

포지유전자로 형질전환된 연초와 감자로부터 원형질체의 유리 및 융합

양덕춘^{*} · 박태은¹ · 민병훈¹ · 최경화² · 정해준¹

한국인삼연초연구원 유전생리부, 배재대학교 원예학과¹, 한국과학기술원 생명공학연구소²
(1998년 2월 19일 접수)

Protoplast Isolation and Fusion of *Nicotiana glauca* and *Solanum tuberosum* Transformed by Selectable Marker Genes

Deok Chun Yang^{*}, Tae Eun Park¹, Byung Hoon Min¹, Kyung Hwa Choi² and Hae Jun Chung¹

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon 305-345

¹Department of Horticulture, Paichai University, Taejon 302-735

²Plant Tissue Culture Research Unit, KRIBB, Taejon 305-600

(Received February 19, 1998)

ABSTRACT : Protoplasts were isolated from mesophyll of tobacco(*Nicotiana glauca*) transformed with kanamycin-resistant gene (NPT II gene) and potato hairy root callus containing Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*, and protoplast fusion was made between the isolated protoplasts. The transgenic tobacco leaf tissue could grow on the media containing high concentrations of kanamycin, but not on the phytohormone-free media. On the other hand, the potato hairy root calli could be cultured on the phytohormone-free media but not on media containing more than 40 μ g/ml kanamycin. In these conditions, the viability of both protoplasts were above 90%. These selection markers were used for the selection of protoplasts fused between the two, i.e. protoplast fusion was detected using selection media containing 100 μ g/ml kanamycin and with no phytohormone. The mixture of 1.0% cellulase, 0.3% macerozyme, and 0.7M mannitol was best for the maximum protoplast production for tobacco, and that of 2.0% cellulase, 2.0% macerozyme, 1.0% dricelase, and 0.5M mannitol for potato. Both tobacco mesophyll and potato callus protoplasts were fused by using PEG solution on the selectable medium. Cell walls were regenerated after 5 days in this medium, and colonies were alive until 4 weeks after culture, but died after 6 weeks.

Key words : kanamycin, protoplast, Ri-plasmid, selectable marker

고등식물의 원형질체는 광범위한 유전자조작을 위한 도구로 사용되고 있으며 원형질체 배양을 통해 돌연변이체를 얻거나 체세포 잡종식물의 획득 뿐만 아니라, 유용한 외래 유전물질을 원형질체내

에 삽입시켜 신품종 육성 등 육종을 위한 새로운 시도로서 활발한 연구가 진행되고 있다.

*Nicotiana glauca*와 *N. langsdorffii*의 첫 중간 잡종식물체가 얻어지고(Carlson 등, 1972), *Solanum*

* 연락처자 : 305-345, 대전광역시 유성구 신성동 302, 한국인삼연초연구원

* Corresponding author : Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Sinseong-dong Yusung-ku, Taejon 305-345, Korea

*tuberosum*과 *Lycopersicon esculentum*의 원형질체 융합을 통하여 속간 잡종식물을 얻은(Melchers 등, 1987) 이후로 종 또는 속간 원형질체 융합에 대한 많은 연구가 시도되었으나 그다지 커다란 성과를 보이지 못하고 있다. 물론 이것은 이종, 이속간의 원연의 융합잡종체가 환경에 적응하지 못하고 도태되거나 실용성이 없는 원인이 대부분이지만 일부 융합된 원형질체를 융합되지 않은 양친의 세포와 효율적으로 선발하는데 어려움이 있었기 때문으로 생각된다. 잡종융합체의 선발방법에는 백화돌 연변이체를 이용하는 방법(Kao, 1974), 한정된 선택배지를 이용하는 방법(Carlson 등, 1972), 영양요구성을 이용하는 방법(Hein과 Schieder, 1983), 항생제 저항성을 이용하는 방법(Shahin과 Simpson, 1986), 형광물질로 표지하는 방법(Galbrith과 Mauch, 1980), iso-osmotic density gradient를 이용한 방법(Harms and Potrykus, 1978) 등이 보고되고 있으나 이들은 어떤 특정 표지를 가지고 있는 돌연변이체나 형태적인 표지를 가지고 있는 것을 융합 상대 세포로 사용하는 경우에 국한되어 있으므로 모든 식물체에서 광범위하고 쉽게 선발할 수 있는 새로운 선발방법이 필요하다고 생각된다.

토양세균인 *Agrobacterium rhizogenes*가 식물체의 상처를 통하여 감염되면 모상근(hairy root)이 유도되는데 이는 Ri-plasmid의 일부분인 T-DNA가 식물세포내에 도입되어 형질전환된 현상으로(Chilton 등, 1982), *in vitro* 상태에서 식물호르몬 무첨가배지에서도 계속 자랄 수 있게 된다. 한편 식물유전공학기술의 발달로 외래유전자를 식물세포에 도입하여 형질전환을 유도할 수 있게 되어, kanamycin (An, 1985), hygromycin(Van den Elzen 등, 1985), chloramphenicol (Tompfer 등, 1988), methotrexate (Herrer-Estrella 등, 1983) 등 표지유전자를 식물체의 핵내로 삽입시켜 발현시킴으로써 항생제 등에 저항성을 나타내는 세포주를 쉽게 선발할 수 있게 되었다.

따라서 본 실험은 연초와 감자조직의 원형질체 융합을 위한 선발 marker로써 연초는 항생제 kanamycin에 내성을 나타내는 NPT II gene을 도입시킨 형질전환체를, 그리고 감자는 *Agrobacterium*의 Ri-plasmid를 이용하여 유도된 모상근을 각각

융합 partner로 사용하여 항생제 내성 연초형질체 원형질체와 식물호르몬 비요구성 감자세포주의 원형질체를 융합시킨 후 초기에 두 표지유전자가 발현되는 세포만 선발하여 체세포 잡종체를 선발하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

연초(*Nicotiana glauca*)는 항생제인 kanamycin에 저항성을 나타내는 NPT II gene이 도입되어 형질전환된 엽육조직을 사용하였으며(Yang, 1990), 융합 partner로 사용한 감자(*Solanum tuberosum* cv. Daeji) hairy root callus는 감자괴경 disc에 *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834를 감염시켜 유기된 모상근(Yang 등, 1998)을 2,4-D 2mg/l와 casein hydrolysate (CH) 1g/l가 첨가된 배지에서 성장한 callus를 이용하였다.

형질전환된 연초식물체의 kanamycin에 대한 반응

Kanamycin 저항성 연초식물체의 shoot를 BA 0.5 mg/L 첨가된 MS 배지에 기내 삼복으로 다량증식시킨 후 잎 절편체를 2,4-D 0.5mg/l가 첨가된 MS 배지에 kanamycin을 각각 0, 100, 500, 1,000, 2,000 µg/ml 농도로 처리하여 절편당 형성된 callus를 %로 나타내었다. 또한 정상식물체와 형질전환 식물체의 shoot 부위를 절단하여 kanamycin 100µg/ml가 첨가된 MS 기본배지에 치상하여 성장과 부정근 형성여부를 관찰하였다.

감자 모상근 유래 callus의 현탁배양 및 kanamycin에 대한 반응

원형질체 유리에 사용하기 위하여 모상근에서 유기된 callus를 다시 현탁배양하였다. 현탁배양은 2,4-D 2mg/l와 CH 1g/l가 첨가된 MS 배지에서 배양하였고 2주간격으로 계대배양을 하였다. 계대배양시는 큰 세포 덩어리를 제거하기 위하여 0.5mm sieve로 통과시켰으며 현탁배양된 세포를 신선한 50ml 배지에 10ml씩 분주하여 gyratory shaker로 암상태에서 100rpm으로 하여 현탁배양 하였다. 현탁배양된 세포는 kanamycin에 대한 반응정도를 조

사하기 위하여 호르몬이 첨가되지 않은 MS 배지와 2,4-D가 2mg/l 첨가된 MS 배지에 CH를 1g/l 첨가하고 kanamycin을 0, 20, 40, 60, 80, 100µg/ml 농도로 처리하여 callus 증식 여부를 조사하였다.

형질전환 조직으로부터 원형질체 유리

연초엽육조직은 1% NaOCl에서 15분간 소독한 후 3회 멸균증류수로 세척하여 약 1mm 폭으로 길게 절단하거나 일부 하층포피를 제거하여 원형질체 유리에 사용하였다. 연초엽육조직의 원형질체 유리에 사용한 효소용액은 CPW(KH₂PO₄ 27.2mg, KNO₃ 101mg, MgSO₄·7H₂O 246mg, KI 0.16mg, CuSO₄·5H₂O 0.025mg, CaCl₂·2H₂O 1480mg, H₂O 1l) 용액에 cellulase Onozuka R-10을 0.01, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0%, macerozyme R-10을 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0%로 혼합 처리하였다. 유리된 원형질체는 21% sucrose gradient로 정제된 후 CPW 용액에 세척하여 융합재료로 사용하였고 효소농도에 따른 원형질체의 유리정도를 조사하였다. 감자 모상근 유래 callus는 1주간 현탁배양하여 100 µm stainless sieve로 수확한 후, 각각 1g씩을 10ml의 효소액이 담겨 있는 9cm Petri dish에 침적시켜 aluminum foil을 이용하여 암상태를 유지시키고, 16시간 동안 gyratory shaker를 이용하여 35rpm으로 진탕배양하였다. 현탁배양된 감자 모상근유래 callus는 CPW 용액에 cellulase Onozuka R-10 2.0%와 macerozyme R-10을 2.0%로 고정하고 dricelase를 0.5, 1.0, 2.0% 농도로 조합처리 하였으며, pH는 5.8, mannitol 농도는 0.7M로 고정하여 원형질체를 유리하였다. 유리된 원형질체는 60µm stainless sieve로 cell debris를 제거한 후 1,000rpm에서 5분간 원심분리하여 효소액을 제거하고 CPW 용액으로 세척하였다.

원형질체 유리에 미치는 osmoticum의 영향과 생존력 조사

원형질체 유리에 미치는 osmoticum의 영향과 생존력 조사는 상기 실험결과로 얻은 최적 효소 용액에 mannitol을 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 M 농도로 처리하여 정제전과 정제후의 원형질체 수를 조사하여 비교하였으며, 원형질체 생존력 조사는 원형

질체 유리후 배양용액에 0.01 % 의 fluorescein diacetate(FDA)를 원형질체 현탁액과 동량을 혼합하여 5분 후에 형광을 발하는 원형질체를 형광현미경으로 조사하여 원형질체 생존률(%)은 전체 원형질체수 중에서 형광을 발하는 원형질체수를 백분율로 환산하여 계산하였다.

원형질체 융합 및 배양

원형질체의 융합은 Kao 등(1977)의 방법을 약간 변형하여 PEG (polyethylene glycol) solution(PEG 1,540 50g, CaCl₂·2H₂O 150mg, KH₂PO₄ 10mg, glucose 1g, H₂O 100ml)과 PEG eluting solution (50mM glycine, 0.3M glucose, 50mM CaCl₂·2H₂O)을 사용하였다. T-DNA가 도입된 감자조직과 NPT II gene이 도입된 연초조직의 원형질체를 약 5 x 10⁵ 개/ml로 되도록 희석한 다음 각각 1ml씩 취하여 10ml centrifuge tube에 넣고 PEG solution을 서서히 넣으며 잘 섞은 후, 20분 후에 PEG eluting solution을 첨가하여 400rpm에서 4분간 3회 세척하였다. 배양은 Kikuta and Okazawa(1987) 배양용액에 호르몬을 첨가하지 않고 kanamycin 100µg/ml를 첨가하여 배양하였다. 세포벽 재생여부는 sorbitol 0.7M 용액에 0.1%의 fluorescein brightener 28(FB)을 사용하여 확인하였다. 융합원형질체의 1차적인 확인은 형광현미경하에서 수행하였으며 최종적으로는 선발배지에서 생존여부로 확인하였다.

결과 및 고찰

형질전환된 연초식물체의 callus배양 및 kanamycin에 대한 반응

항생제 kanamycin에 대해서 저항성을 나타내는 형질전환된 연초식물체의 잎과 정상식물체를 식물호르몬 무첨가 및 2,4-D 0.5mg/l에 kanamycin이 100µg/ml가 첨가된 배지에 각각 치상한 후 배양하였던 바, 식물호르몬이 전혀 첨가되지 않은 배지에서는 형질전환체 및 정상식물체 공히 callus가 형성되지 않고 황백화 되는 것을 관찰할 수 있었으나, 2,4-D가 첨가된 배지에서는 형질전환체의 경우 kanamycin이 첨가된 배지에서도 왕성히 성장한 반면 정상식물체는 모두 고사하였다(Fig. 1-A). 또한

형질전환된 식물체의 kanamycin에 대한 내성정도를 조사한 결과, kanamycin 100 μ g/ml와 1,000 μ g/ml 농도에서는 callus의 형성율이 100%일 뿐만 아니라 생체중도 kanamycin 무첨가배지와 비슷한 경향을 보였다(Table 1). 다만 고농도인 2,000 μ g/ml부터는 callus의 형성과 생체중이 감소되는 경향을 보였으니 생존은 가능하였다. 따라서 본 실험의 목적상 형질전환연초식물체는 식물호르몬 무첨가 배지에서는 전혀 성장하지 않으며, 호르몬 첨가시에는 고농도의 항생제 농도에서도 생존이 가능하여 원형질체 융합시 kanamycin 및 식물호르몬 무첨가를 표지매체로 사용할 수 있을 것으로 생각되었다.

Table 1. Effect of kanamycin on the callus formation and growth of tobacco transformant with NPT II gene in MS medium supplemented with 0.5 mg/l 2,4D

Conc. of kanamycin (μ g/ml)	Fresh weight (g/flask)	Rate of callus formation (%)
0	5.01 \pm 0.34	100
100	5.36 \pm 0.32	100
1,000	5.09 \pm 0.21	100
2,000	2.20 \pm 0.13	67

감자 모상근유래 callus의 현탁배양 및 kanamycin에 대한 반응

감자 모상근은 식물호르몬 무첨가 배지에서 생장이 왕성하지만 callus상태로 성장하지 않고 잔뿌리상태로 성장하기 때문에 2,4-D가 첨가된 배지에서 유기된 callus(Yang 등, 1998)를 계속 고체배지에서 계대배양을 하면 초대배양시 보다 callus의 증식이 저조하고 갈변되는 경우가 많아 2,4-D 2mg/l와 casein hydrolysate(CH) 1g/l가 첨가된 배지에 현탁배양하여 2주 간격으로 계대배양을 하였던 바, 감자 callus는 양호한 상태로 급속 증식되고 또한 갈변현상이 없이 증식할 수 있어 원형질체유리에 적합할 것으로 사료되었다. 특히 2,4-D가 첨가된 고체배지에서 배양된 모상근유래 callus는 다시 식물호르몬 무첨가 배지에 계대배양 하게 되면

모상근의 특성 나타나 callus로 성장하지 않고 다시 잔뿌리상태의 모상근으로 되었으며(Fig. 1-B), 2,4-D가 첨가된 현탁배지에서 배양된 세포도 다시 호르몬 무첨가 고체배지에 drop culture(Fig. 1-C-D)를 하거나 single culture(Fig. 1-C-S)를 하게 되면 callus로 성장하다가 다시 모상근이 발생하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1-B). 한편 현탁배양된 감자의 모상근유래 callus를 식물호르몬 무첨가 배지와 2,4-D 2mg/l가 첨가된 MS고체배지에 kanamycin을 20 μ g/ml 간격으로 100 μ g/ml까지 농도별로 처리

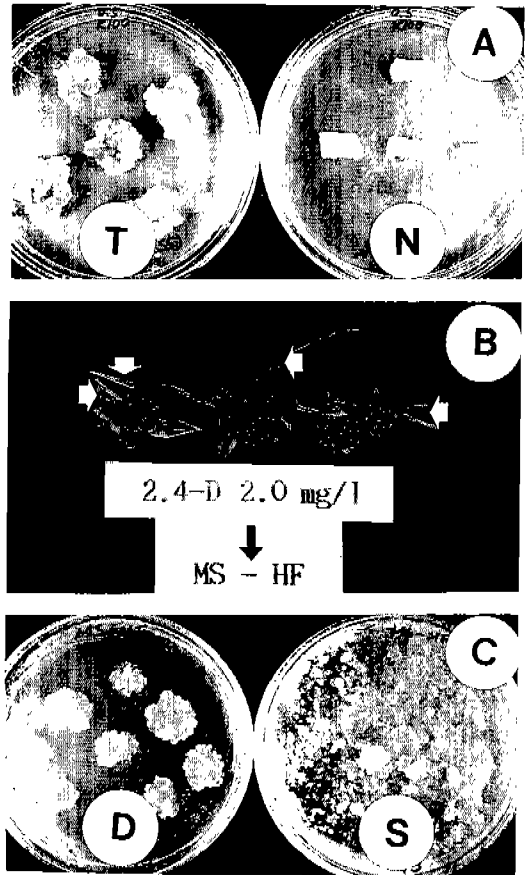


Fig. 1. Characteristics of transgenic(A-T) and normal(A-N) tobacco leaves cultured on media with 100 kanamycin, potato hairy roots (arrows) induced form hairy root callus(B), and calli cultured by drop(C-D) and single(C-S) culture on the hormone-free media.

하여 배양하였던 바, kanamycin 20 μ g/ml 에서는 호르몬 첨가 및 무첨가 배지에서 공히 약간의 callus가 형성되었으나 40 μ g/ml 이상에서는 callus가

전혀 형성되지 않았다(Table 2). 그러나 kanamycin이 첨가되지 않은 배지에서는 처리구 모두 좋은 생육을 보여주고 있어 kanamycin이 원형질체의 용합을 위한 선발 marker로 이용이 가능하다고 판단되었다.

Table 2. Effect of kanamycin on the growth of callus derived from potato hairy root on the media with/without phytohormone

Concentration of kanamycin (μ g/ml)	Growth of callus	
	Phytohormone free	2,4-D (2 mg/l)
0	+++	+++
20	+	+
40	-	-
60	-	-
100	-	-

+++ : good growth + : poor growth
- : no growth

형질전환 조직으로부터 원형질체 유리

NPT II gene이 도입되어 형질전환된 연초의 엽육조직과 정상조직, 그리고 감자모상근 및 모상근 유래 callus로부터 원형질체의 유리를 위해서 cellulase의 농도를 0.5%로 고정하고 macerozyme을 농도별로 달리 처리하여 원형질체의 유리정도를 조사한 결과 연초의 경우 정상조직에서 뿐만 아니라 형질전환체에서도 동일하게 0.3% 및 0.5%의 macerozyme의 농도에서 양호한 경향을 보였다(Table 3). 그러나 감자의 모상근뿐만 아니라 모상근 유래 callus에서도 전혀 원형질체가 유리되지 않

Table 3. Effect of macerozyme on the protoplast isolation of normal and transgenic tobacco plants, and potato hairy root and hairy root callus

Enzyme concentration(%)		Tobacco		Potato	
Cellulase	Macerozyme	Normal	Transformant	Hairy root(HR)	HR callus
0.5	0.1	+	+	-	-
0.5	0.3	++	++	-	-
0.5	0.5	++	++	-	-
0.5	0.7	+	+	-	-
0.5	1.0	+	+	-	-

- : no, + : poor, ++ : good isolation of protoplasts.

Table 4. Effect of cellulase on the protoplast isolation of normal, transgenic tobacco plants, potato hairy root, and hairy root callus

Enzyme concentration(%)		Tobacco		Potato	
Cellulase	Macerozyme	Normal	Transformant	Hairy root	Hairy root callus
0.01	0.3	+	+	-	-
0.3	0.3	+	+	-	-
0.5	0.3	++	++	-	-
1.0	0.3	+++	+++	-	-
2.0	0.3	+++	+++	-	-

- : no, + : poor, ++ : good, +++ : very good isolation of protoplast.

았다(Table 3).

상기 결과를 바탕으로 하여 macerozyme의 농도를 0.3%로 고정하고 다시 cellulase를 농도별로 처리한 결과 연초의 경우에는 정상조직뿐만 아니라 형질전환체에서 원형질체의 유리가 양호하였으며 (Fig. 2-A), cellulase 0.5%에서보다 1.0%와 2.0%에서 더 양호하게 원형질체가 유리되었다(Table 4). 그러나 감자의 경우에는 마찬가지로 모상근과 모상근유래 callus 공히 동일 농도에서 전혀 원형질체가 유리되지 않았다(Table 4).

연초의 잎에서 원형질체의 유리는 타작물에 비해 비교적 쉬우며 또한 많은 연구가 수행되었는바, 효소의 조성은 *Nicotiana glauca*와 *N. langsdorffii*의 엽육조직에 cellulase 2%, hemicellulase 2%, pectinase 1%를(Smith 등, 1976), 또는 cellulase 1%, hemicellulase 1%, pectinase 0.5%를(Kao, 1977) 이용하여 원형질체 분리가 양호하였다고 보고하였고, 본 실험에서도 비록 외부유전자가 도입된 연초형질전환체이지만 정상조직과 마찬가지로 cellulase 1-2%에서 원형질체 유리에 양호하여 비슷한 경향을 보였다. 반면 감자에서 유기된 모상근과 모상근유래 callus의 경우에는 원형질체의 유리가 전혀 되지 않아(Tables 3, 4), cellulase 및 macerozyme의 농도를 증가 시켜 2%로 고정하고 dricelase를 추가로 첨가하여 원형질체를 유리한 결과 모상근의 경우에는 역시 원형질체의 유리가 불가능하였지만 모상근유래 callus의 경우에는 원형질체의 유리가 가능하였다. 특히 dricelase의 농도가 1-2%에서는 원형질체의 유리가 0.5%에 비해 더 양호한 경향을 보였다(Fig. 2-B, Table 5).

모상근과 비슷한 과정에 의해서 형질전환된

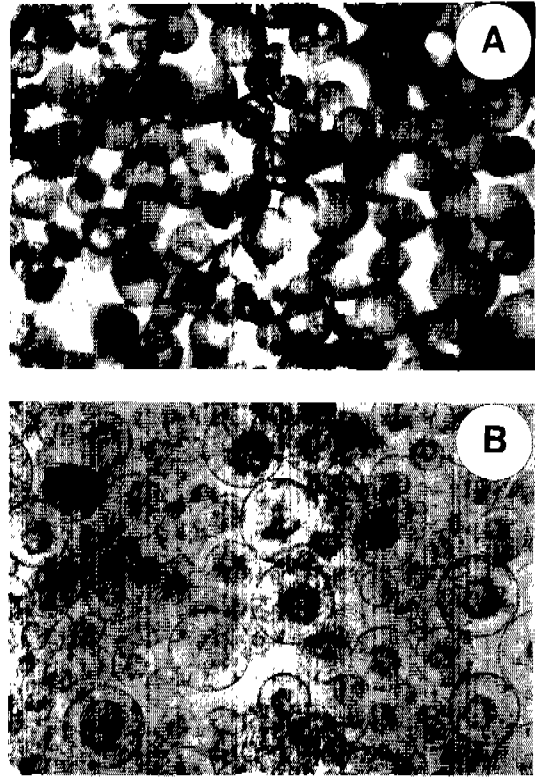


Fig. 2. Protoplasts isolated from transformed tobacco mesophyll tissue(A) and transformed potato hairy root callus(B).

crown gall tumor에 cellulase onozuka R-10과 macerozyme R-10을 이용하여 원형질체 유리를 시도하여 성공한 바 있으나(Wullems and Schilperroort, 1980), 본 실험에서는 감자괴경에서 유도된 모상근을 여러 방법과 효소를 처리하여 원형질체

Table 5. Effect of dricellase on the protoplast isolation from potato hairy root and hairy root derived callus

Enzyme solution (%)			Potato	
Cellulase	Macerozyme	Dricellase	Hairy root	Hairy root callus
2.0	2.0	0.5	-	++
2.0	2.0	1.0	-	+++
2.0	2.0	2.0	-	+++

- : no, + : poor, ++ : good, +++ : very good isolation of protoplasts.

유리를 시도하였으나 원형질체가 전혀 유리되지 않았다(Table 3, 4). 또한 모상근에서 유래된 조직에서 원형질체 유리를 시도한 경우는 아직 보고되어 있지 않고 있다. 그러나 모상근유래 callus를 현탁배양 하여 원형질체를 유리한 결과, 많은 양의 원형질체를 획득할 수 있었다(Fig. 2-B). 감자의 원형질체 유리는 이미 엽육조직에 macerozyme와 cellulase 만을 이용하여 원형질체를 유리시켰으나 (Shepard 와 Totten, 1977), 본 실험에서는 이 두 효소로는 원형질체가 유리되지 않고 dricellase을 사용하여야지만 원형질체가 유리된 것은 사용된 조직이 각각 다르기 때문인 것으로 생각된다.

원형질체 유리에 미치는 osmoticum의 영향과 생존력 조사

위에서 얻은 최적농도의 효소액에 mannitol 농도가 원형질체 유리에 미치는 영향을 조사하였던 바, 기내배양한 형질전환된 연초의 엽육조직은 가장 높은 농도인 0.8M에서 원형질체가 4.39×10^5 개로 가장 많았고(Fig. 3-A), 형질전환된 감자의 현탁배양된 세포도 0.8M에서 17.70×10^5 개로 가장 많았으며 농도가 낮을 수록 수량이 감소되었다(Fig. 3-B). 그러나 생존력은 FDA처리 후 형광을 발하는 원형질체를 조사한 결과 연초 엽육조직이 mannitol 0.7M에서 96.8%로 가장 생존율이 높았고 감자의 모상근에서 유래된 현탁배양세포는 0.5M에서 97.8%로 가장 높았으나 mannitol 농도별로는 큰 차이를 보이지 않았다. 원형질분리제로 사용된 mannitol의 농도는 원형질체 유리후 세포벽의 재생 및 분열등에 상당한 영향을 미치므로 두 종류의 원형질체의 융합을 위해서 동일한 농도를 사용하는 것이 배양에 좋을 것으로 생각된다. 따라서 본 실험에서 나타난 mannitol의 농도는 최적으로 연초 형질전환체의 경우 0.7M에서, 그리고 모상근 유래 callus의 경우 0.5M에서 양호하였으나 농도간에 커다란 차이를 보이지 않아 두 종류 모두 0.7M에서 원형질체를 유리하더라도 이상이 없을 것으로 생각되어, 본 실험 원형질체의 융합을 위해서 두 종류의 조직을 모두 0.7M의 mannitol로 원형질체를 유리시켜 사용하였다.

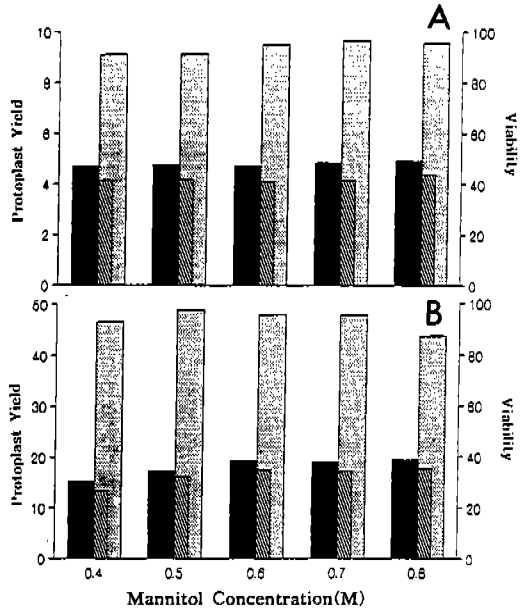


Fig. 3. Effects of mannitol on the yield(10^5 /g.F.W) of total protoplast(■), healthy protoplast(▨) and viability(%), isolated from transgenic tobacco(A) mesophyll leaf and potato(B) hairy root callus.

원형질체 융합 및 배양

상기 mannitol 0.7M에서 유리된 항생제내성 연초 및 감자 모상근유래 원형질체를 Kao와 Michayluk (1974)의 polyethylene glycol(PEG 1540)을 이용한 PEG-high pH-high Ca^{++} 방법을 이용하여 융합을 시도하였다. 연초와 감자 원형질체를 PEG가 첨가된 융합액으로 융합시켰을 때 융합액의 처리 후부터 원형질체들이 접근하기 시작하여 15분경에 융합과정을 관찰할 수 있었으며, 융합액 처리 후 약 30분경에는 완전한 융합체가 관찰되었다(Fig. 4-A). 이들 융합체들은 Kikuta 등(1987)이 사용한 배지에 drop culture 시키면서 5일 후에 세포벽 재생 여부를 fluorescent brightener 28로 조사한 결과 형광을 발하였고(Fig. 4-B), 선발배지에서도 세포 분열이 계속되어 생장이 되었으며 4 주 후부터는 colony가 발견되었으나, 계속 생장이 되지 않고 갈변되어 고사하였다(Fig. 4-C). 따라서 융합체의

배양을 위한 배지의 개발과 배양방법이 추가적으로 이루어져야 많은 체세포잡종체 식물체를 획득할 수 있다고 여겨졌다. 또한 원형질체 융합을 통한 체세포 융합체를 만드는 과정에서 중요한 것은 원형질체 상호간을 식별할 수 있는 maker가 있어야 하는데 본 실험은 융합 처리 후 배양시 융합된 세포만 생존할 수 있도록 연초조직에는 kanamycin에 내성을 가질 수 있도록 NPT II gene을 도입시켰고, 감자조직에는 식물호르몬 무첨가 배지에서도 자랄 수 있는, 즉 식물생장호르몬을 자가

합성하는 T-DNA를 도입하였으므로 배지에 고농도의 kanamycin을 첨가하고 호르몬을 첨가하지 않을 경우 융합되지 않은 원형질체나 같은 조직끼리 융합된 원형질체는 생존하지 못하고 오로지 이핵접합체만 생존할 수 있는 선발 marker로 사용하였다. 이런 방법은 이미 streptomycin에 저항성인 조직과 crow gall tumor callus를 체세포융합을 하여 호르몬 비요구성과 streptomycin에 저항성을 가지는 callus를 선발하였다고 보고(Wullems 등, 1980)한 바 있으며, 연초에서 NPT gene 과 CAT gene 을 선발 marker로 이용하여 원형질체를 전기 융합한 후 kanamycin과 chloramphenicol을 첨가된 배지에서 체세포 잡종체를 선발하였다고 보고(Komari 등, 1989)되어 앞으로 이런 강력한 표지유전자를 이용하여 체세포잡종체 선발 및 배양 과정 중 유전물질의 변이 연구등에 유용하게 이용될 것으로 보인다. 또한 본 실험에서 사용한 selectable marker gene은 T-DNA와 NPT II gene으로써 핵내에 삽입되어 발현되므로 추후 배양조건만 개선된다면 원형질체 융합 후 이핵접합체만을 초기에 선발할 수 있고 이핵접합체의 여러 가지 유전적변이와 생리적 변화 연구에 도움이 될 것으로 기대된다.

결 론

표지유전자를 이용하여 체세포 잡종체를 선발하기 위한 연구의 일환으로 연초는 NPT II gene이 도입된 kanamycin 저항성 형질전환체를, 그리고 감자는 식물호르몬 무첨가 배지에서도 성장가능한 모상근유래 callus를 이용하여 원형질체의 유리 및 융합을 시도하였다. 연초 형질전환체의 엽육조직은 kanamycin 1,000 μ g/ml가 첨가된 배지에서도 왕성히 성장되었으나, 감자 모상근유래 callus는 40 μ g/ml 첨가된 배지에서도 모두 죽었다. 그러나 연초 형질전환체는 식물호르몬 무첨가배지에서 전혀 생장이 되지 않은 반면, 감자 모상근유래 callus는 식물호르몬이 첨가되지 않았거나 2,4-D 2mg/l 첨가된 배지에도 생존이 왕성하였다. 원형질체의 유리는 형질전환 연초의 엽육조직의 경우 cellulase 1%, macerozyme 0.3%와 mannitol 0.7M에서 양호하였

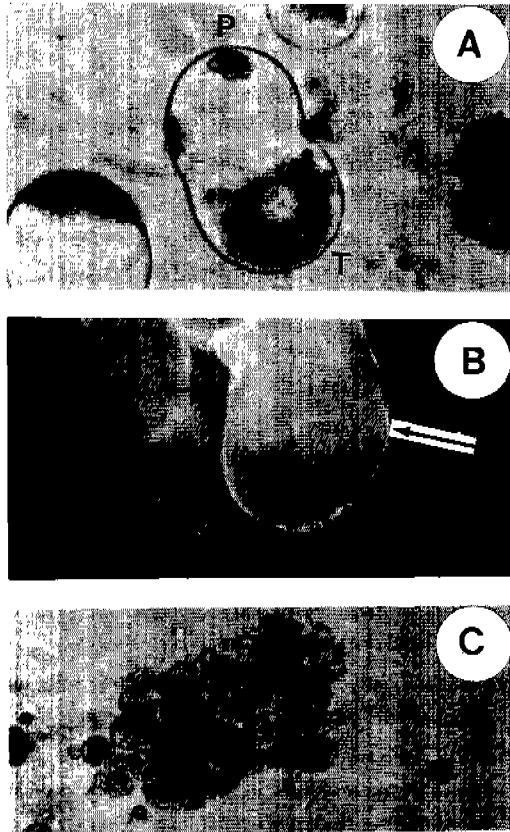


Fig. 4. Fusion of protoplasts isolated from tobacco transgenic mesophyll leaf(A-T) and potato hairy root callus(A-P), cell wall regeneration of fused protoplast after 5 days culture by treatment of 0.01% FB-28(B), and aggregate of dead cells(C) from fused protoplast on the growth regulator free media with 100 kanamycin after 6 weeks, which cells were alived until 4 weeks.

으며, 감자 모상근유래 callus의 경우는 cellulase 2%, macerozyme 2%, dricellase 1%와 mannitol 0.5M에서 가장 양호하게 유리되었다. 이때 유리된 원형질체의 생존력은 공히 90% 이상이었다. 원형질체의 융합은 PEG solution 처리 15분 후부터 관찰되기 시작하여 30분에 완전히 융합되었고, 융합된 원형질체는 선발 marker인 호르몬 무첨가 및 100 μ g/ml kanamycin 첨가배지에서 배양 5일 후에 세포력이 재생되었으며 4주까지는 생존한 colony들이 관찰되었으나 6주후에는 계속 성장을 하지 못하고 고사하였다.

참 고 문 헌

- An G. (1985) High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiol* 79: 568-670.
- Carlson, P.S., H.H. Smith and R.D. Dearing (1972) Parasexual interspecific plant hybridization. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A* 69: 2292-2294.
- Chilton, M.D., D.A. Tepfer, A. Petit and J. Tempe (1982) *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genome of the host plant root cells. *Nature(Lond)* 295: 432-434.
- Galbrith, D.W. and T.J. Mauch (1980a) Identification of fusion of plant protoplasts. 2. Conditions for the reproducible fluorescence labelling of protoplasts derived from mesophyll tissue. *Z. Pflanzenphysiol* 98: 129-140.
- Harms, C.T. and I.Potrykus (1978) Enrichment for heterokaryocytes by the use of iso-osmotic density gradients after plant protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* 53: 49-55.
- Hein, T. and O. Schieder (1983) New procedures for selection and cultivation of somatic hybrids and cybrids. *Effic. Plant Breeding Pro. Corgr. Eucarpia 10th*: 248-250.
- Herrera-Estrella, L.M., De Block, J.-P. Hernalsteens, M. Van Montau and J. Schell (1983) Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.* 6: 987-995.
- Kao, K.N. (1977) Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean-*Nicotiana glauca*. *Mol. Gen. Genet.* 150: 225-230.
- Kao, K.N. and M.R. Michayluk (1974) A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta(Berl.)* 115: 355-367.
- Kikuta, Y., K. Fujino, W. Saito and Y. Okazawa. 1987. Viability, DNA synthesis and cell wall regeneration on potato protoplasts. In : Y.P.S. Bajaj(ed.) *Biotechnology in agriculture and forest* 3, Springer-Verlag. p. 177-194.
- Komari, T., Y. Saito. F. Nakaido and T. Kumashiro (1989) Efficient selection of somatic hybrids in *Nicotiana tabacum* L. using a combination of drug resistance markers introduced by transformation. *Theor Appl. Genet.* 77: 547-552.
- Melchers, G., M.D. Sacristan and A.A. Holder (1987) Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Res. Commun.* Vol. 43: p. 203-218.
- Shahin, E.A. and R.B. Simpson (1986) A gene transfer system for potato(*Solanum tuberosum* L.) In : Y.P.S. Bajaj(ed) *Biotechnology in agriculture and forestry* 3. Springer-Verlag. p. 224-239.
- Shepard, J.F. and R.E. Totten (1977) Mesophyll cell protoplasts of potato. *Plant Physiol.* 60: 313-316.
- Smith, H.H. and K.N. Combatti (1976) Interspecific hybridization by protoplast fusion in *Nicotiana*. *The Journal of Heredity*, 67: 123-128.
- Tompfer, R., M. Prols, J. Schell and H.H. Steinbib (1988) Transient gene expression in tobacco protoplasts : II. Comparison of the reporter gene systems for CAT, NPT II and GUS. *Plant Cell Reports* 7 : 225-228.
- Van den 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. Bio.* 5: 299-302.
- Wullems, G.J, and R.A. Schilperoort (1980) The expression of tumor markers in intraspecific somatic hybrids of normal and crown gall cells from *Nicotiana tabacum*. *Theor. Appl. Genet.* 56: 203-208.
- Yang, D.C. (1990) Isolation and identification of *Agrobacterium* species and transformation in *Nicotiana* species. *Ph.D. thesis, Degree of Kyung Hee University, Seoul Korea.*
- Yang, D.C., T.E. Park, B.H. Min, E.S. Yoon and H.J. Chung (1998) Transformation of *Solanum tuberosum* by *Agrobacterium* spp. and characteristics of transformants. *Korean J. Plant Res.* 11(1), in press.