

## *Nicotiana africana*의 엽육 원형질체로부터 식물체 재분화

최상주, 이승철\*

한국인삼연초연구원 경작시험장, 대구시험장\*

# Plant Regeneration from Mesophyll Protoplast of *Nicotiana africana*

S. J. Choi and S. C. Lee\*

Korea Genseng & Tobacco Research Institute, Suwon Experiment station

Korea Genseng & Tobacco Research Institute, Taegu Experiment station

**ABSTRACT :** Protoplasts of palisade cells were aseptically isolated from leaves of *Nicotiana africana* Merxm. by the one step enzymatic method. Efficiency of colony formation were depended on cell density and light condition during incubation, but an intensity of 47 ft-c during a period of 2 weeks after isolation of the protoplasts in the Nagata and Takebe's medium promoted the planting efficiency. Protoplast-derived calli of *N. africana* can be differentiated into shoot when cultured on Murashige and skoog's medium containing IAA(0.5mg/l) and zeatin(5.0mg/l).

### 서 론

1892년 Klercker가 최초로 식물세포의 원형질체를 나출시킨 이후 Cocking<sup>5)</sup>, 이 토마토 근단세포로부터 효소처리로 원형질체를 나출시키는데 성공함에 따라 식물세포의 엽육조직으로부터 다량의 원형질체를 나출시키는 연구가 급속도로 발전하게 되었다.

원형질체의 나출에 이용되는 식물은 여러 종에서 광범위하게 이용되고 있으며, 식물의 여러 부위를 재료로 사용하고 있으나 주로 엽육세포를 실험재료의 대상으로 하고 있다. 원형질체 배양은 1970년 Kao등에 의해 대두의 원형질체로부터 세포분열이 일어나는 것을 관찰하였으며, 그 후 Takebe등<sup>6)</sup>이 담배 식물의 원형질체를 배양해서 최초로 식물체를 재분화시킨후 원형질체의 응용에 새로운 국면을 전개시켰다. *N. tabacum*의

엽육 원형질체로부터 식물체 재분화에 관한 연구는 Nagata와 Takebe<sup>13)</sup>가 처음으로 성공한 이래 가자과 이외에도 쌍자엽식물과 단자엽식물에서도 보고되고 있다.

현재까지 *Nicotiana*속의 엽육 원형질체로부터 식물체의 재분화는 *N. tabacum* 이외에도 여러 종에서 원형질체를 나출후 그들로 부터 식물체 재분화가 이루어졌으나 1, 4, 6, 7, 8, 13, 15) 기타 야생종에서는 원형질체로부터 식물체로 재분화는 확립되지 않고 있다<sup>7)</sup>. 식물 원형질체는 완전 단세포이므로 식물의 증식<sup>17)</sup>, 약제저항성, 돌연변이<sup>3)</sup> 등 경제가치가 높은 세포주나 식물체 육성에 효과적이므로 작물육종에 매우 유용하다고 한다. *Nicotiana* 속중 *N. africana*는 1965년 아프리카 대륙 Namibia에서 수집된 극 만생종으로 이를 화분친으로 하여 *N. tabacum*과 중간교배후 그종자를 파종하면 발아된 식물은 대부분 유묘기때 고사하고 0.3% 내외가 살아남는데 이 생존 개체중 maternal

반수체 식물을 15% 정도 얻을 수 있어 반수체 육종법에 적용되고 있다. 또한 이 종은 최근 버어리종 산지에서 문제화되고 있는 PVY에 내병성 인자를 갖고 있어 재배품종에 도입시 실용적인 이용이 가능할 것이다.

따라서 본 시험은 *Nicotiana* 종 중 현재까지 원형질체 배양이 보고되어 있지 않은 *N. africana*의 원형질체 나출조건에서 부터 식물체 재분화에 이르기까지 연구된 결과를 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

본 시험에 공시한 종은 *Nicotiana tabacum* cv. Burley 21(2n=48)과 *N. africana*(2n=46)이다.

원형질체의 나출을 위한 시료는 파종후 60일후 부터 발육기까지 완전히 전개된 엽을 채취하여 사용하였으며 시료의 소독은 70% ethanol에 수 초간 그리고 1.5% sodium hypochlorite 용액에 20분간 멸균한 다음 멸균수로 3-4회 세척하고 엽의 수분을 제거한 후 사용하였다. 원형질체의 나출은 엽 이면의 표피를 제거한 후 1.0×0.5cm로 잘라 효소액 10ml당 1g씩 넣어 28°C 4시간 처리후 3겹으로 된 가재로 여과하고 0.6M mannitol 용액으로 3회 원심분리(50g, 4분간) 하였다. 효소액은 0.6M mannitol 용액에 0.5% macerozyme R-10 및 2.0% cellulase R-10을 첨가하여 조제하였으며 pH는 0.1N KOH로 5.8로 조정하였다<sup>2)</sup>.

원형질체의 배양은 Nagata와 Takebe(NT)<sup>2)</sup> 배지에 접종하였으며, 세포분열 조사는 원형질체의 밀도를 약 1×10<sup>4</sup>cells/ml씩 접종후 14일에 하였다.

Mannitol 함량이 colony 형성에 미치는 영양에 관한 시험에 있어서는 나출한 원형질체를 mannitol 함량이 0.6M인 NT배지<sup>2)</sup>에 7주 배양한 후 mannitol 함량이 0.3 및 0.6M인 NT, MS<sup>2)</sup> 그리고 K<sub>3</sub> 배지<sup>1)</sup>에 재접종 한 후 colony 크기를 조사

하였다.

생장조절물질이 *N. africana* 원형질체의 경엽분화에 미치는 영향에 대해서는 *N. africana*의 엽육 원형질체로 부터 형성된 colony를 IAA, Kinetin, BA, Zip, Zeatin 중 2종 또는 4종의 성장조절물질을 각각 조합하고 그 함량도 달리한 배지에서 경엽분화 정도를 조사하였다.

### 결과 및 고찰

*N. tabacum*과 *N. africana* 2종의 원형질체 나출은 pot 이식후 2주부터 발육기까지 생육이 왕성하고 식물체가 충분히 전개된 엽조직을 0.5% macerozyme R-10, 2.0% dellulase가 함유된 효소액을 1단계 방법<sup>1)</sup>으로 암흑에서 4시간 처리한 결과는 표 1과 같이 원형질체 배양이 가능한 5×10<sup>4</sup>cells/ml 이상의 원형질체를 얻을 수 있다. *N. africana*는 일반적으로 *N. tabacum*과는 달리 극만생종으로 엽은 후엽이어서, 원형질체 나출이 어려울 것으로 생각되었지만, 공시재료를 온실에서 재배되고 충분히 전개된 엽을 사용하여 *N. tabacum*과 동일한 효소액에서 처리시 다량의 원형질체를 얻을 수 있었다.[그림 1]

나출된 원형질체 배양에 있어서 세포벽재생 및 분열은 배지에 접종한 세포의 농도<sup>3)</sup>, 배지에 함유된 식물호르몬<sup>2)</sup> 및 광조건<sup>2)</sup> 등 여러가지 요인에 의해서 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 따라서 *Nicotiana* 속의 야생종에 대한 광조건에 따른 원형질체의 분열정도를 알아보기 위하여 NT배지<sup>2)</sup>에 원형질체를 ml당 5×10<sup>4</sup>cells로 치상하여 0, 47, 186, 325 ft-c 등 4가지 광조건이 세포분열에 미치는 효과를 조사하였다.

광조건을 달리하여 2종의 원형질체를 배양한 결과 표 2를 보면 배양후 5일째부터 1차로 분열 초기 증상이 나타나기 시작하였는데[그림 2] 세

Table 1. Some characteristics of mesophyll protoplasts in 2 *Nicotiana* species.

Species	Observed Protoplast number	Diameters(μm)		Yield of* protoplast
		Mean	RangeL	
<i>N. africana</i>	53	41.8	30.0-67.5	++++
<i>N. tabacum</i>	54	41.9	27.5-52.5	++++

\* +++++ excellent, +++ good, ++ fair, + poor.

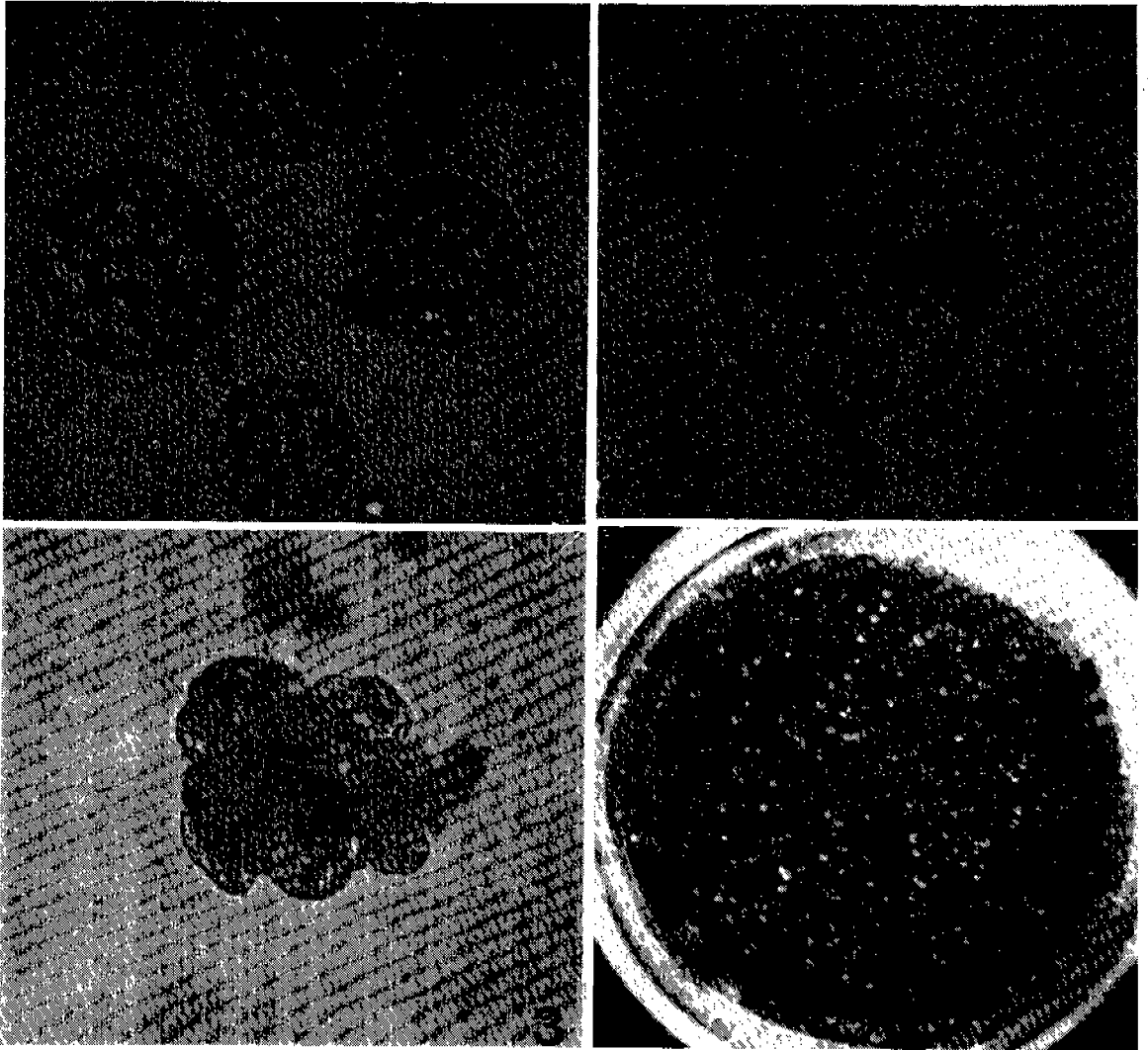


Fig. 1-4. Isolation and culture from *N. africana* mesophyll protoplasts

1. Freshly isolated protoplasts
2. The first cell division of protoplast after 5 days of inoculation
3. Callus after 21 days of inoculation.
4. Growth of colonies after 5 weeks of inoculation.

포분열은 186 및 47 ft-c 하에서 가장 양호하게 나타났다. 그러나 *N. africana*는 *N. tabacum*에 비해 암흑조건하에서 배양시 세포분열정도가 아주 낮았지만 접종후 14일까지 세포분열 회수를 볼때 큰 차이가 없었다[그림 3]. 따라서 *Nicotiana* 속의 야생종은 종에 따라 큰 차이는 없지만 분열조건이 달리 나타날 수 있을 것으로 보인다.

원형질체의 배양배지는 식물의 종에 따라 달리 이용되고 있는데<sup>11, 12, 13)</sup> 배양 초기에는 고농도의 auxin과 저농도의 cytokinin이 첨가되어 배양비율을 높이고 있다. 또한 배양중 세포분열을 촉진시켜주기 위하여 원형질체를 나출시킨후 0.6M mannitol이 함유된 NT 배지에서 7주동안 배양하여 형성된 colony(그림 4)를 mannitol이 각각 0.6M,

Table 2. Effect of light intensity on protoplast division in isolated mesophyll protoplasts of 2 *Nicotiana* species

Species	% cell division*			
	325(ft-c)	186(ft-c)	47(ft-c)	Dark
<i>N. africana</i>	14.9	41.1	51.3	1.4
<i>N. tabacum</i>	21.0	48.4	48.0	15.1

\* : % cell division of isolated protoplasts after 14 days of culture.

0.3M이 함유된 NT, MS 및 K<sub>3</sub> 배지 등의 액체배지에서 각각 치상하여 증식된 세포의 크기를 조사하였는데 그 결과는 표 3과 같다. 공시된 두 종 모두 mannitol 농도별 colony의 크기를 비교하여 보면 0.6M에 비하여 0.3M에 치상한 결과 colony 크기가 더 증가되었으며, *N. africana*의 경우 MS 배지가 NT와 K<sub>3</sub> 배지에 비하여, 그리고 MS 0.6 M 보다는 0.3M에서 colony 크기가 더 증가되는 경향을 볼 수 있었다.

배양과정중 세포분열을 촉진시키기 위하여 삼투압을 감소시켜 주어야 하는 것으로 알려져 있는데 본 시험에서 나타난 결과와 같이 mannitol 0.6M이 0.3M보다 세포증식이 늦은 것으로 보아 일치되는 경향으로 보였다.

엽육 원형질체를 나출하여 NT 배지에서 배양후 8주째 형성된 colony를 여러가지 생장조절제가 함유된 MS 고체 배지상에서 배양하여 그 분화능력을 조사한 결과는 표 4와 같다. 재분화 능력은

생장조절제의 차이에 의해서 분화능력이 다르게 나타났는데 *N. africana*에서는 *N. tabacum*과는 달리 처리된 배지상에서 그 분화능력을 전혀 볼 수 없었다. *N. tabacum*은 여러 종류의 홀몬으로 조성된 7종의 배지상에서 분화가 이루어졌는데, IAA(0.3 mg/l)와 2ip(10.0mg/l)로 조성된 배지와 IAA (2.5 mg/l)와 Kinetin(4.5mg/l)으로 조성된 배지에서 공시한 모든 callus가 분화능력이 있었음을 알 수 있었다.(표 4) 이 중 IAA와 2ip로 조성된 배지가 callus로 부터 식물체의 재분화 능력이 제일 양호하였다.

*N. africana*에 대한 원형질체로 부터 식물체 재분화 능력은 저농도의 auxin과 고농도의 cytokinin이 조성된 배지에서는 재분화가 이루어지지 않아서(표 4), 식물 홀몬농도를 달리 조성한 배지에 *N. africana*의 엽육 원형질체에서 유래된 callus를 치상하여 얻은 결과는 표 5와 같다.

IAA와 kinetin이 조성된 MS 배지에서는 전혀

Table 3. Effect of culture medium on the callus formation of 2 *Nicotiana* species

Culture medium	Mannitol (M)	Colony formation(mm)	
		<i>N. africana</i>	<i>N. tabacum</i>
NT	0.6	0.5b	1.1cd
	0.3	0.7c	1.3d
MS	0.6	0.3a	0.4a
	0.3	1.1e	0.9bc
K <sub>3</sub>	0.6	0.3a	0.5a
	0.3	0.9d	0.7b
Average	0.6	0.4ab	0.7b
	0.3	0.9d	1.0c

Table 4. Shoot regeneration rate of 2 *Nicotiana* species as mesophyll culture on the MS medium treated with different phytohormone combinations.

Solid medium(MS)		<i>N. africana</i>	<i>N. tabacum</i>
Phytohormone combination(mg/ℓ)			
IAA : BA	0.3 : 10.0	0	28(1-3)
	2ip	0	100(15-20)
	Kinetin	0	86(5-10)
IAA : BA	1.0 : 10.0	0	7(5-10)
	2ip	0	100(15-20)
	Kinetin	0	93(3-5)
IAA : Kinetin	2.5 : 4.5	0	100(10-30)

Note : Figures not in parenthesis give percent individual showing shoots(based on 15 calli per treatment). Range of number of shoots per callus given by figures in parenthesis.

Table 5. Effect of phytohormone combination of the shoot regeneration from cell colonies derived from mesophyll protoplasts of *Nicotiana africana*.

Solid medium(MS)		<i>N. africana</i>
Phytohormone combination(mg/ℓ)		
1AA : Kinetin	2.0 : 3.0	0
	2.0 : 0.5	0
	0.5 : 2.0	0
1AA : BA	2.0 : 0.5	0
	0.5 : 2.0	17(1-2)
1AA : 2ip	2.0 : 0.5	0
	0.5 : 2.0	17(1-2)
1AA : Zeatin	0 : 2.0	25(4-5)
	0.5 : 1.0	8(1-3)
	0.5 : 3.0	67(4-6)
	0.5 : 5.0	83(5-7)
	2.0 : 0.5	0
1AA : BA : 2ip	2.0 : 0.1 : 0.3	0
1AA : BA : Zeatin	2.0 : 0.1 : 0.3	0
1AA : Kinetin : BA : 2ip	2.0 : 0.1 : 0.1 : 0.2	0
	2.0 : 0.2 : 0.2 : 0.4	0

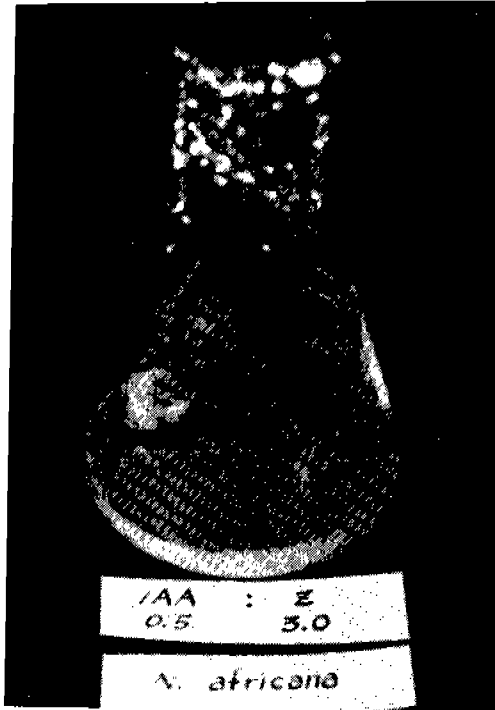


Fig. 5. Shoot regeneration from single mesophyll protoplast of *N. africana*.

분화능력을 볼 수 없었고 IAA(0.5mg/l)에 BA(2.0mg/l) 및 2ip(2.0mg/l)가 조성된 배지상에서는 분화능력의 효과를 볼 수 있었다. 그러나 IAA 0.5mg/l에서는 zeatin의 농도를 높일수록 callus로부터 재분화능력이 높은 경향을 볼 수 있었으며, 조성된 배지중 IAA(2.0mg/l)와 zeatin(5.0mg/l)이 함유된 배지에서 가장 양호하였다.(그림 5) 또한 IAA(2.0mg/l)에 cytokinin을 종류별로 다양하게 조성된 배지에서는 분화능력의 효과가 없었는데 *N. africana*에서는 auxin을 저농도로 하고 cytokinin중 zeatin을 첨가한 배지가 가장 양호한 결과를 얻을 수 있을 것으로 보인다. 이와같이 재분화된 경엽으로부터 근을 형성하기 위해 무기량을 1/2로 감소시키고 식물 홀몬이 첨가되지 않는 MS 배지상에 접종하면 공시된 *N. tabacum* 및 *N. africana* 모두 발근현상을 볼 수 있었고, 이들을 pot에 이식시켜 육성하면 완전한 식물체를 얻을 수 있었다. *Nicotiana*속에 있어서는 종에 따라 원형질체 분리조건과 이들 callus로부터 유식물체 분화는

배지 조성조건에 따라 달리 이루어진다고 하는데 *N. africana*는 *N. tabacum*과 같이 원형질체로부터 식물체의 재분화에는 큰 어려움이 없는 것으로 나타났다.

## 결 론

*N. africana*의 엽육 원형질체의 나출은 일단계 효소처리 방법에 의해 많은 양의 원형질체를 얻을 수 있었으며, 세포분열 조건은 세포농도와 조도에 따라 좌우되는데 Nagata와 Takebe 배지상에서 조도를 47 ft-c 으로 하였을 때 가장 양호한 결과를 얻을 수 있었다.

이들로부터 재분화 능력을 구명하기 위하여 저 auxins과 고 cytokinin이 함유된 8종의 배지상에 colony를 접종하였을 때 IAA(0.5mg/l)와 zeatin(5.0mg/l)이 함유된 Murashige와 Skoog 배지상에서 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

## 참고문헌

1. Banks, M.S., and P.K.Evans. Plant Sci. Lett. 7 : 409~416(1976).
2. Binding, H. Physiol. Plant. 35 : 225~227(1975b).
3. Bourgin, J.P. Mol. Gen. Genet. 161 : 225~230(1978).
4. Bourgin, J.P., Y. Chupeau, and C. Missonier. Physiol. Plant. 45 : 288~292(1979).
5. Cocking, E.C. Nature 187 : 962~963(1960).
6. Douglas, G.C., W.A. Keller, and G. Setterfield. Can. J. Bot. 59 : 208~219(1981).
7. Evans, D.A. A. Pflanzenphysiol. 95 : 459~463(1976).
8. Gill, A., A. Rashid, and S.C. Maheshwari. Protoplasma. 96 : 375~379(1978).
9. Gisela, E. B. Z.Naturforsch. 28C : 470~471(1973).
10. Kao, K.N., R. Constabel, M.R. Michayluk, and O.L. Gamborg. Planta. 120 : 215~227(1974).
11. Kao, K.N., and M.R. Michayluk. Planta. 126 : 105~110(1974).
12. Murashige, T., and F. Skoog. Physiol. Plant. 15 : 473~497(1962).

13. Nagata, T., and I. Takebe. *Planta*. 99 : 12~20 (1971).
14. Power J.B., and E.C. Cocking. *BiochemJ.* 111 : (1968).
15. Scowcroft, W.R., and P.J. Larkin. *Theor. Appl. Genet.* 60 : 179~184(1981).
16. Takbe, I., G. Labib, and G. Melchers. *Naturwissenschaften*. 58 : 318~320(1971).
17. Wenzel, G., O. Schieder, Przewozny, S.K. Sopory, and G. Malchers. *Appl. Genet.* 55 : 49~55(1979).