

## 밀(*Triticum* spp.)의 미성숙배로부터 유도한 현탁 배양세포에서의 염색체 변이

方在旭

(충남대학교 생물학과)

### Chromosome Variation in Suspension Cells Derived from Cultured Immature Embryo of *Triticum* spp.

Bang, Jae-Wook

(Department of Biology, Chungnam National University)

#### ABSTRACT

Suspension cell lines have been newly established from the calli derived from the immature embryo culture of hexaploid (*Triticum aestivum* var. sicco), tetraploid (*T. durum*) and diploid (*T. tauchii* or *Aegilops squarrosa*) wheat species. The chromosomal variation in suspension cultured cell lines was examined and old cell line, C82d, established from *T. aestivum* var. copain was also used. New method using 1-bromonaphthalene for metaphase trapping of suspension cells was developed. Variation in chromosome number was observed amongst all the suspension lines. Cells with doubled chromosome number and deleted chromosome were also observed. Extensive structural changes in chromosomes were found in C82d line. Chromosome aberrations showed loss of chromosome arms and chromosome segment. The mean chromosome number in suspension cells of *T. aestivum* var. sicco was 40, in C82d line 33, in *T. durum* 28 and in *T. tauchii* 14. The stability of chromosomes in suspension cells of diploid and tetraploid wheats was higher than that of hexaploid wheat.

#### 서론

조직배양은 작물을 비롯한 많은 식물을 대상으로 하여 광범위하게 이루어지고 있으며, 특히 배양세포로부터의 식물체의 재분화는 원형질체를 이용한 세포융합이나 형질전환과 같은 유전적 조작의 실험적인 기반이 되고 있다. 그러나 배양 중인 세포나 재분화 식물체에서는 많은 표현형적(phenotypic) 또는 유전형적(genotypic)인 변이가 나타남이 보고되고 있는데(Karp and Bright, 1985; Evans and Sharp, 1986; Larkin, 1987), 이러한 켈러스 단계를 거치는 조직배양시에 일반적으로 나타나는 유전적 변이를 “체세포군 변이(Somaclonal variation)”라고 한다(Larkin and Scowcroft, 1981).

체세포군 변이는 질적, 양적인 형질로 나타난다. 사탕수수를 재료로 하여 켈러스에서 유도한 클론(clone)에서 체

세포군 변이에 따른 형태적인 변이 및 동위효소계의 차이가 보고되어 있으며(Heinz and Mee, 1971), 밀에서는 체세포군 변이에 따라 키, 이삭의 수, 출수기 등의 변이와 함께 종자의 색, 저장 단백질 등에서도 차이를 나타냄이 밝혀져 있다(Larkin *et al.*, 1984). 또한 체세포군 변이에 따른 염색체의 수적, 구조적인 변이가 밀과 트리티케일 등에서 보고되어 있으며(Karp *et al.*, 1982; Armstrong *et al.*, 1984; Karp and Maddock, 1984; Karp *et al.*, 1987), DNA 함량의 변화 및 발생유전학적인 변화 등에 관한 연구도 있다(Durante *et al.*, 1983; Prat, 1983).

체세포군 변이는 생산성이 높고 병충해에 강한 특성을 지닌 작물의 개발에 필요한 새로운 돌연변이의 원천으로 이용될 수 있어 식물 육종의 주요 연구분야로 대두되고 있으나(Heinz *et al.*, 1977; Larkin and Scowcroft, 1983; Evans, 1989), 유전적 조작에 의해 만들어진 식물체에 나타나는

**Table 1.** Composition of media used in cultures of immature embryo and cell suspension

Constituent	Concentration in culture medium	
	Solid medium	Liquid medium
MS media	4.71 g/l	4.71 g/l
Sucrose	30 g/l	30 g/l
2,4-D	1 mg/l	1 mg/l
Agar	8 g/l	
pH	5.8	5.8

바람직하지 않은 변이는 작물의 유전공학적 연구의 장애요인이 되고 있다. 따라서 체세포군 변이의 특성과 기원을 밝히는 것은 매우 중요한 과제이다.

밀(*Triticum aestivum*)은 A, B 및 D의 세 가지 계통을 지닌 이질 6배체의 식물로 세포 현탁 배양이나 원형질체 배양시에 체세포군 변이가 많이 나타나며, 특히 염색체수의 상실 또는 증가와 함께 심한 구조적인 변이가 많이 나타나는 것으로 보고되어 있다(Karp *et al.*, 1987). 또한 배양 중인 세포로부터의 재분화 능력의 상실은 염색체 조성의 불안정성에 기인하는 것으로 보고되어 있는데(Murashige and Nakano, 1967; Za gorska *et al.*, 1974; Karp *et al.*, 1987), 밀의 염색체를 구성하는 세 가지 계통 중에서 이러한 변이에 더 안정성을 가지는 계통이 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 체세포군 변이 중 조직 배양시에 나타나는 염색체의 안정성에 관한 연구의 일환으로 아직 원형질체로부터 식물체의 재생이 이루어지지 못하고 있는 재배밀과 야생밀을 재료로 하여 현탁 배양세포에서 나타나는 염색체의 변이의 조사를 통해 2배체 및 4배체의 야생밀과 6배체의 재배밀에서의 계통에 따른 염색체 변이의 차이를 밝혀보고자 한다.

## 재료 및 방법

**실험 재료.** 본 실험에서는 6배체의 재배밀 계통인 *Triticum aestivum* var. sicco., 4배체의 야생밀인 *T. durum*과 밀의 D계통 공여식물로 알려진 *T. tauchii* (*Aegilops squarrosa*)를 재료로 사용하였다. 또한 배양기간에 따른 염색체 변이의 정도를 비교하기 위하여 *T. aestivum* var. copain의 미성숙배로부터 세포 현탁 배양이 유도되어 계통을 유지해오고 있는 C82d line (Maddock, 1986)도 이용하였다.

**미성숙배의 배양 및 세포 현탁 배양의 유도.** 재료식물을 온실에 재배하면서 개화 2-3주 후에 이삭으로부터 녹색의 어린 종자를 꺼내어 10% bleaching 용액에서 5분간 살균시킨 후 멸균 증류수로 수세하였다. 해부 현미경하에서 어린 종자로부터 미성숙배를 적출하여 고체배지(Table



**Fig. 1.** Callus induced from immature embryo of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* var. Sicco).

1)에서 배양(25°C, light 16시간 dark 8시간)하면서 켈러스를 유도하였다. 유도된 켈러스의 일부는 식물체의 재분화를 위하여 배양을 계속하였으며, 나머지 켈러스는 멸균시킨 페트리 접시에서 잘게 부순 후에 액체배지(Table 1)에 넣어 100 rpm의 회전식 진탕배양기에서 세포 현탁 배양을 유도하였다. 조성된 세포 현탁 배양은 10일 간격으로 배양액을 갈아주면서 계속 배양하였다.

**배양세포의 전처리 및 고정.** 세포 현탁 배양이 조성되면 배양액을 갈아준 4일 후에 그 중 4ml 취하여 1-bromonaphthalene stock 용액(1 ml 1-bromonaphthalene/100 ml absolute alcohol)을 4  $\mu$ l 가하여 4°C에서 overnight 시켰다. 전처리가 끝난 cell-suspension은 증류수로 수세한 후에 Acetic-alcohol(1:3) 고정액에 고정하여 냉장고에 보관하면서 재료로 사용하였다.

**염색체 변이의 조사.** 염색체의 변이는 고정시킨 현탁 배양세포를 1N HCl(60°C)에서 3분간 해리시킨 후 Feulgen 용액에 담가 염색하여 압착법으로 프레파라트를 만들어 각 cell-suspension line에서 50개 이상의 세포로부터 염색체를 관찰하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

실험에 사용한 모든 종의 미성숙배의 배양에서 켈러스가 형성되었으나, 켈러스의 형성에 소요되는 기간, 켈러스의 모양과 성장속도, 식물체의 재분화는 종에 따라 차이를 나타냈다. 켈러스로부터의 shooting의 빈도는 재배밀에서 높게 나타났으며, 같은 배양조건하에서 *T. tauchii*에서는 shooting 현상을 볼 수 없었다. Fig. 1은 재배밀인 *T. aestivum* var. sicco의 미성숙배로부터 형성된 켈러스를 보여준다. 켈러스는 황색의 단단한 것과 흰색을 띠는 연한 것으로 구분되었는데, 세포 현탁 배양은 황색의 켈러스에서 더 잘 유도되는 경향을 나타냈다. 켈러스로부터 동질성을 지니는 현탁 배양세포의 형성에는 2-3개월이 소요되었다. 배양세포는 작은 켈러스 모양으로 뭉쳐 자라면서, 세포

Table 2. Cytological characteristics of the cell suspensions in wheat species

Species or cell line	Month in culture	Floidy level	Range of chromosome number	Mean number	Remarks
<i>T. aestivum</i> var. Sicco	4	Hexaploid (2n = 42)	25-84	40	Cultivar
<i>T. durum</i>	4	Tetraploid (2n = 28)	26-56	28	Wild wheat
<i>T. tauchii</i>	4	Diploid (2n = 14)	13-28	14	Wild wheat
C82d line*	30	Hexaploid (2n = 42)	16-62	33	Established cell line

\*Established cell line derived from *T. aestivum* var. copain (Maddock, 1986)

질이 없는 길게 신장된 세포들도 함께 섞여 있었다.

배양세포에서의 염색체 분석을 위해서는 많은 중기 염색체상을 얻기 위한 전처리와 고정의 과정이 수반되는데, 본 연구에서는 colchicine 과 효소를 사용하는 기존의 전처리 방법 (Karp and Maddock, 1984)에 비해 간편하고 효율적인 방법을 개발하였다. 즉, 앞에 서술된 방법에서와 같이 배양세포에 1-bromonaphthalene 용액을 첨가하여 overnight 시켜 고정된 후에 직접 압착법으로 프레파라트를 만들어 염색체를 조사하는 방법이 이용되었다. 이 방법을 통해 기존의 방법에서 보다 더 많은 중기 분열상을 얻을 수 있었다.

Table 2는 염색체의 조사가 이루어진 각 종의 배양세포에 대한 세포학적인 특성을 나타낸 것이다. 6배체의 재배밀에서 4배체나 2배체의 야생밀에서 보다 더 많은 염색체 변이가 나타남을 볼 수 있는데, 이는 polyploid가 diploid보다 세포학적인 변화에 대해 내성이 더 강하다는 보고 (Karp and Maddock, 1984)와 상반되는 결과였다.

6배체의 재배밀 *T. aestivum* var. sicco의 염색체수의 범위는 25-84개로 다양하게 나타났다. Fig. 2A는 *T. aestivum* var. sicco의 배양세포에서 조사된 염색체수의 빈도를 나타낸 것인데 염색체수가 2n=42보다 감소되는 경향을 나타냄을 볼 수 있다. 정상인 염색체수 (2n=42)의 조성을 가지는 세포는 관찰된 53세포 중 8개였고, 염색체수의 배가가 일어난 세포도 3개 관찰되었으며, 염색체의 평균수는 40개였다. Fig. 3A는 40개의 염색체 조성을 보여주는 분열상으로 하나의 단부(telocentric) 염색체를 볼 수 있을 뿐 구조적인 변이는 심하게 나타나지 않았다. 염색체수의 최빈치는 2n=40-49로 Karp et al. (1987)이 같은 6배체 밀 계통인 *T. aestivum* var. copain에서 유도된 배양세포에서 보고한 2n=30-36보다 높게 나타났는데, 이는 배양기간과 계통에 따른 차이 때문인 것으로 여겨진다.

*T. aestivum* var. copain의 미성숙배의 배양을 통해 세포 현탁 배양이 유도되어 30개월 이상 계통이 유지되고 있는 C82d line (Maddock, 1986)에서는 염색체의 변이가 매

우 심하게 나타났다. Table 2에서와 같이 염색체수의 변이는 16-62개로 그 범위가 넓게 나타났을 뿐 아니라 심한 구조적 변이도 관찰되었다. 염색체의 빈도 (Fig. 2B)에서는 새로 조성된 *T. aestivum* var. sicco에서보다 염색체수가 적게 나타나는 특징을 보였다. Fig. 3B는 C82d line에서 관찰된 염색체상으로 많은 단부 염색체와 함께 염색체의 결편을 포함한 30개의 염색체를 볼 수 있다. 염색체의 평균수는 33개로 Karp et al. (1987)이 보고한 결과와 일치하였다. 이는 6배체의 재배밀의 현탁 배양에서 배양이 진행될수록 염색체수는 상실되어 그 수가 30-33개에서 안정된다는 그들의 보고를 뒷받침해주는 것이다. 그러나 배양기간이 경과할수록 정상의 세포에서는 볼 수 없는 단부 염색체와 염색체 결편이 더 많이 발견되는 것으로 미루어 보아, 배양기간의 경과에 따라 염색체의 구조적 변이는 더욱 심해질 것으로 판단된다. C82d line의 배양세포에서 정상의 염색체수 (2n=42)를 가지는 세포는 관찰된 58세포 중 하나도 발견되지 않았으며, 최소의 염색체수는 새로 조성된 *T. aestivum* var. sicco의 배양세포에서는 25개인데 비해 16개로 나타났다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 새로 조성된 재배밀의 배양세포에서도 배양기간이 진행됨에 따라 염색체의 수적, 구조적 변이가 더욱 많이 나타날 것으로 예상되고 있다. 이와 비슷한 염색체의 이상은 2배체 야생밀과 계통이 다른 6배체 재배밀의 배양세포에서도 보고된 바 있다 (Kao et al., 1977). 세포 현탁 배양이나 원형질체 배양에서 흔히 나타나는 이러한 염색체의 변이는 형태 형성능의 제한요인으로 작용하고 있는 것으로 밝혀지고 있어, 체세포군 변이는 세포배양에 크게 의존하고 있는 식물의 유전공학적인 연구에 큰 문제로 대두되고 있다 (Zagorska et al., 1974; Karp et al., 1987; Evans, 1989). 따라서 *in vitro* 배양에서 세포학적으로 안정성이 유지될 수 있는 배양방법이 가능해진다면 종류의 배양세포나 원형질체로부터의 식물체의 재생이 더욱 쉽게 이루어질 수 있을 것으로 기대된다.

4배체 야생밀인 *T. durum*의 배양세포에서는 관찰된

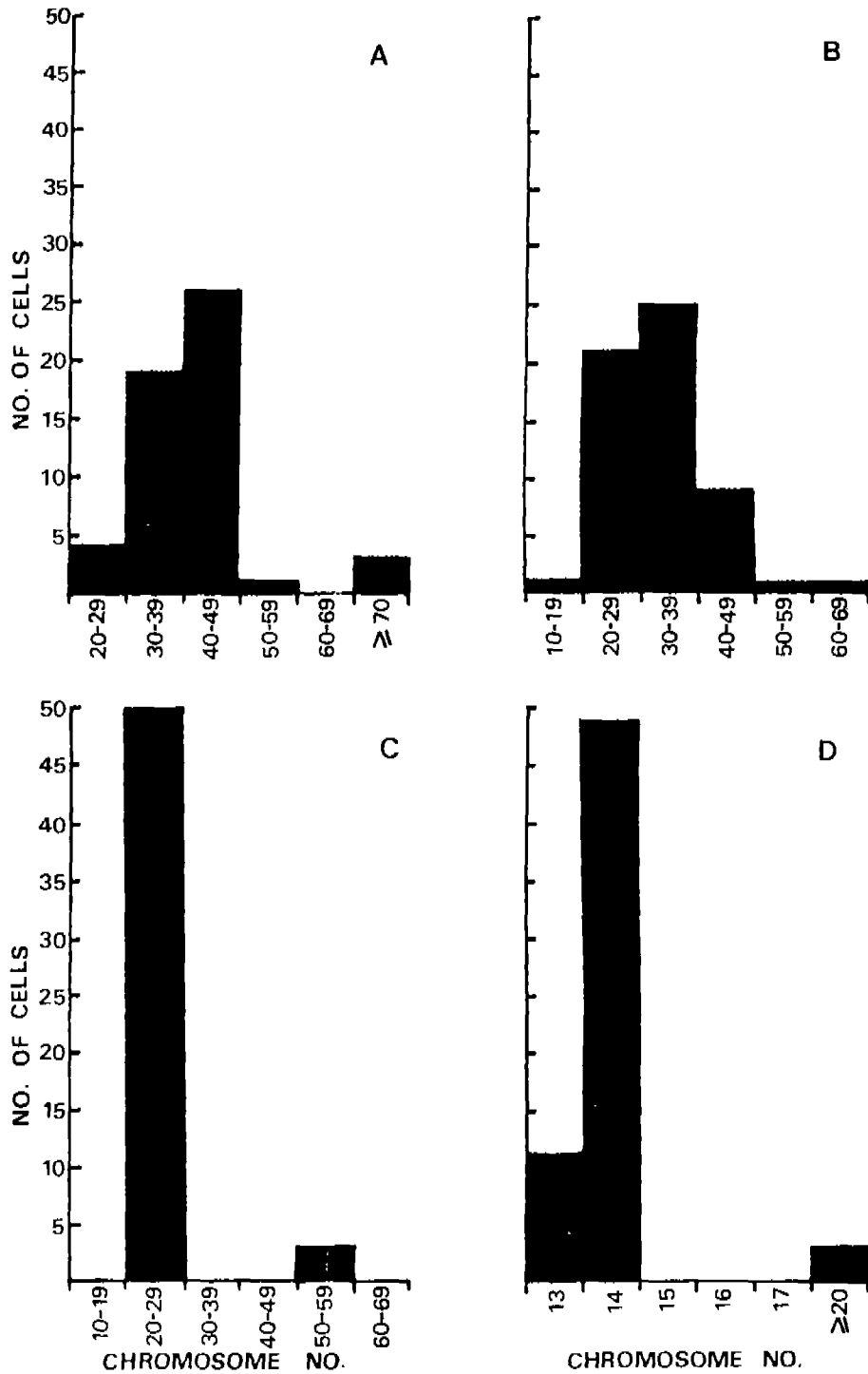


Fig. 2. Frequency distribution of cells with different chromosome numbers for cell suspension. A: *T. aestivum* var. sicco, B: Established cell line, C82d, C: *T. durum*, D: *T. tauchii* (*Ae. squarrosa*).

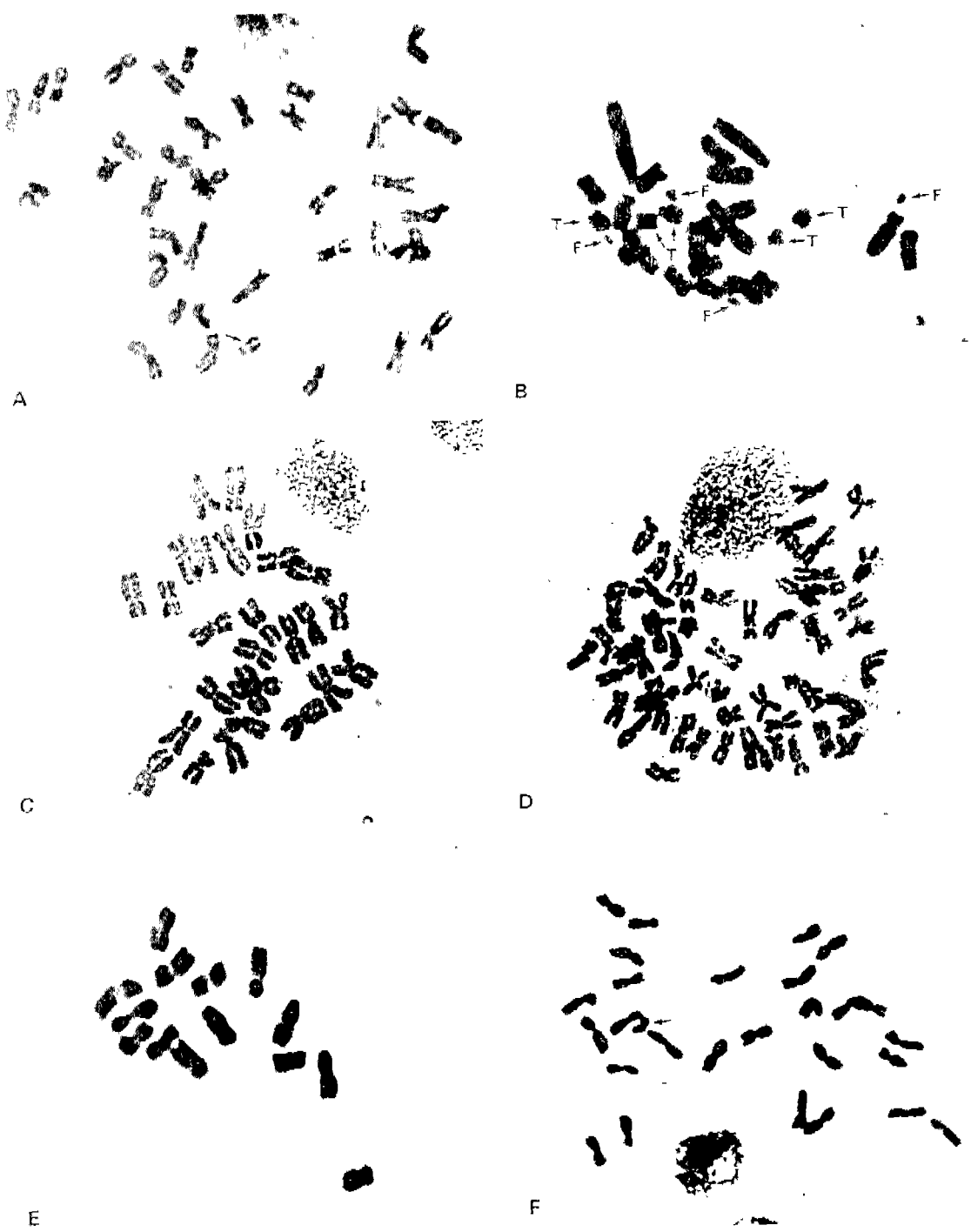


Fig. 3. Photomicrographs of chromosomes in suspension cells established from cultured immature embryo of wheat species. A:  $2n = 40$  (*T. aestivum* var. sicco line), B:  $2n = 30$  (C82d line), C:  $2n = 27$  (*T. durum* line), D:  $2n = 56$  (*T. durum* line), E:  $2n = 14$  (*T. tauchii* line), F:  $2n = 28$  (*T. tauchii* line). T, telocentric chromosomes; F, fragments.

53 세포 중 40 개가 정상 염색체수 ( $2n=28$ )를 가지는 것으로 나타났고, 하나의 염색체가 소실된 세포가 7 개, 염색체의 배가가 일어난 세포가 3 개 관찰되었다(Fig. 2C). 염색체의 평균수는 28 개로 정상과 같게 나타나(Table 2) *T. aestivum* var. sicco의 배양세포와 큰 차이를 보이는 것이 특징이었다. Fig. 3C는  $2n=27$ 인 *T. durum*의 염색체 조성을 보여주는데, 하나의 염색체가 상실되었을 뿐 구조적인 이상은 나타나지 않았다. 염색체수의 배가가 일어난 세포(Fig. 3D)에서도 염색체의 구조적 이상은 볼 수 없었다.

Fig. 2D는 재배밀의 D 계통 공여식물로 알려진 2배체 야생밀 *T. tauchii*의 배양세포에서의 염색체수의 빈도를 보여준다. 조사된 63 세포 중 49 개가 정상 염색체 조성( $2n=14$ )을 나타냈으며, 하나의 염색체가 상실된 세포( $2n=13$ )가 11 개, 염색체수가 배가된 세포( $2n=28$ )가 3 개 관찰되었다. 세포당 염색체의 평균수는 14 개로 4배체 야생밀인 *T. durum*에서와 같이 정상으로 나타났다(Table 2). Fig. 3E는 *T. tauchii*의 배양세포에서 관찰된 정상 염색체 조성을 가지는 분열상이며, Fig. 3F는 염색체의 수가 배가된 분열상으로 하나의 염색체에서 부분적인 결실이 일어난 것을 볼 수 있다.

이러한 결과들로 미루어 볼 때 세포배양이 진행될수록 염색체의 수적, 구조적인 변이가 증대되는 것을 알 수 있다. 또한 배양시의 염색체의 안정성은 6배체인 재배밀에서보다 야생밀에서 더 높게 나타나며, 특히 4배체 밀에서 더 높은 안정성을 보인 것은 흥미있는 사실이었다. 배양세포에서의 염색체의 변이에 영향을 미치는 요인은 식물의 배수성, 유전자형, 재분화 과정, 조직의 기원, 배지의 조성 등으로 보고(Karp, 1988)되어 있는데, 재배밀의 경우 A, B, D의 세 가지 계통으로 염색체의 조성이 이루어지고 있어 계통에 따른 안정성의 연구가 요구되고 있다. 이를 위해서 C-banding 기술과 특정 probe를 이용한 *in situ* hybridization이 배양세포의 염색체 연구에 도입되고 있다.

## 적 요

재배밀과 야생밀을 재료로 하여 현탁 배양세포에서의 염색체 변이를 조사하였다. 현탁 배양은 6배체 재배밀(*Triticum aestivum* var. sicco), 4배체 야생밀(*T. durum*), 2배체 야생밀(*T. tauchii* 또는 *Aegilops squarrosa*)의 미성숙배의 배양을 통해 유도되었으며, *T. aestivum* var. copain의 미성숙배로부터 유도되어 계통이 유지되고 있는 C82d line도 이용하였다. 배양세포에서의 염색체 관찰을 위해 1-monobromonaphthalen을 이용하는 새로운 전처리 방법을 개발하였다. 조사된 모든 종의 배양세포에서 염색체의 변이를 관찰할 수 있었다. 염색체의 구조적인 이상보다는 수적인 이상이 많이 나타났으며, C82d line에서 염색체의 변이가 가장 심하게 나타났다. 세포당 염색체의 평균수는 *T. aestivum* var. sicco에서 40 개, C82d line에서 33 개, *T. durum*에서 28 개, *T. tauchii*에서 14 개였다.

배양시의 염색체의 안정성은 6배체의 재배밀에서보다 2배체와 4배체 야생밀에서 가장 높게 나타났다.

## 참 고 문 헌

- Armstrong, K.C., C. Nakamura and W.A. Keller. 1984. Karyotype instability in tissue culture regenerants of *Triticale* (*Triticum secale* Wittm. cv Welch) from 6 month old callus cultures. *Pflanzenzucht* **91**: 233-245.
- Durante, M., J. Grisvard, E. Guille, R. Parenti and M. Buiatti. 1983. Variation in DNA complexity in *Nicotiana glauca* tissue cultures. 1. Pith tissue differentiation "in vitro". *Protoplasma* **114**: 114-118.
- Evans, D.A. 1989. Somaclonal Variation-Genetic Basis and Breeding Applications. *Trends in Genetic* **5**: 46-50.
- Evans, D.A. and W.R. Sharp. 1986. Applications of somaclonal variation. *Biotechnology* **4**: 528-532.
- Heinz, D.J. and G.W.P. Mee. 1971. Morphologic, cytogenetic and enzymatic variation in *Saccharum* species hybrid clones derived from callus. *Am. J. Bot.* **58**: 257-262.
- Heinz, D.J., M. Crishnamurthi, L.G. Nickel and A. Marezki. 1977. Cell, tissue and organ culture in sugar cane improvement. In applied and fundamental aspect of plant cell, tissue and organ culture (Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj ed). Springer Verlag Berlin pp. 3-17.
- Kao, K.N., R.A. Miller, O.L. Gamborg, B.L. Harvey. 1977. Variations in chromosome number and structure in plant cells grown in suspension cultures. *Molec. Gen. Genet.* **150**: 225-230.
- Karp, A. 1988. Origins and causes of chromosome instability in plant tissue culture and regeneration. Kew Chromosome Conference III, HMSO. pp. 185-192.
- Karp, A. and S.W.J. Bright. 1985. On the causes and origins of somaclonal variation. In: Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology. Vol. 2 (B.J. Mifflin ed) Oxford University press Oxford, pp. 199-234.
- Karp, A. and S.E. Maddock. 1984. Chromosome variation in wheat plants regenerated from cultured immature embryos. *Theor. Appl. Genet.* **67**: 249-255.
- Karp, A., R.S. Nelson, E. Thomas and S.W.J. Bright. 1982. Chromosome variation in protoplast-derived potato plants. *Theor. Appl. Genet.* **63**: 265-272.
- Karp, A., Q.S. WU, S.H. Steele and M.G.K. Jones. 1987. Chromosome variation in dividing protoplasts and cell suspensions of wheat. *Theor. Appl. Genet.* **74**: 140-146.
- Larkin, P.J. 1987. Somaclonal variation, history, method and meaning. *Iowa State J. Research* **61**: 393-434.
- Larkin, P.J., S.A. Ryan, R.I.S. Bretell and W.R. Scowcroft. 1984. Heritable somaclonal variation in wheat. *Theor. Appl. Genet.* **67**: 443-455.
- Larkin, P.J. and W.R. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant

- improvement. *Theor. Appl. Genet.* **60**: 197-214.
- Larkin, P.J. and W.R. Scowcroft. 1983. Somaclonal variation and eyespot toxin tolerance in sugar cane. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **2**: 111-122.
- Maddock S.E. 1986. Suspension and protoplast culture of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) *Plant Cell Rep.* **6**: 23-26.
- Murashige T. and R. Nakano. 1967. Chromosome complement as a determinant of the morphogenetic potential of tobacco cells. *Am J. Bot.* **54**: 963-970.
- Prat, D. 1983. Genetic variability induced in *Nicotiana sylvestris* by protoplast culture. *Theor. Appl. Genet.* **64**: 223-230.
- Zagorska, N.A., B.Z. Shamina and R.G. Butenko. 1971. The relation of morphogenetic potency of tobacco tissue culture and its cytogenetic features. *Biologia Plantarum* **16**: 262-274.

(1990. 7. 13 接受)