

물오리나무(*Alnus hirsuta*)의 칼루스 유도 및 자엽유래 칼루스로부터의 원형질체 배양

金亨河·安正善
(서울대학교 식물학과)

Induction of Callus and Culture of Protoplasts from Cotyledon-Originated Callus in *Alnus hirsuta*

Kim, Hyong-Ha and Chung Sun An
(Department of Botany, Seoul National University, Seoul)

ABSTRACT

Callus-inducing ability of *Alnus hirsuta* was examined by culturing various tissues (leaf, hypocotyl, cotyledon and seed) on NT (Nagata & Takebe) medium, supplemented with 2.5 μ M 2,4-D. Leaf-originated callus was cultured on media varying in auxin (IBA and NAA) and cytokinin (BAP) concentrations to examine the effects of auxin and cytokinin on callus growth. Maximum growth was obtained at 10 μ M IBA+10 μ M BAP and 10 μ M NAA without cytokinin. Cell suspensions established from cotyledon-originated callus yielded viable protoplasts after incubation for 16-18 hours in an enzyme mixture (1% (w/v) Onozuka R-10, 0.5% (w/v) Macerozyme, CPW salts and 13% (w/v) mannitol, pH 5.8). Protoplasts were cultured on NT medium, supplemented with glucose, hormones and coconut milk. After 6 weeks of culture, protoplasts sustained cell divisions to form microcallus, which showed various colors from red to white.

서론

물오리나무(*Alnus hirsuta*)는 우리나라 중부 이북지방에서 자생하는 목본식물로, 보리수나무, 소귀나무 등 200여종에 달하는 목본식물들과 함께, 방선균의 일종인 *Frankia*와 질소고정 공생관계를 이루는 숙주식물의 하나이다 (Bond, 1983). 이들은 뿌리혹에서의 질소고정으로 인해 빈약한 토양, 소택지, 사구 등과 같은 버려진 땅에서도 잘 자라기 때문에 개척 식물로서 산림 생태계에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, 자연이나 인간에 의해서 파손된 토지의 활성화 및 토양의 손실을 막기 위해서도 이미 실용화되고 있다 (Kalakutskii and Pariiskaya, 1983).

오리나무속의 경우는 특히 빠른 생장속도와 높은 질소 함량으로 인하여 관심의 대상이 되어 왔으나, 냉한에 견

디지 못하며, 목재가 단단하지 못하다는 단점을 가지고 있어서 최근에는 이러한 결점의 보완을 위해서 특정형질을 선택하거나 유용형질을 도입하기 위한 첫단계로 조직배양이 이용되고 있으나 (Dustan and Thorpe, 1986) 조직배양을 통해서 식물체를 재분화시킨 보고는 아직까지 없는 실정이다. 다만 유식물의 상배측으로부터 multiple shoot를 분화시키고, 뿌리를 분화시켰다는 보고 (Perinet and Lalonde, 1983), 잎조직으로부터 유리한 원형질체 (Huhtinen et al., 1982)와 잎유래 칼루스로부터 유리한 원형질체 (Tremblay et al., 1985)를 배양하여 세포체를 형성하였다는 보고 및 현탁배양한 칼루스로부터 원형질체를 분리하고 이로부터 양질의 DNA를 다량 얻었다는 보고 (Giasson and Lalonde, 1987) 등이 있다.

이상의 연구와 관련된 우리나라에서의 연구 사례, 즉 *Alnus*속 식물의 칼루스 배양에 관한 실험이나 이로부터 식물체를 재분화시킨 연구는 별로 없는 실정이다.

이에 본 실험은 우리나라에 자생하는 물오리나무로부터

본 연구의 일부는 1989년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구 조성비에 의하여 이루어진 것임.

조직별 칼루스 형성 능력을 시험하고, 형성된 칼루스의 특성을 조사한 후, 옥신과 시토키닌을 농도별로 처리하여 칼루스의 성장에 미치는 영향을 조사한 다음, 원형질체를 유리하여 배양하고자 하였다.

재료 및 방법

식물 재료. 서울대학교내 관악산에서 채집한 물오리나무(*Alnus hirsuta*)의 종자, 발아된 유식물의 잎, 자엽 및 하배축을 사용하였다. 종자는 Tween 80 1방울을 첨가한 30% H₂O₂ 용액에서 30분간 표면살균하여 0.5% agar와 0.5% glucose가 포함된 페트리 접시에 옮겨 28°C 암소에서 발아시켰고 1주일 후 새로운 한천배지로 옮겨 26°C/22°C, 16:8에서 배양하였다.

칼루스의 유도. 앞의 식물재료를 Nagata와 Takebe (1971)의 무기 영양소에 Murashige와 Skoog(1962)의 유기 영양소를 넣은 배지에 옮겨 28°C 암소에서 배양하여 칼루스를 유도하였으며 4주마다 계대배양하였다. 이 때 0.65% Difco agar, 2.5 μM 2,4-D 및 250 mg/l PVP(polyvinylpyrrolidone)를 첨가하였다(Forrest, 1969).

칼루스의 성장 측정. 유도된 후 6개월이 지난 칼루스를 NT 배지에 옮겨 28°C 암소상태에서 배양하면서 1주일에 한번씩 생체량을 측정하여, 각 조직으로부터 유래한 칼루스의 성장을 측정하였다.

식물 hormone의 영향 조사. 잎 유래 칼루스를 재료로 Frisch와 Camper(1987)의 방법에 따라 옥신(IBA와 NAA)과 시토키닌(BAP)을 농도별로 배지에 첨가하고 배양 6주 후 칼루스의 생체량을 측정하여 칼루스 성장에 미치는 영향을 조사하였다.

원형질체의 유리. 4-6일된 현탁배양 세포 1.5g을 Giasson과 Lalonde(1987)의 방법에 따라 50 μM의 나일론막에 거른 후, 막걸균한 효소용액(1%(w/v) Onozuka R-10, 0.5%(w/v) Macerozyme, CPW salts and 13%(w/v) mannitol, pH 5.8) 15 ml에 옮겨서 23°C 암상태에서 16-18시간 동안 60 rpm으로 진탕배양하고 80×g로 5분간 원심분리하여 얻은 침전층을 CPW13M용액(Freearson *et al.*, 1973; 101 mg/l KNO₃, 27.2 mg/l KH₂PO₄, 0.16 mg/l KI, 1,480 mg/l CaCl₂·2H₂O, 246 mg/l MgSO₄·7H₂O, 0.025 mg/l CuSO₄·5H₂O and 3 mM MES, pH 5.8)으로 두번 세척한 후, 21% sucrose를 포함하는 CPW용액(CPW21S)으로 현탁시켜 120×g로 10분간 원심분리하여 상부의 살아있는 원형질체만을 유리하였다.

원형질체의 배양. 유리된 원형질체는 밀도가 5×10³-5×10⁶ pps(proto-plasts)/ml이 되도록 하여 NT 배지에 1 μM 2,4-D, 2.5 μM kinetin, 5 μM NAA, 20 ml/l coconut milk, 0.25g/l sucrose와 100g/l glucose를 첨가하여 원형질체 배양 배지에 옮겨졌으며, 처음 48시간 동안은 28°C 암소에서 배양한 후 28°C, 광도 2,000 lux로 옮겨 배양하였다. 배양 6주 후 plating efficiency를 측정한 다음 형성된 mic-

Table 1. Characteristics of calluses induced from explants of *Alnus hirsuta*

	explants	leaf	coyledon	hypocotyl	seed
characteristics					
Induction period	3 weeks	2 weeks	2 weeks	2 weeks	2 weeks
Softness	soft	soft	hard	soft	soft
Friability	frnable	friable	non-friable	friable	friable
Suspension culture	unavailable	available	unavailable	unavailable	unavailable
Growth	medium	medium	fast	slow	slow

rocolony를 칼루스유도 배지로 옮겨 칼루스를 유도하였다.

결과

칼루스의 유도 및 성장 측정. 물오리나무(*Alnus hirsuta*)의 유식물로부터 채취한 재료들을 NT 배지에서 배양한 결과 잎조직의 경우 3주, 자엽, 하배축과 종자의 경우는 6주만에 모두 칼루스가 유도되었으며 각 칼루스들은 서로 다른 외형적인 특성을 보였다(Table 1). 즉 잎, 자엽 및 종자유래 칼루스는 부드럽고 부서지기 쉬웠으나, 하배축유래 칼루스는 딱딱하여 부서지지 않았으며, 자엽유래 칼루스를 제외하고는 모두 현탁배양이 불가능하였다. 이들을 6개월 동안 계대배양하여 얻은 확립된 칼루스를 다시 10주 동안 배양하면서 1주일 마다 생체량을 측정한 결과 각각 상이한 성장양상을 보였다(Fig. 1). 즉 하배축유래 칼루스가 가장 빠른 성장을 보인 반면 종자유래 칼루스는 가능 느린 성장을 보였고, 잎, 자엽유래 칼루스는 중간 정도의 성장을 보였다. 그러나 하배축유래 칼루스의 경우 6주까지만 생체량이 증가한 후 8주째까지 생체량이 급격히 감소하다가 조직이 죽었다. 반면 그외의 조직에서 유래된 칼루스는 7주까지 생체량이 증가한 후 10주까지 안정된 상태로 유지되었다. 하배축유래 칼루스는 최대 약 4.6g까지 성장하였으며 잎유래 칼루스는 약 3.5g, 자엽유래 칼루스는 약 2.1g 그리고 종자유래 칼루스는 약 1.3g까지 성장하였다.

식물 hormone의 영향. 두번째로 빠른 성장속도를 나타내며 칼루스의 상태가 안정하게 유지되는 잎조직유래 칼루스를 사용하여 옥신과 시토키닌을 농도별로 처리한 후 생체량의 변화를 측정하였다(Figs. 2, 3). IBA와 BAP를 각각 단독으로 처리하였을 때는 30 μM까지 농도를 증가시키면 계속 생체량이 증가하였으나 BAP만을 첨가한 경우는 IBA만을 첨가한 경우에 비해 약 3배 생체량 증가를 보였으며, IBA와 BAP를 혼합하여 사용한 경우는 IBA와 BAP를 동일한 농도로 첨가하였을 때 높은 생체량을 보였고 이러한 경향은 10 μM에서 최대치에 달하였다(Fig. 2). NAA와 BAP를 각각 단독으로 처리하였을 때에도 농도를 증가시키면 생체량이 계속 증가하였으나 NAA인 경우는 10 μM에서 최대치를 보였으며 그보다 높은 농도에서는 저해효과를 보였으며, NAA와 BAP를 혼합하여 처리한 경우에는 NAA와 BAP를 1 μM씩 첨가한 경우 최대 성장을

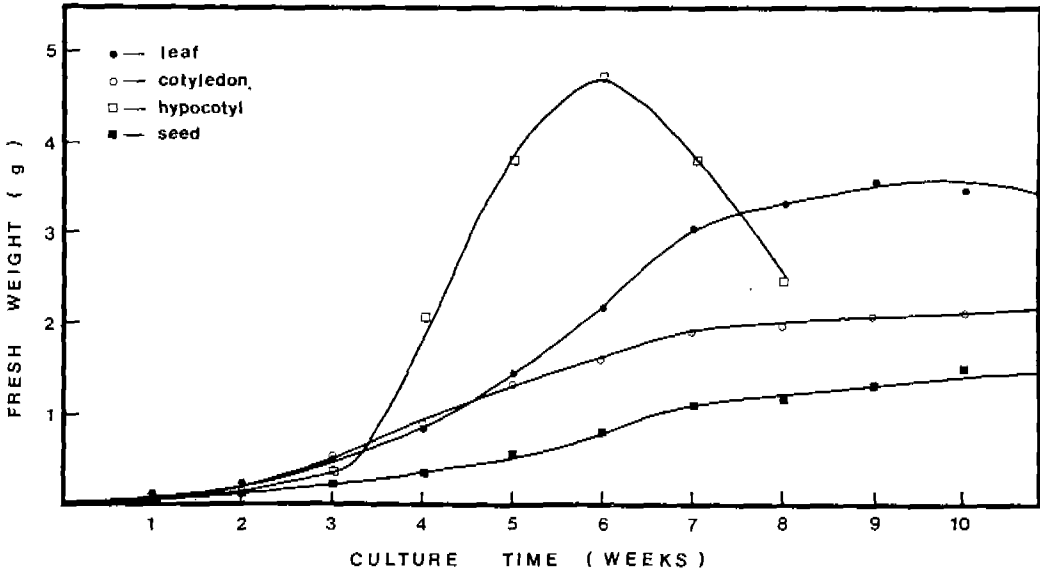


Fig. 1. Growth patterns of the callus induced from leaf, cotyledon, hypocotyl and seed.

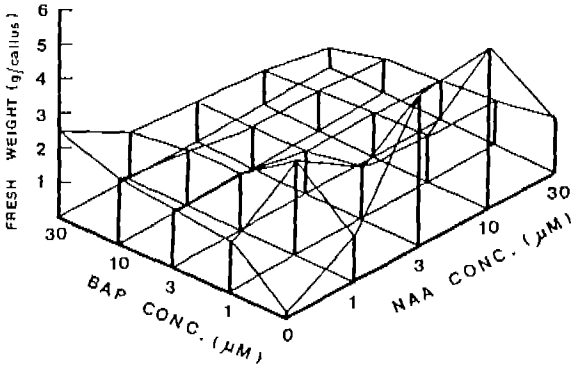


Fig. 2. Effects of IBA and BAP on *Alnus hirsuta* callus growth. Each value is an average of four replicates.

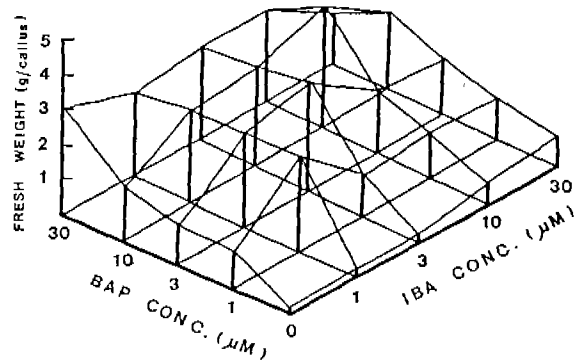


Fig. 3. Effects of NAA and BAP on *Alnus hirsuta* callus growth. Each value is an average of four replicates.

보였으나 성장치는 10 µM NAA만을 처리한 경우의 절반 정도였다(Fig. 3).

원형질체의 유리 및 배양. 원탁배양이 가능한 자엽 유래 칼루스를 사용하여 원탁배양을 수행하였다. 원탁배양 세포들은 단일한 세포와 2-50여개의 세포로 이루어진 덩어리 형태로 존재하였으며 세포의 모양은 구형 또는 간상형으로 불규칙하였다(자료는 제시하지 않았음).

계대배양 후 4-6일 된 재료를 사용하여 효소용액을 처리하였을 때 원형질체의 유리 효율이 80-90%로 가장 높았다. 이 때의 수율은 1.2×10^6 - 1.4×10^6 pps/g cell로, 18-20 hr 정도의 배양이 필요했으며, 이보다 시간이 더 경과한 경우 그 수가 감소하였다(Fig. 4). 정제된 원형질체를(Fig. 5 a) 5×10^3 - 5×10^6 pps/ml의 밀도로 배양한 결과 5×10^3

pps/ml의 밀도로 배양하였을 때 세포분열이 일어나지 않았으며, 5×10^6 pps/ml의 밀도시 세포분열은 활발하였으나 계속 성장하지 못하였고, 5×10^4 - 2×10^5 pps/ml의 밀도로 배양한 결과 세포분열과 microcallus의 형성이 활발하였다.

원형질체를 원형질체 배양 배지에 옮긴 후 48시간 동안 28°C 암소에서 배양하여 세포벽의 재생을 유도하였으며, 약 10일 후에는 최초의 세포분열을 관찰할 수 있었고(Fig. 5 b), 배양 2주 후에는 4세포기(Fig. 5c), 3주 후에는 microcallus를 형성하였다(Fig. 5d). 6주 후에는 육안으로도 관찰이 가능한 칼루스를 형성하였으며, 이 때의 plating efficiency는 약 40%로 측정되었다. 형성된 microcallus를 칼루스유도 배지로 옮긴지 6주 후에는 칼루스 형성이 이루어졌으며 형성된 칼루스는 붉은색을 띠는 것과 색소를 함유

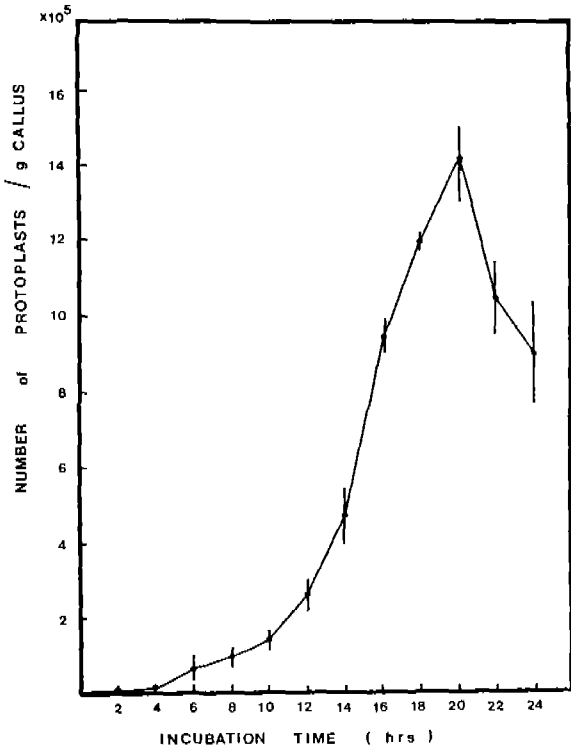


Fig. 4. Protoplast yield related to the incubation time in enzyme solution. Each value is an average of five replicates. The bars represent the standard deviation.

하지 않는 것으로 구분되었으며, 이 색소는 계대배양 후에도 계속 유지되었다(자료는 제시하지 않았음).

고 찰

칼루스의 유도. 목본식물의 경우, *in vitro* 배양시 나타나는 문제점들은, 첫째, 재료의 느린생장과 더불어 유도된 칼루스도 느린 성장을 나타낸다는 것과, 둘째, 심한오염 (Frisch *et al.*, 1987), 셋째, 다량의 2차 대사물의 독성에 의한 문제점이 있다(Butt, 1985). 본 실험에서는 표면살균된 종자를 받아시킨 다음, 무균상태에서 키운 유식물을 사용함으로써 오염문제와 함께 2차 대사물의 독성에 의해 조직이 죽는 것을 방지할 수 있었다. 조직별 칼루스 유도 능력 실험결과 모든 조직으로부터 칼루스가 유도되었으나, 성장면에서는 하배축유도 칼루스가 상대적으로 효과적이었으며 자연유래 칼루스만이 현탁배양과 원형질체 유리 및 배양이 가능하였다. 이는 자연이 미분화 상태이기 때문이라 생각되며 이로부터 초기 재료의 중요성을 확인할 수 있었다 (Smith and McCown, 1983).

식물 hormone의 영향. 오옥신과 시토키닌을 농도 별로 처리하여 칼루스의 생체량을 측정한 결과, IBA와

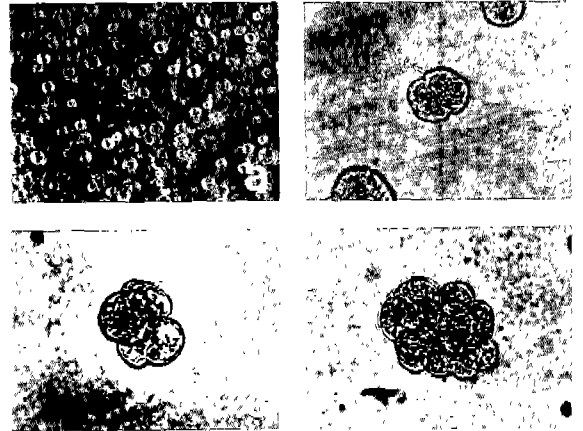


Fig. 5. Cell division from protoplasts of *Alnus hirsuta*. (a) Protoplasts isolated from cell suspension, (b) First cell division after 10 days, (c) Four-celled stage after two weeks, (d) A small cluster of cells after three weeks.

BAP의 경우 10 μ M IBA와 10 μ M BAP를 함께 처리한 경우 생체량이 최대로 나타났고, NAA와 BAP의 조합에서는 10 μ M NAA만을 처리한 경우 최대 성장을 보였다. 목본식물의 칼루스 성장에 미치는 hormone의 영향을 조사한 결과, 오옥신과 시토키닌의 각각의 농도, 둘 사이의 비율 및 둘의 농도를 합한 총 hormone의 양이 중요한 것으로 보고되었다(King and Moreheart, 1987). 물오리나무도 IBA와 BAP를 여러 농도의 조합으로 동시에 첨가하였을 때는 한 가지 hormone만을 같은 농도로 첨가한 경우보다 높은 성장을 보여서 두 hormone간의 비율이 중요함을 보여주었다.

원형질체의 유리 및 배양. 원형질체 유리 및 배양의 적절한 조건을 찾기 위해서 원형질체 유리시 온도와 시간 그리고 배양시 원형질체의 밀도, 배지 조성 등을 달리하였다. 현탁배양 시간에 따른 원형질체의 유리 효율을 측정한 결과, 4-6일간 현탁배양한 경우에 최대로 나타났으며, 이는 *A. incana*(Tremblay *et al.*, 1985)와 *A. glutinosa*(Perrinet and Lalonde, 1985)와 같은 결과였다.

효소용액에서 진탕시킬 때의 적정온도는 *A. incana*(Tremblay *et al.*, 1985)와 *A. glutinosa*(Huhtinen *et al.*, 1982)의 경우 25°C인 반면, 물오리나무의 경우는 23°C로 그 이상의 온도에서는 원형질체막이 파괴되었다. 원형질체 배양시 원형질체의 적정 밀도는 *A. incana*의 경우에 $5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ pps/ml로 보고되었으며(Tremblay *et al.*, 1985), 물오리나무의 경우도 이와 유사하여 $5 \times 10^4 - 5 \times 10^5$ pps/ml이 적절한 것으로 나타났다. 형성된 microcallus의 plating efficiency는 40% 정도로 나타났고, 이는 *A. incana* 경우의 최대 60-80% (Tremblay *et al.*, 1985)보다는 다소 낮았다.

*A. glutinosa*의 경우는 염육세포로부터 분리된 원형질체를 배양한 결과, ornithine이나, putrescine을 배지에 첨

가한 경우, 대조구보다 세포분열이 왕성한 것으로 나타났는데, 이들 polyamine들은 식물 조직내에서의 핵산 대사나 단백질 합성에 관여하거나, 생장 조절제로 작용하는 것으로 추정되고 있다(Huhtinen *et al.*, 1982). 그러나 칼루스로부터 분리한 원형질체를 배양한 물오리나무와 *A. incana*의 경우에는 모두 polyamine계 물질의 첨가를 필요로 하지 않았으므로 잎과 같이 분화된 식물조직으로부터 직접 원형질체를 분리했을 경우에만 이러한 물질에 의한 효과가 있는 것으로 생각된다(Tremblay *et al.*, 1985).

또한 *A. incana*의 경우, agar를 사용했을 때 원형질체에 독성을 미쳐서 agarose로 대체하였는데(Tremblay *et al.*, 1985), 물오리나무의 경우는 agar와 agarose 사용시 모두 microcallus의 형성에는 별 영향이 없는 것으로 관찰되었다.

이들은 칼루스유도 배지에 옮긴지 6주 후에는 칼루스로 성장하였고 이들 중 일부는 붉은색을, 나머지는 회거나 미황색을 띠었는데, 이는 계대배양 후에도 유지되었다. 붉은 색소를 추출하여 기본적인 실험(흡광도 조사 및 TLC)을 수행한 결과 anthocyanin계 색소로 추정되었으며 빛에 의해 발현되는 유전자에 의해 생성되는 물질일 것으로 생각된다.

이 연구는 물오리나무로부터 칼루스를 확립한 후, 원형질체의 배양을 통해, 다시 칼루스를 형성시키는 단계까지 수행함으로써, 원형질체로의 유전자 도입에 의한 형질전환이나 원형질체 융합에 의한 somatic hybrid를 형성시키는 실험의 기초단계로서 유용한 정보를 제공할 수 있을 것이다. 또한 색소를 형성하는 cell line은 색소를 포함한 2차 산물의 대량생산에 이용하거나 계속적인 연구를 통해 형질전환이나 원형질체 융합시 사용할 수 있는 marker로 개발할 수 있을 것이다.

적 요

물오리나무(*Alnus hirsuta*)의 부위(잎, 하배축, 자엽과 종자)별 칼루스 형성능력을 2.5 μ M 2,4-D가 첨가된 NT 배지에서 조사하였으며, 일유래 칼루스를 사용하여 옥신(IBA, NNA)과 시토키닌(BAP)이 칼루스 생장에 미치는 영향을 조사하였다. 최대 생장은 IBA와 BAP를 각각 10 μ M 처리한 경우와 시토키닌을 첨가하지 않은 10 μ M NAA 처리구에서 나타났다. 원형질체는 자엽유래 칼루스로부터 확립된 현탁배양 세포를 효소 용액(1%(w/v) Onozuka R-10, 0.5%(w/v) Macerozyme, CPW염과 13%(w/v) mannitol, pH 5.8)에서 16-18시간 동안 배양하여 얻었다. 원형질체는 glucose, hormone과 야차열매즙을 첨가한 NT 배지에서 배양하였으며, 배양 6주 후에는 붉은 색으로부터 흰색까지 다양한 색을 띠는 microcallus가 형성되었다.

참 고 문 헌

Bond, G. 1983. Taxonomy and distribution of non-legume

nitrogen-fixing system. In, Biological Nitrogen Fixation in Forest Ecosystem. J.C. Gordon and C.T. Wheeler (eds.). pp. 55-87.

Butt, A.D. 1985. A general method for the high-yield isolation of mesophyll protoplast from deciduous tree species. *Plant Sci.* **42**: 55-59.

Dunstan, D.I. and T.A. Thorpe. 1986. Regeneration of forest trees. In, Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. I.K. Vasil (ed.), Vol. 3, Academic Press, London. pp. 223-241.

Forrest, G.I. 1969. Studies on the polyphenol metabolism of tissue cultures derived from the tea plant. *Biochem. J.* **113**: 765-772.

Freason, E.M., J.B. Power and E.C. Cocking. 1973. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplast. *Dev. Biol.* **33**: 130-137.

Frisch, C.H. and N.D. Camper. 1987. Effect of synthetic auxins on callus induction from tea stem tissue. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **8**: 207-213.

Gisson, L. and M. Lalonde. 1986. Restriction pattern analysis of DNA isolated from callus and cell suspension of actinorhizal and nonactinorhizal Betulaceae. *Physiol. Plant.* **70**: 304-310.

Hihtinen, O., J. Honkanen and L.K. Simola. 1983. Ornithine- and putrescine-supported divisions and cell colony formation in leaf protoplast of Alders (*Alnus glutinosa* and *A. incana*). *Plant Sci. Lett.* **28**: 3-9.

Kalakutskii, L.V. and A.N. Pariiskaya. 1983. Nitrogen fixing symbiosis of actinomycetes with plants. *Biol. Bull.* **9**: 171-185.

King, S.M. and A.L. Moreheart. 1987. Effect of BA, NAA and 2,4-D on red maple callus growth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **8**: 57-63.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.

Nagata, T. and I. Takebe. 1971. Planting of isolated tobacco mesophyll protoplast under agar medium. *Planta* **99**: 12-20.

Perinet, P. and M. Lalonde. 1983. *in vitro* propagation and nodulation of the actinorhizal host plant *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Plant Sci. Lett.* **29**: 9-17.

Smith, M.A.L. and B.H. McCown. 1983. A comparison of source tissue for protoplast isolation from three woody plant species. *Plant Sci. Lett.* **28**: 149-156.

Tremblay, F.M., J.B. Power and M. Lalonde. 1985. Callus regeneration from *Alnus incana* protoplast isolated from cell suspensions. *Plant Sci.* **41**: 211-216.

(1990. 9. 12 接受)