 callus에서 多量의 원형질체를 유리하는데 要求되는 最適 조건을 究明하고, 또한 이들 유래된 원형질체로부터 callus로의

이 논문은 1983년도 문교부 학술연구조성비(ED 83-404)에 의하여 기록되었음.

생장을 유도하고자 하였다.

材料 및 方法

植物材料 및 試藥. 실험에 使用된 강남콩 (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Damyang)은 본 研究室에서 재배, 採種한 것이며, cellulase (Onozuka RS)와 macerozyme (Onozuka R-10)은 Yakult Biochemical Co., kinetin (N^6 -furfuryladenine)은 Sigma Chemical Co.로부터 각각 구입하였고 picloram (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid)은 Dow Chemical로부터 기증받은 것이다.

강남콩의 callus 組織培養. 조직배양에 使用한 배지는 Murashige and Skoog (1962)의 기본 배지에 sucrose (30 g/l), myo-inositol (100 mg/l), thiamine-HCl (1 mg/l), nicotinic acid (5 mg/l), pyridoxine-HCl (0.5 mg/l), picloram (2.5 μ M) 및 kinetin (5 μ M)을 첨가한 것이다. 배지의 pH는 1 N NaOH를 사용하여 5.7로 조정하였으며 Difco Bacto-agar를 0.8% (w/v)되게 첨가하여 agar를 용해시킨 후 100 ml Erlenmeyer flask에 50 ml씩 나누어 넣고 121°C에서 15분간 멸균하여 使用하였다. 한편, 강남콩의 종자를 95% (v/v) ethanol과 2.5% (v/v) Clorox에 표면살균시키고 무균상태하에서 7일간 발아시켜 下胚軸의 절편을 얻었다. 이 절편을 上記 배지에서 3주일간 培養하여 callus를 유도시키고, callus는 다시 새로운 배지에 繼代培養하면서 이를 원형질체 유리의 試料로 使用하였다.

原形質體의 遊離. 원형질체를 유리시키기 위한 酵素溶液의 組成은 Table 1과 같으며, 이를 5 mM의 phosphate buffer에 용해시켜 使用하였다. 13일간 배양된 callus 組織 3g을, 0.45 μ m의 Millipore filter paper로써 멸균한 효소용액 20 ml에 넣고 90 rev/min, 30°C의 진탕 항온기에서 진탕하여 원형질체를 유리시켰다. 효소용액에서 5시간 처리한 후에 pore 직경이 200 μ m되는 나일론 천을 4겹으로하여 효소-조직의 혼합액을 濾過하여 細胞塊를 제거시키고 (prefiltration), 여과된 혼합액을 다시 1시간 동안 진탕하였다. 전체 6시간 동안 진탕한 후에 저속원심분리 (100 g, 9분)로 효소용액을 제거한 후, 얻어진 원형질체는 0.6 M mannitol을 첨가한 callus 유도 배양액으로 3회 저속원심분리함으로써 세척하였다. 최종적으로 원형질체의 濃度가 10^5 protoplasts/ml 되도록 배양액에 현탁시켜 배양시료로 利用하였다.

原形質體 培養. Glass petri dish (ϕ 5.5 cm)에 callus 배양시와 같은 한천배지를 얇게 편 후 유리된 원형질체 현탁액을 0.5 ml 정도 넣고 Parafilm으로 밀봉하여 27°C의 暗所에서 배양하였다. 배양 후 10일째 plating efficiency를 측정하였고 (Morgan and Cocking, 1982), mannitol을 제거한 callus 배양액에 옮겨서 계대배양하였다. 세포괴가 형성된 후에는 다시 한천배지

Table 1. Enzyme solution for the isolation of *P. vulgaris* callus protoplasts

Ingredients	Concentration
Cellulase (Onozuka RS)	2.5 %
Macerozyme (Onozuka R-10)	1.5 %
Mannitol	0.6 M
Calcium chloride	0.1 %
pH	5.7

에 옮겨서 지속적인 성장을 유도하였다.

結果 및 考察

강남콩 (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Damyang)의 하배축으로부터 유도된 callus 조직에서 원형질체를 유리시키는데 要求되는 최적 효소용액의 조건(Table 1)에서, 배양 13일째 되는 callus 조직을 사용하여 5시간 동안 효소처리를 한 후 prefiltration시켜 효소용액 속에 남아 있는 細胞塊를 제거한 다음 다시 1시간 더 酵素液을 처리하였을 때 원형질체의 최대 수확량을 나타냈으며 이 때 조직 1g당 4.6×10^5 개의 원형질체가 유리되었다(Fig. 1 및 Fig. 3A).

원형질체를 수확하기 1시간 전에 prefiltration한 것은 유리 원형질체의 比率을 增加시키는데 매우 효과적이었다. 이는 prefiltration으로 세포괴를 제거시킴으로써 더 이상의 單細胞(undigested single cell)가 유리되지 않기 때문으로 사료된다. 6시간 이상의 효소액 처리는 이미 유리된 原形質體의 파괴를 유발하였으며, 결과적으로 원형질체의 數的 감소를 초래하였다. Pinto bean의 葉肉組織으로부터 원형질체의 遊離를 위해서, 저농도 (cellulase 0.25%, pectinase 0.25%)의 효소용액으로 장시간 (12~18시간) 처리한 結果 (Pelcher et al., 1974)에 비하면 본 研究에서 실시된 강남콩의 callus 조직에 있어서는 pinto bean의 경우보다 고농도 (cellulase 2.5%, macerozyme 1.5%)의 효소용액으로 단시간(6시간)의 처리가 더욱 효과적이었음을 알 수 있었다. 강남콩의 callus 조직 生長은 배양 10일 경과시부터 5주째까지 사이에서는 直線型의 성장을 나타내기 때문에 (Kim et al., 1982), 初期生長에 속하는 callus 조직으로 배양후 13일째의 조직을 使用했을 때가 원형질체의 '유리'에 最適으로 나타났다 (Fig. 2). Callus의 生長기간이 더 길어질수록 원형질체 수확량이 감소되는 것은, 담배의 액

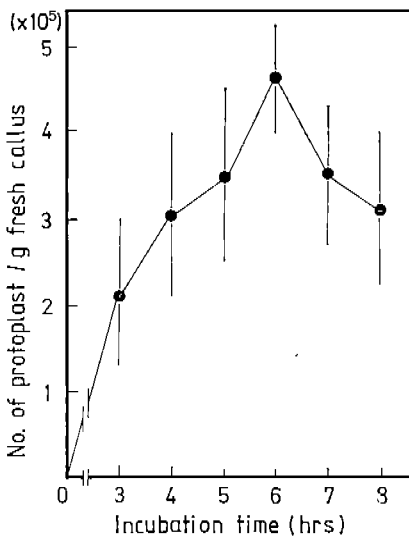


Fig. 1. Protoplast yield as related to length of incubation time in enzyme solution. Protoplasts were isolated by prefiltration method using 13-day-old callus.

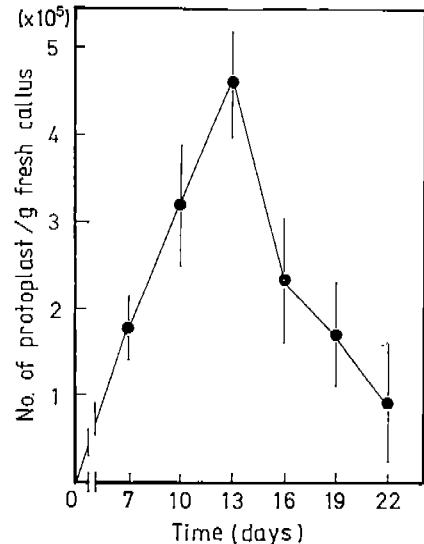


Fig. 2. Protoplast yield as related to age of callus culture. Protoplasts were isolated by prefiltration method.

체배양 세포에서 原形質體 유리비율의 감소는 試料 組織의 배양기간이 길어짐에 따른 細胞壁의 肥厚에 기인된다는 보고(Uchimiya and Murashige, 1974)와 마찬가지로, callus細胞의 세포벽 비후로 세포벽이 효소용액에 쉽게 分解되지 않는 데에도 기인되는 것으로 사료된다.

유리된 원형질체는 培養液으로 세척하여 petri dish에서 배양을 시도하였던 바, 배양후 4 일째에는 원래 원형질체의 모양인 球形에서 橢圓形으로 伸長되면서 분열을 시작하였다. 원형질체의 분열양상은 세포판이 형성되는 것과 비슷한 形態로 分裂하는 것이 일반적이었으

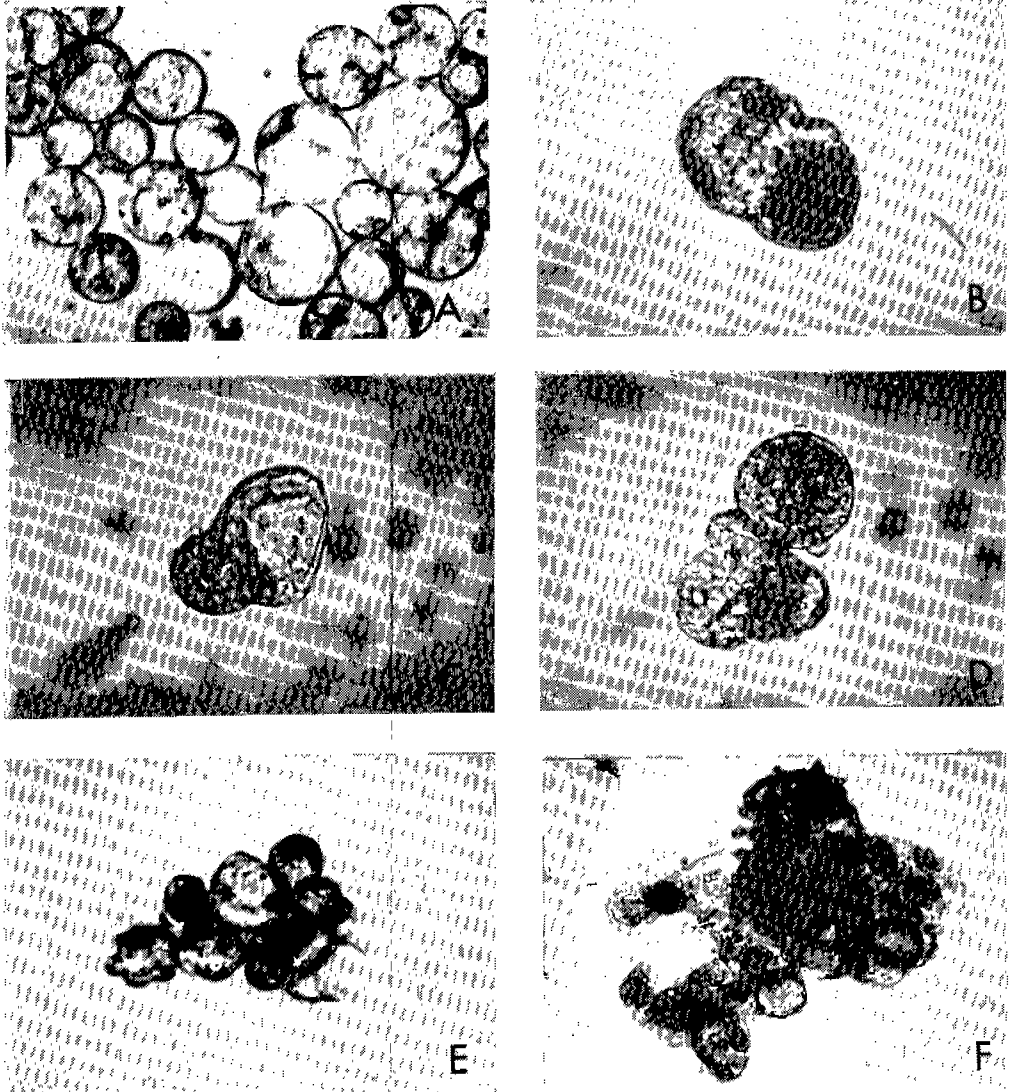


Fig. 3. Development of *P. vulgaris* callus protoplasts.

A, Isolated protoplasts ($\times 190$). B, Cell division by formation of cell plate after 4 days of culture ($\times 250$). C, Bud formation after 4 days of culture ($\times 250$). D, Dividing cells after 10 days of culture ($\times 250$). E, Cell cluster after 3 weeks of culture ($\times 130$). F, Cell cluster leading to callus formation after 4 weeks ($\times 120$).

며 (Fig. 3B), 일부 세포는 突起를 형성한 후 細胞質이 이동하거나 (Fig. 3C), 또는 2~3개의 돌기를 동시에 형성하면서 분열하는 형태도 관찰되었다. 돌기를 형성하는 분열양상은 담배의 藥肉組織으로부터 유리시킨 원형질체의 분열과정에서도 보고된 바 있다 (Meyer and Abel, 1975).

배양 후 10일째, 분열세포는 4細胞期에 도달하며 (Fig. 3D), 이 때 plating efficiency를 측정할 결과는 50%로서 pinto bean의 엽육조직으로부터 유리된 원형질체에서 7일째 측정할 plating efficiency가 40%로 보고된 것 (Pelcher *et al.*, 1974) 보다는 높은 分裂能力을 나타냈다. 이 때 배지로부터 mannitol을 제거하고 계대배양을 시행하였다. 배양 후 3주째에는 細胞塊가 形成되었으며 (Fig. 3E), 형성된 세포피를 한천배지에 옮겨 지속적인 生長을 유도하였다 (Fig. 3F). Mannitol을 제거시킨 배지에서 자란 組織은 mannitol을 제거하지 않은 배지에서 자란 조직보다 세포분열 능력이 왕성한 것으로 나타났으며 조직의 老衰化도 지연되었다. 이와 비슷한 例는 토마토의 엽육조직으로부터 유리된 원형질체의 배양에서 mannitol을 점차 감소시켰을 때 callus의 유도에 효과적이었다는 보고 (Morgan and Cocking, 1982)에서도 볼 수 있다.

강남콩의 원형질체 培養을 통한 細胞塊의 유도를 이룩한 이상의 결과는 앞으로 강남콩의 조직배양을 통한 hormone 代謝의 遺傳學的 研究에 원형질체에서 유래된 callus의 利用을 가능케 할 것이다.

摘 要

강남콩 (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Damyang)의 下胚軸에서 유도한 callus로부터 酵素液을 사용하여 原形質體를 遊離하고 이를 培養하였다.

13일간 배양된 callus 조직을 6시간동안 효소처리한 결과, 조직 1g당 4.6×10^5 개의 원형질체가 유리되었다. 원형질체 배양 10일 경과 후의 plating efficiency는 50%였으며 이 때부터 mannitol을 제거한 액체배지에서 細胞塊로의 誘導가 보다 효과적이었고, 배양 3주후에는 형성된 세포피를 한천배지에 옮김으로써 지속적인 生長이 이룩되었다.

參 考 文 獻

- Armstrong, D. J., S.-G. Kim, M. C. Mok and D. W. S. Mok. 1981. Genetic regulation of cytokinin metabolism in *Phaseolus* tissue cultures. In *Metabolism and molecular activities of cytokinins*, J. Guern and C. Peaud-Lenoel (eds.), pp. 97~104. Springer-Verlag, Berlin.
- Gamborg, O. L., J. P. Shyluk and E. A. Shahin. 1981. Isolation, fusion and culture of plant protoplasts. In *Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture*, T. A. Thorpe (ed.), pp. 115~153. Academic Press, New York.
- Kim, S.-G., J. H. Song and K.-W. Lee. 1982. Hormonal effect and cytokinin autonomy in callus culture of *Phaseolus vulgaris* L. *Korean J. Bot.* 25 : 161~168.
- Meyer, Y. and W. O. Abel. 1975. Budding and cleavage division of tobacco mesophyll protoplasts in relation to pseudo-wall and wall formation. *Planta* 125 : 1~13.
- Mok, M. C., D. W. S. Mok, D. J. Armstrong, A. Rabakoarihanta and S.-G. Kim. 1980. Cytokinin

- autonomy in tissue cultures of *Phaseolus*: A genotype-specific and heritable trait. *Genetics* 94 : 675~686.
- Morgan, A. and E. C. Cocking. 1982. Plant regeneration from protoplasts of *Lycopersicon esculentum* Mill. *Z. Pflanzenphysiol.* 106 : 97~104.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473~497.
- Pelcher, L. E., O. L. Gamborg and K. N. Kao. 1974. Bean mesophyll protoplasts: Production, culture and callus formation. *Plant Sci. Lett.* 3 : 107~111.
- Uchimiya, H. and T. Murashige. 1974. Evaluation of parameters in the isolation of viable protoplasts from cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* 54 : 936~944.
- Vasil, I. K. and V. Vasil. 1980. Isolation and culture of protoplasts. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 11B: 1~19.
- Xu, Z-H., M. R. Davey and E. C. Cocking. 1981. Isolation and sustained division of *Phaseolus aureus* (Mung bean) root protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol.* 104 : 289~298.

(1983. 12. 5. 接受)