

Murashige와 Skoog 수정배지를 사용한 담배 (*Nicotiana tabacum* L.) 재배종의 原形質體 培養

金 相 九 · 金 大 載
(서울대학교 自然科學大學 植物學科)

Protoplast Culture in Five Cultivars of *N. tabacum* L. by Modified Murashige and Skoog Medium

Kim, Sang-Gu and Dae Jae Kim

(Department of Botany, Seoul National University, Seoul)

ABSTRACT

Leaf mesophyll protoplasts from five cultivars of tobacco (*N. tabacum* L.) were cultured. The protoplasts did not survive in culture medium containing Murashige and Skoog inorganic salts for over 6 days. NH_4NO_3 and $\text{FeSO}_4 \cdot \text{Na}_2\text{EDTA}$ concentration of Murashige and Skoog medium were toxic in tobacco leaf mesophyll protoplast culture. Therefore we investigated optimum condition in Murashige and Skoog medium. High plating efficiency was obtained by reducing the concentrations of NH_4NO_3 and $\text{FeSO}_4 \cdot \text{Na}_2\text{EDTA}$ to 1/3 and 1/10, respectively, on the supplemented with 5 μM IAA, 0.5 μM 2,4-D, 5 μM BAP. Plants were regenerated from protoplast-derived calluses.

緒 論

식물 原形質體 배양은 組織培養과는 달리 더욱 복잡한 재배 배양조건들이 요구되어 현재 까지도 한정된 범위의 식물종에서만 배양이 이루어졌다(Gamborg *et al.*, 1973; Gleba and Sytnik, 1984). 원형질체 배양에 要求되는 조건들 중에서 특히 배양배지의 組成과 식물호르몬의 선택이 결정적인 경우가 많다.

Nagata and Takebe(1971)는 담배(*N. tabacum* L. cv. Xanthi) 엽육원형질체 배양에서 MS 기본배지의 無機鹽類 量을 일부 조정한 배지를 使用하였다. 즉 NH_4NO_3 와 KNO_3 및 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 1/2로 감량한 반면, KH_2PO_4 와 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 각각 4배와 3.3배 증량하고 식물호르몬으로는 α -Naphthaleneacetic acid(NAA)와 Benzylaminopurine(BAP)을 첨가하였을 때 원형질체의 細胞分裂 유도에 성공하였다. 동일한 담배 재배종의 원형질체 배양에서 Shepard and Totten(1975)은 White(White, 1963)배지와 NT(Nagata and Takebe, 1971) 배지를 變用하였는데 대부분의 무기영양소를 1/10~1/20로 희석 사용함으로써 적은 수의 원

본 연구는 1985년도 분교부 유전공학 연구비의 지원에 의한 것의 일부임,

형질체 배양에서도 효과적으로 이들 원형질체의 生存力을 증진시킬 수 있었다. 이때 감량 조정된 무기염류는 NH_4NO_3 및 KNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$ 및 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 등이다. 한편 담배 栽培種 'Maryland' 엽육원형질체 배양에서는 NaCl 을 첨가한 salire media를 사용하였으며, MS기본배지에서 NH_4NO_3 를 완전히 제거한 반면, 질소와 potassium 원으로 KNO_3 를 2.5배 증량하고 NH_4Cl 을 補充하였다. 또한 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 25배 증량하였고 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 와 $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$ 는 1/10로 감량하여 좋은 효과를 얻었으며 세포분열은 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)와 BAP를 첨가하여 誘導하였다. Uchimiya and Murashige (1976)는 담배 (*N. tabacum* L.)의 칼루스 조직으로부터 유리한 原形質體 배양에서 MS 기본배지가 最適임을 실험적으로 설명하였으며, 식물 호르몬은 NAA와 kinetin 또는 BAP를 사용함으로써 가장 높은 빈도의 細胞分裂을 유도하였다. 한편 담배 野生種 *N. debneyi*의 엽육원형질체 배양에서는 NT배지를 기본배지라고 $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$ 와 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 1/2가량 줄여 사용하였으며 (Scowcroft and Larkin, 1980), *N. sylvestris*의 葉肉原形質體 배양에서는 NH_4NO_3 의 양이 MS배지와 비교하여 1/7가량 감량되고 KNO_3 와 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 의 양이 각각 1.25배, 2배씩 증량된 K_3 배지를 사용하였으며, 세포분열은 2가지의 오옥신 (NAA+2,4-D)에 BAP를 添加함으로써 誘導되었다 (Muller et al., 1983).

이와 같이 식물원형질체 배양에서 일반적으로 배양이 쉽다고 하는 담배 원형질체 배양에 있어서도 사용하고 있는 培養地의 조성이 연구자마다 달라서 일반화된 방법론적 提示가 없는 실정이다. 본 연구에서는 담배 원형질체 배양에 있어 배양배지의 조성을 MS기본배지로부터 이를 일부 수정함으로써, 여러가지 담배 재배종에 共通的으로 적용할 수 있는 실험적 가능성을 얻었기에 그 연구 결과를 報告하고자 한다.

材料 및 方法

植物材料 및 試藥. 본 연구에 사용한 담배 (*Nicotiana tabacum* L.) 재배종은 Wisconsin #38, Turkish (Aromatic tobacco), NC 2326, NC 82 및 Burley 21이며 본 연구실에서 系統을 유지하면서 採種한 것을 과중하여, 栽培하면서 잎의 크기가 최대로 자랐을 때 이것을 채취한 다음 試料로 사용하였다. Cellulase (Onozuka R-10)와 macerozyme (Onozuka R-10)은 Yakult Biochemical Co.로부터 구입하였고, mannitol은 Hayashi Pure Chemical Co.로부터 구입하였다. Indole-3-acetic acid (IAA), NAA, 2,4-D, BAP 및 kinetin은 Sigma Chemical Co.로부터 구입하여 사용하였다.

原形質體의 遊離. 과중 후 10~12주가 되었을 때 성숙한 담배 잎을 채취하여 원형질체 유리의 시트로 사용하였다. 잎을 적절한 크기로 잘라내어 70% ethanol에 1분간 담근 후 1.05% sodium hypochlorite에 10분간 담가 표면살균하고, 멸균 증류수로 3회 세척한 다음 잎의 下表皮를 제거하였다. 액체 배양액에 酵素를 녹인 원형질체 유리를 위한 효소용액은 $0.45\mu\text{m}$ Millipore filter paper를 통하여 멸균하였고, 이 용액 10ml에 하프피가 제거된 잎 조각을 0.5g 넣어 原形質體를 유리하였다 (Table 1). 원형질체는 항온포판기에서 30°C , 50rpm/min로 진탕하여 유리하였다. 효소용액에서 적정시간 진탕한 후 pore 직경이 $50\mu\text{m}$ 인 나일론 천을 통하여 酵素-原形質體 혼합액을 여과함으로써 남아있는 잎의 부스러기를 제거하였다. 효소용액-원형질체 현탁액을 원심분리 (100g, 2분)하여 상정액인 효소용액을 제거하

Table 1. Protoplast isolation from five cultivars of *N. tabacum* L.

Tobacco cultivar	Osmoticum (M)	Cellulase (%)	Macerozyme (%)	Incubation time (h)
Wisconsin #38	0.5	1.5	0.3	5.0
Turkish (Aromatic)	0.4	1.0	0.3	4.5
NC 2326	0.5	0.8	0.2	4.5
NC 82	0.6	0.5	0.2	3.5
Burley 21	0.5	1.0	0.3	3.5

고, 다시 액체 培養液으로 현탁한 다음 3회 원심분리하여 원형질체를 精製하였다. 정제된 원형질체를 배양의 최종 시료로 사용하기 위하여 5×10^4 protoplasts/ml가 되도록 원형질체의 수를 조정하였다.

原形質體 培養. 담배 조직배양에 폭넓게 이용되는 MS기본배지 (Murashige and Skoog, 1962)를 원형질체 배양배지로 선택하고 원형질체 배양의 최적 배지조성을 결정하고자 하였다. 먼저 MS기본배지로부터 약간의 無機鹽類의 量을 변형시키면서 최적의 무기배지를 결정하였으며, 有機營養素로 sucrose (10g/l), myo-inositol (100 mg/l)과 비타민으로 thiamine·HCl (1 mg/l)을 첨가하였다. 삼투조절제 mannitol은 각 재배종에 따라 適正濃度를 결정하여 첨가하였다 (Table 1). 또한 세포분열 유도에 최적인 옥신과 cytokinin의 조성 및 농도를 결정하여 배지에 첨가하였다. 배지의 pH는 0.1 N NaOH를 사용하여 autoclave전에 5.8로 조정하였다. 원형질체 배양은 semi-solidified agar 培養法을 이용하였다 (Nagata and Takebe, 1971). 원형질체가 현탁된 액체 배양액과 액체상태의 agar배지 (40°C, 0.8%)를 동량 혼합하여, 이를 직경 .55mm 유리 Petri dish에 얇게 깔아 굳힌 다음 Parafilm으로 봉하여 培養하였다. 처음 24시간 동안 암배양실에 두었다가 다음 48시간동안은 저광도 (500 lux) 명배양소에 옮겨두었다. 이후의 배양은 27°C, 2,000 lux, 광주기 16/8시간으로 維持하면서 세포분열 및 分化를 유도하였다. 배양 10일후 plating efficiency를 測定하였고, 배양 4주 후 형성된 細胞塊는 새로운 배지로 옮겨 칼루스를 유도하였다. 칼루스 배양배지는 삼투조절제를 1/3로 감량하거나 배제하여 칼루스 生長을 촉진시켰다. 녹화된 칼루스는 再分化 배지로 옮겨 shoot와 뿌리를 유도하였고, 어린 식물체는 질석과 트양에 순차적으로 移植하여 완전한 식물체로 栽培하였다.

結果 및 考察

담배 (*Nicotiana tabacum* L.) 栽培種들의 葉肉組織으로부터 原形質體를 유리하였다. 下表를 除去한 잎조직 0.5g을 Table 1과 같은 條件의 효소용액 10ml에 넣어 適正時間 동안 震盪하였을 때 平均 5.0×10^6 protoplasts/ml를 얻을 수 있었으며, 栽培種에 따라 최적 효소 농도 및 유리시간에 약간의 差異를 보였고 이 條件에서 적정시간 이상 浸漬하였을 때는 점차적으로 原形質體가 破壞되었으며, 결과적으로 원형질체의 數적 減少를 招來하였다.

원형질체 培養은 세포벽의 再生과 세포분열의 誘導에 따른 복잡한 諸般 條件들이 要求되어 연구 초기부터 많은 어려움이 제기된 바 있다. 제반 條件들중에서 특히 적절한 배양배

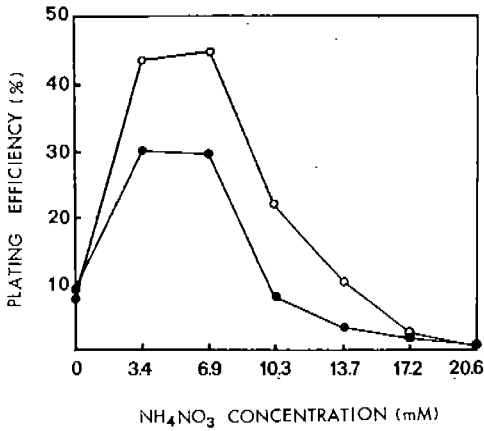


Fig. 1. Effect of NH_4NO_3 concentration in MS medium on protoplast culture. Plating efficiency was determined after 10 days of culture. $\text{FeSO}_4 \cdot \text{Na}_2\text{EDTA}$ concentration 10 μM (○) and 100 μM (●).

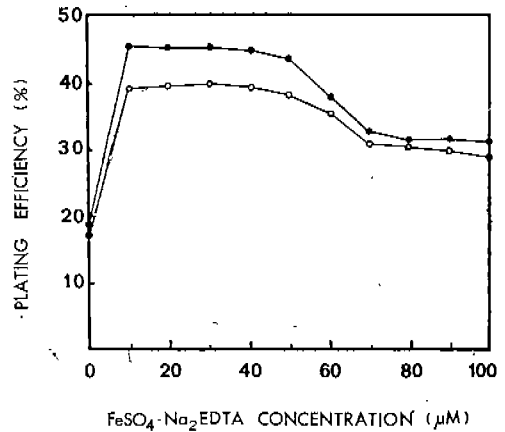


Fig. 2. Effect of $\text{FeSO}_4 \cdot \text{Na}_2\text{EDTA}$ concentration on protoplast culture medium (MS). Plating efficiency was calculated after 10 days of culture. NH_4NO_3 concentration 3.4 mM(○) and 6.9 mM(●).

지와 호르몬의選擇은 원형질체 배양의 決定的인 要因으로서, 많은 研究者들에 의해 조지 배양배지로 考案된 基本배지에 대한 檢討와 修正이 이루어졌다.

본 研究에서는 배양배지로 MS기본배지를 사용한 결과 원형질체의 生存力에 致命的인 영향을 미쳐서 배양 6일 후 모든 원형질체는 쭈그러들면서 生存력을 잃었다. 따라서 원형질체 배양배지로서 MS기본배지에 대한 검토가 必要하였다. 특히 MS기본배지의 NH_4NO_3 농도는 매우 有毒하였으며 (Fig. 1), 이와같은 암모늄이온의 阻害效果는 몇몇 연구자들에 의해 指摘된 바와 一致하였다 (Gamborg and Shyluk, 1970; Zapata *et al.*, 1981). 過量의 NH_4NO_3 가 원형질체 배양에 사용될 때 세포내 重要 代謝經路인 TCA회로가 攪亂되어 細胞內 대사 및 세포분열이 抑制된다고 보고하였다 (Zapata *et al.*, 1981). 그러나 세포내 암모늄이온의 缺乏은 세포벽재생에 必要한 物質의 生産이 制限됨으로 정상적인 세포분열을 일으키지 못함도 指摘되었다 (Meyer and Abel, 1975). 이처럼 원형질체 배양시 NH_4NO_3 의 量的 調整은 필수적으로 요구되며, 조정의 정도는 연구자마다 달라 一貫性이 없고 시료에 따라 서로 變形이 가해지고 있다. 본 研究에서는 NH_4NO_3 가 MS基本농도의 1/3수준(6.9 mM)일 때 원형질체의 最高 生存력을 보였으며, 1/6농도(3.4 mM)에서도 비교적 높은 生存력이 維持되었다. 그러나 1/6이하의 농도에서는 암모늄이온의 缺乏現象을 보여 오히려 生存력이 減少하였으며 세포분열을 일으키는 원형질체의 수도 급격히 감소하였다 (Fig. 1). 이와같은 NH_4NO_3 의 양적 조정 효과는 토마토와 감자 原形質體 培養에서도 보고된 바 있다 (Zapata *et al.*, 1981; Bokelmann and Roest, 1983).

한편 $\text{FeSO}_4 \cdot \text{Na}_2\text{EDTA}$ 는 MS 기본농도의 1/10~1/2 (10 μM ~50 μM) 수준에서는 원형질체의 生存에 크게 영향을 미치지 않았다 (Fig. 2). 그러나 MS기본농도(100 μM)와 1/10농도에 있어서의 원형질체의 生存率 비교 결과 MS배지 기본농도의 有害效果는 뚜렷이 나타났다. 즉, Fig. 1에서 보이는 바와 같이 MS 기본농도를 사용했을 때는 30%가량 원형질체가

Table 2. Response of *N. tabacum* cv. Wisconsin #38 protoplasts to various hormones in the plating medium*

Auxins (μM)			Cytokinins (μM)										
NAA	IAA	2, 4-D	Kinetin					BAP					
			0	0.5	2.5	5.0	10.0	0	0.5	2.5	5.0	10.0	
10.0	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	10.0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	0	10.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
5	0.5	0	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
5	0	0.5	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
5	0.5	0.5	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+

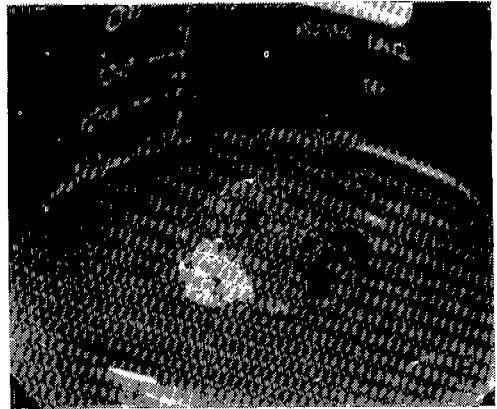
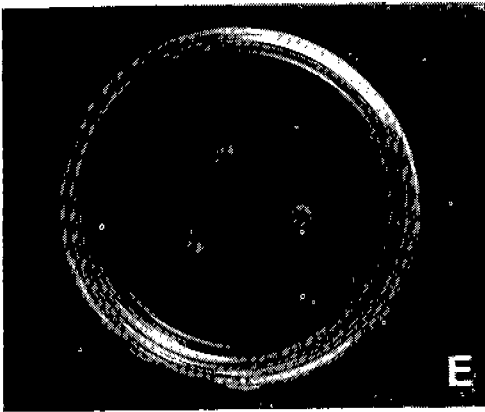
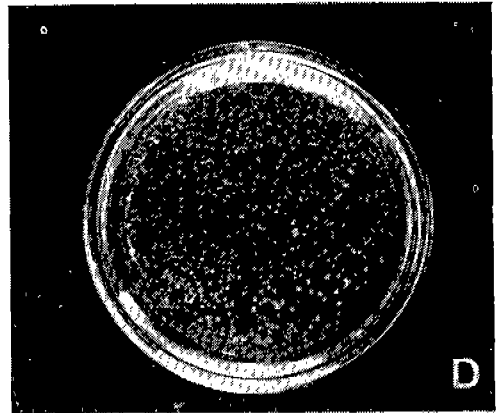
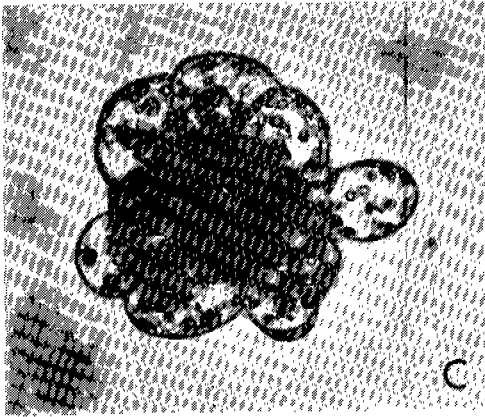
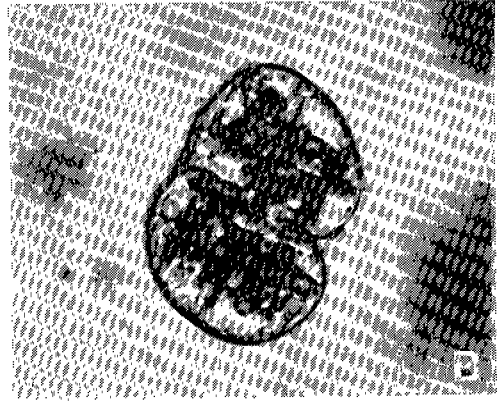
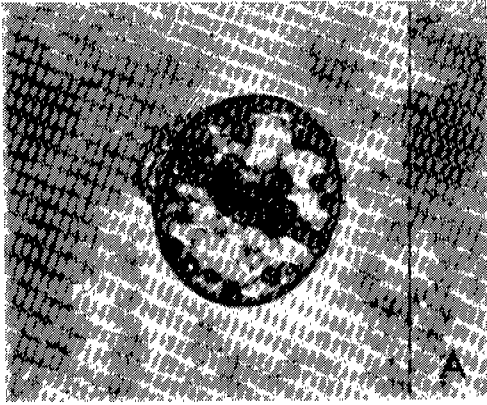
Protoplasts were plated at a density of 5×10^4 protoplasts/ml. Plating efficiency was calculated after 10 days of culture. —, no division; +, less than 10% divisions; ++, 10 to 30% divisions; +++, more than 30% divisions. *Modified MS media were used of which NH_4NO_3 and $\text{FeSO}_4 \cdot \text{Na}_2\text{EDTA}$ concentrations were reduced by 1/3 and 1/10, respectively.

Table 3. Protoplast yield and culture of protoplasts in five tobacco (*N. tabacum* L.) cultivars

Tobacco cultivar	Protoplast yield (No./ml)	1st cell division (days)	Plating efficiency (%)	Light requirement (at 1st day)
Wisconsin #38	4.5×10^6	4	40~45	No
Turkish (Aromatic)	5.0×10^6	4~5	50~60	No
NC 2326	7.5×10^6	3~4	50~60	Yes or No
NC 82	5.5×10^6	6	60~70	Yes
Burley 21	5.0×10^6	5	40~50	No

生存한 반면 1/10인 $10 \mu\text{M}$ 을 사용했을 때 45%로 plating efficiency가 높아짐을 볼 수 있었다. 특히 배양시 10^4 protoplasts/ml이하로 원형질체의 수를 낮출 때는 원형질체의 생존률을 더욱 減少시켰다. 이와같은 결과는 Meyer and Abel (1975)의 보고와 一致하는 것으로 높은 농도의 철이온이 원형질체 培養배지에 添加될 경우 원형질체의 생존에 有害한 것으로 思料되었다.

Table 2는 재배종 Wisconsin #38의 원형질체 배양에 있어 MS 基本배지의 NH_4NO_3 를 1/3로 $\text{FeSO}_4 \cdot \text{Na}_2\text{EDTA}$ 를 1/10로 각각 減量한 배지에서 오옥신과 cytokinin의 組合에 따른 細胞分裂의 頻度を 나타낸 결과이다. 오옥신은 한가지만을 使用하는 것보다 2~3가지를 混用함으로써 그 效果가 크게 增進되었다. Kinetin의 첨가로는 細胞分裂의 유도가 不可能하였으며 BAP처리구에서만 세포분열이 促進되어 세포피의 形成과 함께 칼루스로의 發達을 가능케 하였다 (Fig. 3). 이와같은 호르몬組合에 의한 결과는 Nagata and Takebe (1971), Uchimiya and Murashige (1976) 등이 한가지씩만의 오옥신을 使用한 結果와는 다른 것이다. 그리고 본 研究를 통해 基本濃도에 변형을 가하지 않고 Table 2에 제시된 최적 호르몬 조건에서 培養한 결과 원형질체의 生存은 전혀 이루어지지 않았으나 MS修正배지의 原形質



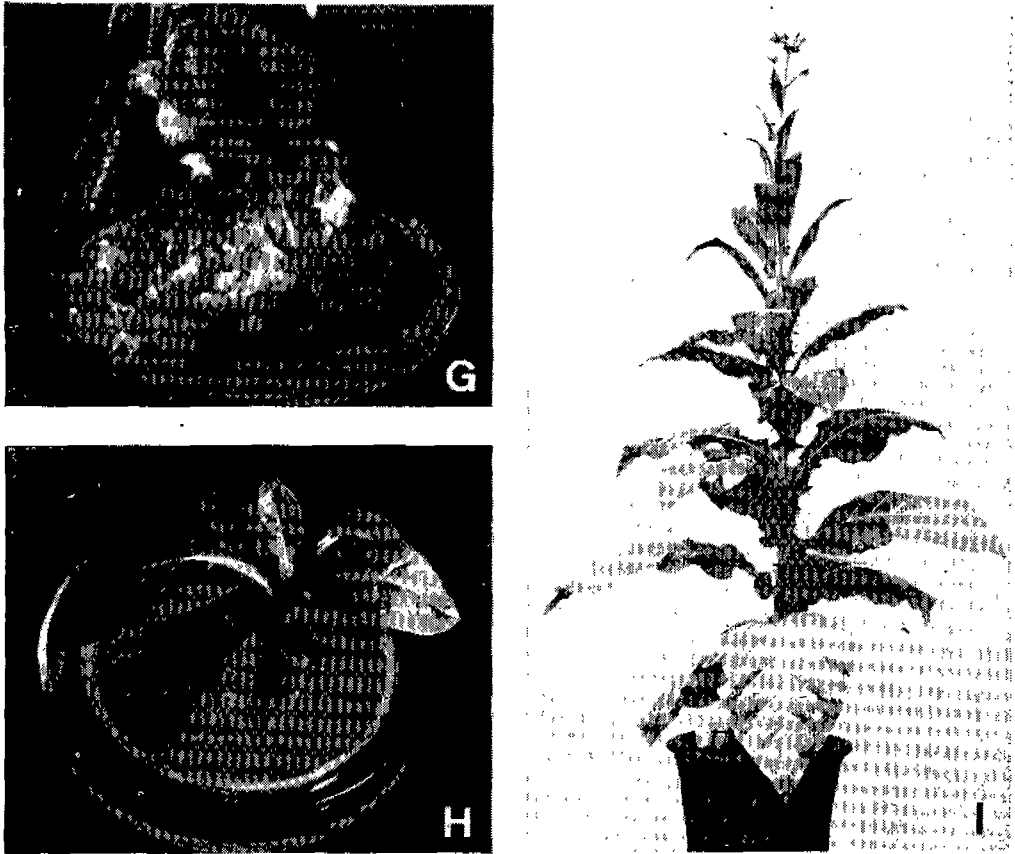


Fig. 3. Protoplasts culture and plant regeneration from *N. tabacum* cv. Wisconsin #38 leaf mesophyll tissue

- A. A protoplast 3 days after plating on modified MS medium.
- B. 4 cells stage after 6 days in culture.
- C. A protoplast-derived colony after 10 to 12 days in culture.
- D. Protoplast-derived colonies.
- E. Protoplast-derived calluses after 7 weeks in culture.
- F. A protoplast-derived organized callus on shoot inducing medium.
- G. Shoots from a protoplast-derived callus after 3 weeks on regeneration medium.
- H. A regenerated plantlet after 13 to 15 weeks in culture.
- I. A protoplast-derived plant showing normal morphology.

體에 대한 생존력 증進效果는 현저하였다. 이는 培養 初期 原形質體의 生存力이 使用배지의 無機염류에 좌우됨을 보여주는 것이다.

재배종 Wisconsin #38과 같이 사용한 다른 재배종의 原形質體 배양에서도 오옥신의 混用과 BAP를 첨가한 배지에서 가장 높은 세포분열을 유도시킬 수 있었다. 재배종마다 plating efficiency에 있어서 多少간의 差異는 나타났지만 50~70%의 높은 細胞分裂頻度を 誘導할 수 있었다.

原形質體로부터 誘導된 칼루스는 mannitol이 除去된 MS基本배지로 옮겨 2,000 lux, 27°C,

16/8시간의 光週期에서 培養하면서 shoot과 뿌리를 유도하여 재분화시켰으며, 土壤에 옮겨 재배함으로써 開花와 함께 產種도 이루어졌다(Fig. 3).

본 研究結果는 담배 原形質體 培養에 一般적으로 適用시킬 수 있는 可能性과 MS修正배지를 開發하였다는 점에서 그 重要性이 있으며 나아가 원형질체 배양을 통한 담배 種 改良의 基礎로 利用될 수 있을 것으로 思料된다.

摘 要

담배(*Nicotiana tabacum* L.) 栽培種 5가지의 原形質體 培養을 통해 植物體再分化에 要求되는 배양배지와 호르몬 組成을 研究하였다. MS배지의 NH_4NO_3 와 $\text{FeSO}_4 \cdot \text{Na}_2\text{EDTA}$ 의 基本濃度는 담배 葉肉原形質體 培養시 원형질체의 生存에 매우 有害한 水準으로 나타났다. 따라서 MS基本배지에서 NH_4NO_3 와 $\text{FeSO}_4 \cdot \text{Na}_2\text{EDTA}$ 의 濃도에 따른 原形質體의 生存率을 조사, 1/3 및 1/10로 각각 減量하였을 때 原형질체는 매우 높은 생존率을 維持할 수 있었다. 또한 오옥신으로는 $5\mu\text{M}$ NAA, $0.5\mu\text{M}$ IAA, $0.5\mu\text{M}$ 2,4-D을 混用하고 $5\mu\text{M}$ BAP를 첨가함으로써 5가지 栽培種에서 50~70%에 달하는 細胞分裂頻度를 얻을 수 있었다. 原形質體로부터 誘導된 칼부스에서는 完全한 植物體 再分化가 이루어졌다.

參 考 文 獻

- Bokelmann, G.S. and S. Roest. 1983. Plant regeneration of protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* cv. Bintje). *Z. Pflanzenphysiol.* 109: 259-265.
- Gamborg, O.L., K.N. Kao, R.A. Miller, L.C. Fowke and F. Constabel. 1973. Cell regeneration, division and plant development from protoplasts (I). *Colloques Internationaux C. N. R. S.* 212: 155-160.
- Gamborg, O.L. and J.P. Shyluk. 1970. The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source. *Plant Physiol.* 45: 598-600.
- Gleba, Y.Y. and K.M. Sytnik. 1984. Techniques of parasexual hybridization. In Protoplast fusion. Shoeman, R. (ed.), pp. 5-32. Springer-Verlag, Berlin.
- 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.
- Muller, J.F., C. Missionier and M. Caboche. 1983. Low density growth of cells derived from *Nicotiana* and *Petunia* protoplasts: Influence of the source of protoplasts and comparison of the growth-promoting activity of various auxins. *Physiol. Plant.* 57: 35-41.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nagata, T. and I. Takebe. 1971. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta* 99: 12-20.
- Scowcroft, W.R. and P.J. Larkin. 1980. Isolation, culture and plant regeneration from protoplasts of *Nicotiana debneyi*. *Aust. J. Plant Physiol.* 7: 635-644.
- Shepard, J.F. and R.E. Totten. 1975. Isolation and regeneration of tobacco mesophyll cell protoplasts under low osmotic conditions. *Plant Physiol.* 55: 689-694.
- Uchimiya, H. and T. Murashige. 1976. Influence of the nutrient medium on the recovery of dividing

- cells from tobacco protoplasts. *Plant Physiol.* 57: 424-429.
- White, P.R. 1963. The cultivation of animal and plant cells. Ronald Press, New York.
- Zapata, F.J., K.C. Sink and E.C. Cocking. 1981. Callus formation from leaf mesophyll protoplasts of three *Lycopersicon* species; *L. esculentum* cv. 'Walter', *L. pimpinellifolium* and *L. hirsutum*, *F. glabratum*. *Plant Sci. Lett.* 23: 41-46.

(1986. 7. 25. 接受)