

벼 원형질체의 분리, 배양 및 Electroporation에 관한 연구

黃 聲 振 · 黃 稜

(全南大學校 自然科學大學 生物學科)

Isolation, Culture and Electroporation of Rice Protoplasts

Hwang, Sung Jin and Baik Hwang

(Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju)

ABSTRACT

Culture of embryogenic callus and suspension were induced from rice seeds in MS2.5 medium. In hormone free N6 medium, whole plantlets were regenerated from embryogenic callus. We observed cell division and reformation of embryogenic callus on culture of protoplast isolated from embryogenic cell suspensions. In addition, we studied the influencing factors on viability of protoplast treated with electroporation. Viability was decreased according to the increase of voltage and capacitance during electroporation. An optimal level of viability was obtained after treatment with 200-300 V/1180 μ F in HBM buffer at 4°C.

서 론

고등식물체로의 외래유전자의 도입에 의한 형질전환은 주로 *Agrobacterium*속에 의해 쌍자엽 식물에서 이루어졌으나(Bevan and Chilton 1982; Elzen *et al.*, 1985; Hatamoto *et al.*, 1990), 단자엽 식물의 경우 이와 같은 *Agrobacterium*속에 의한 형질전환이 어렵기 때문에(Potrykus, 1990) 직접 유전자 전달(direct gene transfer) 방식인 polyethylene glycol(PEG) 방법(Paszowski *et al.*, 1984; Lorz *et al.*, 1985; Potrykus *et al.*, 1985; Junker *et al.*, 1987; Mass and Werr, 1989)이나 전기적 자극에 의한 electroporation 방법(Fromm *et al.*, 1985, 1986; Shillito *et al.*, 1985; Lindsey and Jones, 1987a, b) 또는 위 두 가지를 병행하여 사용되어지고 있다(Uchimiya *et al.*, 1986; Ou-Lee *et al.*, 1986; Hauptmann *et al.*, 1987).

Electroporation 방법은 최근 biolistics(Morikawa *et al.*,

1989; Twell *et al.*, 1989; Oard *et al.*, 1990; Gary *et al.*, 1990), microinjection(Lawrence and Davies, 1985; Aly and Owens, 1987; Joshi and Vincentini, 1990; Neuhaus and Spangenberg, 1990) 등과 함께 고등식물체의 형질전환에 효율적인 방법으로 알려지고 있으나, 일차적으로 embryogenic cell이나 원형질체로부터 재분화가 용이하게 이루어져야 하는 선결 요건이 필요하다.

단자엽식물인 벼(*Oryza sativa* L.)의 경우 원형질체로부터의 유식물체로의 재분화는 최근에 와서 일부 제한적으로 이루어지고 있으며(Fujimura *et al.*, 1985; Toriyama *et al.*, 1986; Yamada *et al.*, 1986; Abdullah *et al.*, 1986; Kyozyuka *et al.*, 1987) 재분화율이 매우 낮은 편이다.

본 연구에서는 국내 재배종인 낙동벼로부터 totipotency를 갖는 embryogenic callus를 유도하여 재분화 개체를 유도하고, embryogenic cell suspension culture를 통하여 원형질체를 분리, 배양하였으며, 분리된 원형질체를 electroporation 방법에 의한 외래 유전자의 도입, 발현 연구의 일환으로 electroporation에 있어서 원형질체의 생존율(viability)에 영향을 주는 여러 요인들을 조사하였다.

*본 연구는 1989년도 문교부 기초과학 연구조성비 지원에 의한 것임.

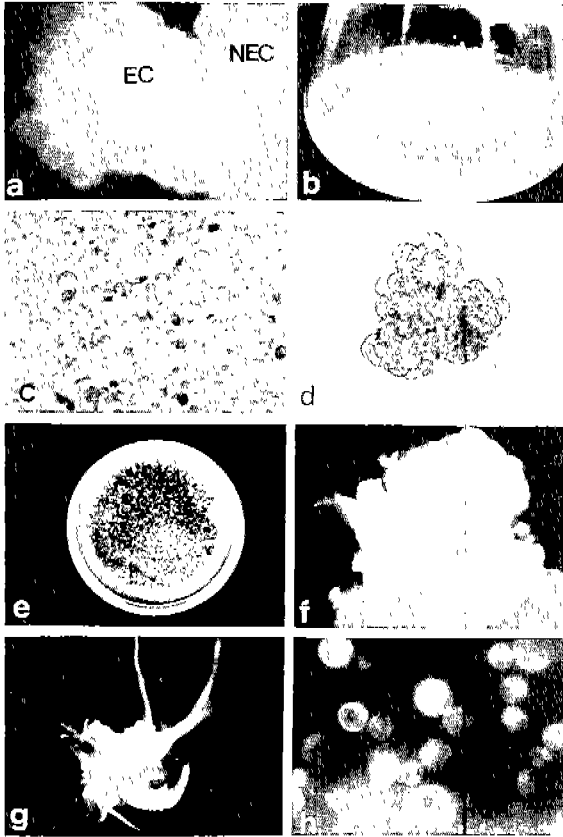


Fig. 1. a, Induced embryogenic callus (EC) and non-embryogenic callus (NEC) from rice seed; b, Embryogenic cell suspension culture; c, Isolated protoplasts from embryogenic suspension cultured cells; d, e, Small colonies formed from protoplasts after 5 weeks of liquid culture; f, g, Plantlet regenerated from embryogenic callus; h, Protoplasts in the presence of FDA illuminated with UV light. Viable protoplasts are fluorescent.

재료 및 방법

Embryogenic cell suspension culture 및 재분화.

벼(*Oryza sativa* L. cv Nakdong)의 종자로부터 MS2.5 (Murashige and Skoog, 1962; 2.5 mg/l 2,4-D; 3% sucrose; pH 5.8) 배지에서 embryogenic callus를 유도하고, 이를 동일 조성의 액체 배지로 옮겨 embryogenic cell suspension culture(120 rpm; 26°C)를 행하였다. 또한, 이와 같은 embryogenic callus를 호르몬이 제거된 N6(Chu *et al.*, 1975) 배지로 옮겨 재분화 개체를 유도하였다.

원형질체의 분리 및 배양. 진탕배양 3-4일째 되는 embryogenic cell에 효소처리(1% cellulase RS; 0.5% macerzyme; 0.5% driselase; pH 5.8)하여 5-6시간 유지시킨

후 100, 50, 25 μm stainless steel mesh로 거른 다음 CPW 용액(MS salts; 5 mM MES; 0.6 M mannitol; pH 5.7)으로 2회 세척하고 원형질체 배양 배지(MS; 2.5 mg/l 2,4-D; 0.1 mg/l kinetin; 10 mM proline; 0.56 M sucrose; pH 5.8)로 1회 세척한 후 $1 \times 10^5 - 10^6$ protoplasts/ml로 맞추어 배양하였다. 배양된 원형질체는 10일 간격으로 새로운 배지를 첨가하여 지속적인 분열을 유도하였다.

Electroporation 및 생존율(viability)조사. 분리된 원형질체(1×10^6 protoplasts/ml)를 electroporator(BRL Life Tec. Inst.) chamber에 넣고 voltage와 capacitance를 각각 다르게 처리하고, electroporated buffer로는 HBM(Hauptmann, 1987), MES(Okada, 1986), PHBS[10 mM HEPES (pH 7.2), 150 mM NaCl, 4 mM CaCl_2]를 사용하였으며, electroporated temperature는 4°C와 25°C에서 행하였다. Electroporation된 원형질체의 생존율은 4°C에서 10분간 유지시킨 후 원형질체 배양 배지로 옮겨 48시간 배양(26°C, in dark)한 후 1% FDA(flourescence diacetate) 용액으로 형광염색하여 UV하에서 관찰하였다.

결과 및 고찰

Embryogenic cell suspension culture 및 재분화.

낙동벼의 종자로부터 유도된 embryogenic callus(EC)는 nonembryogenic callus(NEC)와 달리 회고 단단한 외부 형태를 나타내며(Fig. 1a)(Hwang, *et al.*, 1988) 이와 같은 embryogenic callus만을 해부 현미경하에서 선별하여 동일 조성의 액체배지로 옮겨 진탕배양시 일부 잔존하는 nonembryogenic cell을 분리 제거할 수 있었으며, 이로서 embryogenic cell만을 단독 배양할 수 있었다(Fig. 1b). 이와 같은 방법은 기 보고된 방법(Hwang *et al.*, 1988)에 비하여 벼과 식물에 있어서 매우 효과적인 embryogenic cell suspension culture로(Vasil and Vasil, 1984a) 이 때 embryogenic cell의 특징은 세포의 크기가 작고 둥글며 균일하고, 또한 세포질이 풍부하고 starch grain을 함유하고 있는 20-30개의 세포가 모여 있어 신장되고 액포가 확장된 nonembryogenic cell과 분리가 가능하였다. 이는 *Panicum maximum*(Lu and Vasil, 1982)과 *Pennisetum purpureum*(Wang and Vasil, 1982; Vasil *et al.*, 1983) 그리고 벼(Abdullah *et al.*, 1986) 등에서의와 일치되는 embryogenic cell의 특징을 보여 주었다. 또한 embryogenic callus를 분화배지로 옮겼을 때 6주 후 유식물체를 형성하였다(Fig. 1f, g).

원형질체 분리 및 배양. Fig. 1c는 embryogenic suspension cultured cell로부터 분리한 원형질체로 크기가 일정하며, embryogenic cell의 특징을 갖고 있다.

Fig. 1d, e는 원형질체 배양을 통하여 형성된 embryogenic callus이다. 벼과 식물에서의 nonembryogenic callus로부터는 재분화 개체의 유도가 어렵기 때문에(Jone and Dale, 1982; Chourey and Zurawski, 1984), 벼과 식물에서의 somatic embryogenesis 및 genetic manipulation 연구들에

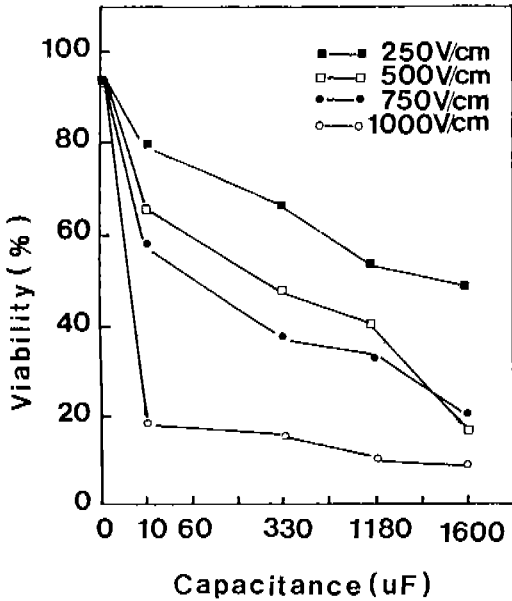


Fig. 2. Effect of increasing the voltage of electroporation on protoplast viability. Protoplast viability was measured by FDA staining at 24 h after electroporation.

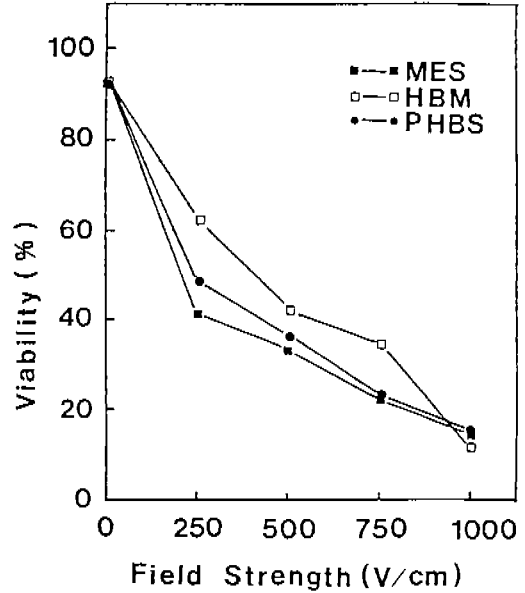


Fig. 3. Effect of various electroporation medium at different voltages (capacitance; 1,180 uF) on protoplast viability.

서는 embryogenic callus의 사용이 필요하리라 본다.

Electroporation. Electroporation에 의한 고등식물체로의 외래유전인자의 도입 방법에 있어서는 세포성장이 빠르고, totipotency를 갖는 embryogenic cells의 사용이 필요하고, 전기적 자극하에서 식물세포가 안정적으로 생존력을 유지할 수 있는 최적조건하에서 electroporation을 행하였을 때 이를 배양시 높은 plating efficiency로서 형질전환된 개체를 얻을 수가 있다. 따라서 본 실험에서는 여러 조건하에서 electroporation을 행하고 FDA 처리로 원형질체의 생존율을 조사한 결과(Fig. 1h) voltage와 capacitance가 증가 할 수록 감소하였는데 (Fig. 2) Hauptmann 등(1987)은 몇 가지 단자엽 식물과 쌍자엽 식물에서 electroporation에 의한 원형질체의 생존율에 있어서 voltage와 capacitance의 증가는 결국 pulse length의 증가와 이에 따르는 높은 열의 발생으로 원형질체의 생존율에 있어서 감소를 가져온다고 보았다.

이는 옥수수(Boston *et al.*, 1987; Huang and Dennis, 1989), 감자(Heddwyn *et al.*, 1989), 벼(Ou-Lee *et al.*, 1986) 등에서와 유사한 결과이나 식물재료, 세포의 age, 크기, 그리고 액포화 정도 등과 같은 요인들에 의해서도 약간의 차이를 보일 수 있다(Hauptmann, 1987; Rech, 1987; Haung, 1989). 본 실험의 경우에도 3-4일 배양된 세포에서 안정적인 생존율을 보였으며, 이들은 또한 동일한 전기적 자극하에서 담배나 당근의 원형질체에 비하여 보다 안정성을 나타내었다(data not shown). Electroporation buffer로는 low ionic strength buffer인 HBM buffer가

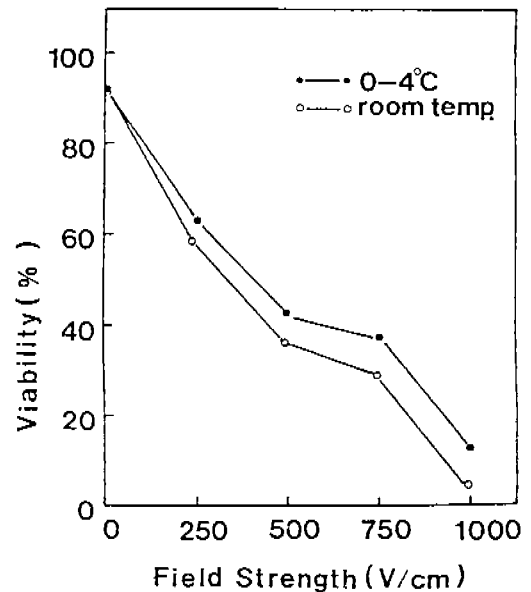


Fig. 4. Effect of electroporation temperature at different voltages (capacitance, 1,180 uF) on protoplast viability.

MES, PHBS buffer에 비해 생존율에 있어서 효과적 이었으며(Fig. 3), electroporation temperature는 상온에서 보다 4°C에서 실시하였을 때 생존율에서 보다 안정성을 유지하였다(Fig. 4). 이와 같은 결과는 Okada 등(1988)의 벼 원

형질체에 있어서 *N. tabacum*과 *V. rosea*에 비하여 ionic strength를 좀더 낮추고, voltage를 강하고 짧게 처리함으로써 외래 유전자의 발현 및 생존율에 있어서 효과적 이었으나 ionic strength를 너무 낮추거나 하는 등에 급격한 변화를 줄 경우 생존율에 영향을 준다는 사실과, Potter and Leder(1984)의 electroporation에 있어서 저온에서 행하는 것이 생존율의 유지에 효과적이라는 보고와 일치되고 있다.

적 요

벼의 종자로부터 embryogenic callus를 유도하고 이로부터 개체의 재분화를 유도하였으며, embryogenic cell suspension culture를 통하여, 이로부터 원형질체를 분리, 배양하여 embryogenic callus를 형성하였다.

또한, 분리된 원형질체를 electroporation하였을 때 생존율(viability)에 미치는 여러 요인들을 조사하였다. 원형질체의 생존율은 voltage와 capacitance가 증가할수록 감소를 보였으며, HBM buffer에서 4°C로 electroporation 하였을 때 생존율에 보다 효과적이었다.

참 고 문 헌

- Abdullah, R., E.C. Cocking and J.A. Thompson. 1986. Efficient plant regeneration from rice protoplasts through somatic embryogenesis. *Bio/Technology*. **4**: 1087-1090.
- Aly, M.A. and L.D. Owens. 1987. A simple system for plant cell microinjection and culture. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **10**: 159-174.
- Bevan, M.W. and M.D. Chilton. 1982. T-DNA of the agrobacterium Ti and Ri plasmids. *Ann. Rev. Genet.* **16**: 357-384.
- Boston, R.S., M.R. Becwar, R.D. Ryan, P.B. Goldsbrough, B.A. Larkins and T.K. Hodges. 1987. Expression from heterologous promoters in electroporated carrot protoplasts. *Plant Physiol* **83**: 742-746.
- Chourey, P.S. and D.B. Zurawski. 1981. Callus formation from protoplasts of maize cell culture. *Theor. App. Genet.* **59**: 341-344.
- Chu, C.C., C.C. Wang, C.S. Sun, C. Hsu, K.C. Yin, C.Y. Chu and F.Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin.* **18**: 659-668.
- Crissen, G., C. Smith, R. Francis, H. Reynold, and P. Mullineaux. 1990. *Agrobacterium* and microprojectile-mediated viral DNA delivery into barley microspore-derived cultures. *Plant Cell Rep.* **8**: 680-683.
- Elzen, P.J.M., J. Townsend, K.Y. Lee. and J.R. Bedbrook. 1985. A chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. *Plant Mol. Biol.* **5**: 299-302.
- Fromm, M., L.P. Taylor and V. Walbot. 1985. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 5824-5828.
- Fromm, M., L.P. Taylor and V. Walbot. 1986. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature* **319**: 791-793.
- Fujimura, T., M. Sacurai, H. Akagi, T. Negishi and A. Hirose. 1985. Regeneration of rice plants from protoplasts. *Plant Tissue Cult. Lett.* **2**: 74-75.
- Hatamoto, H., M.E. Boulter, A.H. Shirsat, E.J. Croy and J.R. Ellis. 1990. Recovery of morphologically normal transgenic tobacco from hairy roots cotransformed with *A. rhizogenes* and a binary vector plasmid. *Plant Cell Rep.* **9**: 88-92.
- Haung, Y-W. and E.S. Dennis. 1989. Factors influencing stable transformation of maize protoplasts by electroporation. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. **18**: 281-296.
- Hauptmann, R.M., P. Ozias-Akins, V. Vasil, Z. Tabaeizadeh, S.G. Roger, R.B. Horsch, I.K. Vasil and R.T. Fraley. 1987. Transient expression of electroporated DNA in monocotyledonous and dicotyledonous species. *Plant Cell Rep.* **6**: 265-270.
- Hwang, B., M.K. Kim and I.K. Vasil. 1988. Isolation and culture of protoplasts derived from embryogenic cell suspension culture of *Oryza sativa* (Rice). *Korean J. Bot.* **31**: 41-49.
- Jones, H. G. Ooms and G.K. Michael. 1989. Transient gene expression in electroporated *Solanum* protoplasts. *Plant Mol. Biol.* **13**: 503-511.
- Jones, M.G.K. and P.J. Dale. 1982. Reproducible regeneration of callus from suspension culture protoplasts of the grass *L. multiflorum*. *Z. Pflanzenphysiol.* **105**: 267-274.
- Joshi, S. and A.M. Vincentini. 1990. Controlled cell wall regeneration for efficient microinjections of *N. tabacum* var. Carlson protoplasts. *Plant Cell Rep.* **9**: 117-120.
- Kyozuka, J., Y. Hayashi and K. Shimamoto. 1987. High frequency plant regeneration from rice protoplasts by novel nurse culture methods. *Mol. Gen. Genet.* **206**: 408-413.
- Lawrence, W.A. and D.R. Davies. 1985. A method for the microinjection and culture of protoplasts at very low densities. *Plant Cell Rep.* **4**: 33-35.
- Lindsey, K. and M.G.K. Jones. 1987a. The permeability of electroporated cells and protoplasts of sugarbeet. *Planta* **172**: 346-355.
- Lindsey, K. and M.G.K. Jones. 1987b. Transient gene expression in electroporated protoplasts and intact cells of sugarbeet. *Plant Mol. Biol.* **10**: 43-52.
- Lorz, H., B. Baker and J. Shell. 1985. Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation. *Mol. Gen. Genet.* **199**: 178-182.
- Lu, C., V. Vasil and I.K. Vasil. 1981. Isolation and culture

- of protoplasts of *P. maximum*: somatic embryogenesis and plantlet formation. *Z. Pflanzenphysiol.* **104**: 311-318.
- Mass, C. and W. Werr. 1989. Mechanism and optimized conditions for PEG mediated DNA transfection into plant protoplasts. *Plant Cell Rep.* **8**: 148-151.
- Morikawa, H., A. Iida and Y. Yamada. 1989. Transient expression of foreign genes in plant cells and tissues obtained by a simple biolistic device. *App. Microbiol. Biotech.* **31**: 320-322.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.
- Oard, J.H., D.F. Paige, J.A. Simmond and T.M. Gradziel. 1990. Transient gene expression in maize, rice and wheat cells using an airgun apparatus. *Plant Physiol.* **92**: 334-339.
- Ou-Lee, T.M., R. Turgeon and R. Wu. 1986. Expression of a foreign gene linked to either a plant virus or a *Drosophila* promoter after electroporation of protoplasts of rice, wheat and sorghum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 6815-6819.
- Paszkowski, J., R.D. Shillito, M.W. Saul, V. Mandak, T. Hohn, B. Hohn and I. Potrykus. 1984. Direct gene transfer to plants. *EMBO J.* **3**: 2717-2722.
- Potrykus, I., M.W. Saul, J. Petruska, J. Paszkowski and R.D. Shillito. 1985. Direct gene transfer of cells of a graminaceous monocot. *Mol. Gen. Genet.* **199**: 183-188.
- Potrykus, I. 1990. Gene transfer to plants: assessment and perspectives. *Physiol. Plant.* **79**: 125-134.
- Potter, H., L. Weir and P. Leder. 1984. Enhancer dependent expression of human immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 7161-7165.
- Rech, E.L., S.J. Ochatt, P.K. Chand, J.B. Power and M.R. Davey. 1987. Electroporation of division of plant protoplast derived cells. *Protoplasma* **141**: 169-176.
- Shillito, R.D., M.W. Saul, J. Paszkowski, M. Muller and I. Potrykus. 1985. High efficiency direct gene transfer to plants. *Bio/Technology* **3**: 1099-1103.
- Toriyama, K., K. Hinata and T. Sasaki. 1986. Haploid and diploid plant regeneration from protoplasts of anther callus in rice. *Theor. Appl. Genet.* **73**: 16-19.
- Twell, D., T.M. Klein, M.E. Fromm and S. McCormick. 1989. Transient expression of chimeric genes delivered into pollen by microprojectile bombardment. *Plant Physiol.* **91**: 1270-1274.
- Uchimiyama, H., H. Hirochika, H. Hashimoto, A. Hara, T. Masuda, T. Kasumimoto, H. Harada, J.E. Ikeda and M. Yoshioka. 1986. Coexpression and inheritance of foreign genes in transformants obtained by direct DNA transformation of tobacco protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* **205**: 1-8.
- Vasil, V. and I.K. Vasil. 1984a. Induction and maintenance of embryogenic callus culture of graminiae. In, *Cell Culture and Somatic Genetics of Plants*, Academic Press, Vol. 1, pp. 34-42.
- Vasil, V., D. Wang and I.K. Vasil. 1983. Plant regeneration from protoplasts of *P. purpureum*. *Z. Pflanzenphysiol.* **111**: 233-239.
- Wang, D. and I.K. Vasil. 1982. Somatic embryogenesis and plant regeneration from inflorescence segments of *P. purpureum*. *Plant Sci. Lett.* **25**: 147-154.
- Yamada, Y., Z.Q. Yang and D.T. Tang. 1986. Plant regeneration from protoplasts derived callus of rice. *Plant Cell Rep.* **5**: 85-88.

(1990. 10. 23 接受)