

갈래곰보, *Meristotheca papulosa*의 원형질체 분리와 배양

정규화 · 선상미 · 조용철* · 공용근* · 윤장택*

여수대학교 생물공학과

*국립수산진흥원 남해수산연구소

Isolation and Culture of *Meristotheca papulosa* Protoplasts

Gyu Hwa Chung, Sang Mi Sun, Yong Chul Cho*,
Yong Gun Gong* and Jang Taek Yoon*

Dept. of Biol. Eng. Yosu National University, Yosu 550-250, Korea

*South Sea Fisheries Research Institute, NFRDA, Yosu 550-120, Korea

Protoplasts were isolated from the vegetative thalli of *Meristotheca papulosa* using several commercial and crude enzymes. The suitable enzyme combination for the protoplast isolation was 4% abalone acetone powder, 4% Macerozyme R-10 and 4% Hemicellulase in the filtered seawater buffered with 50mM MES (pH 6.0) containing 0.6M mannitol and 0.5% potassium dextran sulfate. Yield of protoplast was 107.6×10^4 cells per gram of fresh thallus. Protoplasts were whitish ovoid in shape and ranged between $7\mu\text{m} \sim 24\mu\text{m}$ in diameter. Division of protoplasts was first observed 9 days after culture in ASP₁₂ medium, and the germination occurred within 25 days. The addition of Guillard's antibiotics in culture media was harmful to the regeneration of protoplasts.

Key words : Protoplast, Enzymatic digestion, *Meristotheca papulosa*, Regeneration

서 론

해조류(seaweeds)는 식품원으로서 뿐만 아니라 독특한 생화학적 물질이 화학, 의학 및 식품산업 등에 다양하게 이용됨으로서 수요가 증가하고 있다(Cheney, 1986; Polne-Fuller and Gibor, 1987). 그러나 해조류가 중요한 해양생물자원으로 주목 받고 양식기술이 획기적으로 발달하고 있음에도 불구하고 품종개량기술은 육상식물에 비하여 초보단계에 머물러 있는 실정이다(鬼頭, 1985).

원형질체는 외래 유전물질의 유입, 막융합력에 의한 잡종체의 유도, 돌연변이유기 등이 용이하여 일찍부터 육상고등식물의 유전적 조작을 위한

중요한 소재로 이용되어 왔으며(Vasil, 1976) 기술응용의 문제점이 충분히 검토된 바 있어 해조류의 유전적 형질개량을 위해서도 유용한 수단이 될 수 있을 것으로 기대된다(Chenny, 1986; Van der Meer, 1987). 해조류의 원형질체조작기술은 연구역사가 짧음에도 불구하고, 원형질체로부터의 재분화(Chen, 1987; Waaland et al., 1990; Reddy and Fujita, 1991; Reddy et al., 1992; Niwa et al., 1993; Chen and Chiang, 1994)와 체세포 원형질체의 융합(Ohiwa, 1975; Saga et al., 1986; Fujita and Migita, 1987; Fujita and Saito, 1990)등에 관하여 보고된 바 있다. 이처럼 수종 해조류에 대한 원형질체의 분리, 재생, 융합등에 대한 연구가 상

*본 연구는 1996년도 학술진흥재단 지방대 육성과제(96-02-H-0032)의 연구비로 수행되었음.

당한 성과를 이루고는 있으나 종에 따른 세포벽 구성분의 특이성 때문에 아직도 원형질체의 대량 획득을 위한 유리효소의 개발이 미흡할 뿐만 아니라, 세포연속배양, 분화의 인위조절을 통한 안정적 재분화체계의 확립, 개체발생에 관한 생리활성물질의 조절작용 등 근본적 문제점이 해결되지 못하고 있다(Amano and Noda, 1994).

홍조류의 돌가사리목에 속하는 갈래곰보(*Meristotheca papulosa*)는 수심 5~30m 연안의 조하대에 생육하는 식용 해조로서 주로 샐러드나 생선회 바닥에 까는 고급 재료로 쓰여 왔으나 최근에는 가공식품이 개발되는 등 용도가 더욱 다양해지고 있다. 본 종의 생산은 지금까지 자연산의 채취에만 의존함으로써 공급량이 절대 부족한 실정이었지만 최근에 인공종묘생산과 양식기술이 개발되어(국립수산진흥원, 1997) 산업적 대량생산이 예상됨에 따라 이용가공기술과 우량품종의 개발이 필요해지고 있다. 그러나 현재까지 본 종에 대한 연구는 생활사규명을 위한 생장, 생육에 관한 보고가 있었을 뿐이다(新村, 1974a,b; 喜田·谷口, 1992). 따라서 본 연구에서는 세포조작기술을 통한 갈래곰보의 유전적 형질개량을 위해서 필수조건인 원형질체의 분리와 배양의 조건을 찾고자 하였다.

재료 및 방법

1997년과 1998년의 3월중순~5월초순에 걸쳐 3주일마다 제주도 서귀포의 수심 10~15m 연안에서 갈래곰보의 엽체를 채취하였다. 채취한 엽체는 24시간 이내에 실험실로 옮겨 멸균해수로 깨끗이 세척함으로써 부착생물과 오염물질을 제거하였다. 손상된 조직을 제거한 엽체는 약 3cm 길이로 절단하여 여과지로 표면의 수분을 제거한 뒤 300mg의 생체를 1% Betadine (포비돈요오드 10% 함유, 현대약품) 용액으로 90초간 표면살균하고 멸균해수로 3회 세척하였다. 살균된 조직은 면도날로 1mm 정도로 잘게 썰어 샬레((60×15 mm, Corning Co., USA)에 넣고, 0.6M mannitol

과 0.5% potassium dextran sulfate를 함유한 50 mM MES 해수완충액(pH 6.0)에 녹인 Papain (Sigma P3375) 10% 용액으로 1시간 전처리하여 동일 해수완충액으로 3회 세척한 후 원형질체 분리를 위한 세포벽 분해효소로 처리하였다.

세포벽분해효소로는 Abalone acetone powder (AAP, Sigma Chemical Co., USA), 소라 내장조효소, *Pseudomonas* sp. strain P-I (Fujita and Migita, 1987)와 *Vibrio alginolyticus* (KCCM No. 40513)의 조효소, 고등식물의 원형질체 분리효소 등을 이용하였다. 소라 내장조효소(TOP), *Pseudomonas* 조효소(BAE), *Vibrio* 조효소(VIB)는 각각 Reddy et al. (1989), Fujita and Migita (1987), Tseng et al. (1992)의 방법에 따라 얻었다. 고등식물용 세포벽분해효소는 Cellulase Onozuka R-10 (CEL), Macerozyme Onozuka R-10 (MAC) (이상 Yakult Honsha Co., Japan), Hemicellulase (HEM), Pectinase (HEM), Driselase (DRI)(이상 Sigma Chemical Co., USA), Protease (PRO) (Kyowa Hakko Co., Japan)를 이용하였다. 원형질체 분리를 위한 효소액은 각 효소를 전처리 과정에 사용한 50mM MES완충액(pH 6.0)으로 4°C에서 1시간 녹여 10,000×g로 30분간 원심분리하여 얻었다. 상기 모든 효소액은 0.22 μ m의 filter로 여과한 후 -20°C에 보관하면서 48시간 이내에 사용하였다.

원형질체 분리를 위한 적정 효소액을 찾기 위하여, 먼저 엽체에 각각의 단일효소 10%액을 처리하여 그 반응에 따라 원형질체의 분리에 효과가 기대되는 효소를 선정한 후 그들을 다양하게 조합하여 사용하였다. 세포벽 분해효소의 처리는 준비된 엽체조직을 Papain 10%액으로 전처리 한 샬레에서 용액을 완전히 제거한 뒤 효소액 5ml를 첨가하여 15~20rpm의 회전진탕기 위에 얹어 25°C의 어두운 곳에서 진탕시켰다. 효소액을 처리한 4시간 후, 분리된 원형질체는 구멍직경 24 μ m의 nylon mesh로 걸러 0.6M mannitol을 함유한 배양용 배지를 사용하여 500rpm으로 3분간씩 3회 원심분리 세척시켜 정제하였다. 수거한 원형

질체는 다시 0.2M mannitol을 함유한 5ml의 배양액을 넣은 사레에 현탁시켜서 배양액 1ml당 4×10^4 개의 농도로 세포밀도를 조정 한 후, 그 중 일부에 20 μ l/ml, 35 μ l/ml의 항생물질 조합액(Guillard's antibiotics, Sigma G1650)을 첨가하여 항온 배양하였다.

배양용 배지는 ASP₁₂ (Provasoli, 1968)와 f/2 (Waaland and Watson, 1980)를 조제하여 121°C에서 15분간 고압증기 살균하여 4°C에 보관하며 사용하였다. 분리된 원형질체의 수는 여과직후에 도립현미경하에서 혈구계수판을 이용하여 계수하고 시료당 임의로 추출한 200개의 세포에 대하여 마이크로메타로 직경을 측정하였다. 항온실은 형광등 조도 1000 lux (12L:12D), 온도 15 \pm 1°C로 조절시켰다. 배지는 3일 마다 mannitol을 함유하지 않은 동일조성의 새로운 배지로 절반씩 교환하였으며 매일 배양체의 상태를 100~400배의 도립현미경으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

갈래곰보의 엽체에서 원형질체를 효율적으로 분리하기 위한 효소조합을 찾기 위하여, 먼저 10% 농도의 다양한 단일효소를 엽체에 처리하여 엽체를 분해하거나 엽체에서 세포를 분리시킬 수 있는 효소가 있는지 알아보았다. 그 결과, 원형질체를 다수 분리시키는 단일효소는 없었으나 엽체의 분해는 처리한 효소에 따라 큰 차이를 나타내었다(Table 1). 즉, AAP와 Driselase는 엽체를 잘 분해시켰으며 Macerozyme R-10과 Hemicellulase

는 전자에 비해 다소 낮은 분해력을 나타내었다. 그러나 Cellulase R-10과 Protease는 분해력이 무척 낮았을 뿐만 아니라 소라내장조효소, *Pseudomonas* 조효소, *Vibrio* 조효소, Pectinase는 조직을 전혀 분해시키지 못하였다. 고등식물의 조직 분쇄와 원형질체 분리에 가장 효과적인 효소로 알려진 Cellulase R-10과 cellulase의 활성을 갖는 Pectinase에 의해 갈래곰보의 엽체가 전혀 분해되지 않은 점은 본 엽체의 구성이 고등식물의 그것과 크게 다름을 나타낸다. 한편 처리효소에 따른 원형질체의 분리도는 Driselase와 Protease를 제외하고는 엽체의 분해도와 대체로 일치하는 경향을 보였는데, AAP와 Protease를 처리한 경우 생체조직 1g당 약 4.5×10^5 개의 원형질체가 분리되었고 Macerozyme R-10, Hemicellulase, Pectinase를 처리한 경우에도 소수를 볼 수 있었으나 그 외의 경우에는 전혀 분리되지 않았다. 효소처리에 의한 조직의 분해력과 원형질체의 분리도는 일치함이 당연하나, laminarinase, xylanase, cellulase등의 활성을 갖는 다기능효소인 Driselase의 경우는 조직을 잘 분해시키면서도 원형질체를 전혀 분리시키지 못하여 세포벽의 microfibrillar tracts에 대한 분해가 약한 것으로 추정된다 (Reddy and Fujita, 1991).

고등식물의 경우를 포함하여 원형질체의 효율적 분리는 전반적인 조직의 분해와 함께 이루어 지는데(Power and Chapman, 1985; Saga et al., 1986), 위의 결과로 볼 때 갈래곰보 엽체의 외층 또는 세포벽을 보다 효율적으로 분해시키기 위해서는 보완적인 효소의 적절한 조합처리가 필요함

Table 1. Effects of single treatment of some enzymes for tissue degradation and protoplast isolation from *M. papulosa* thalli

| Response | Enzymes treated ^{1,2} | | | | | | | | | |
|----------------------|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | AAP | TOP | BAC | VIB | MAC | CEL | DRI | HEM | PEC | PRO |
| Tissue degradation | +++ | + | - | - | ++ | + | +++ | ++ | - | + |
| Protoplast isolation | ++ | - | - | - | + | - | - | + | + | ++ |

¹All enzymes were prepared at 10% concentration using 50mM MES buffer (pH 6.0) containing 0.6M mannitol and 0.5% potassium dextran sulfate.

²+++ , ++ , + , - indicate the effect of enzyme as good, moderate, bad, and no response, respectively.

을 알 수 있다. 따라서 원형질체 분리를 위한 효소조합은 엽체의 분해는 물론 다소나마 원형질체를 분리시킬 수 있었던 AAP를 중심으로 Macerozyme R-10, Hemicellulase, Driselase, Protease등을 조합 이용함으로써 최적의 조건을 찾코자 하였다.

Table 2는 갈래곰보의 엽체에 단일효소를 처리하여 나타난 결과를 기초로 원형질체를 보다 효율적으로 분리하기 위해 적용한 효소조합과 그 조합액의 처리로서 얻어진 원형질체 분리율을 나타낸 것이다. 원형질체는 효소처리 약 30분 후부터 엽체의 절단면 외측에서 아주 서서히 분리되기 시작하여(Fig. 1b) 약 2시간이 경과한 후에는 조직의 부분적인 분쇄와 함께 전체조직에서 분리되었다. 효소조합액의 처리에 의한 원형질체의 분리량은 단일효소의 처리에 의한 원형질체의 분리결과와 대체로 일치하였다. 특히 단일효소 처리시 조직분쇄와 원형질체 분리에 가장 효과적이었던 AAP는 첨가유무나 첨가농도에 따라 원형질체의 분리량에 끼치는 영향이 다른 효소에 비해 컸다. 본 실험결과 갈래곰보의 엽체로부터 원형질체를 분리하기 위한 최적의 효소조합은 AAP 4.0%+Macerozyme R-10 4.0%+Hemicellulase 4.0%로 조합된 E3 였으며 이 효소조합액의 처리로서 생체조직 1g당 107.6×10^4 개의 원형질체를

분리시킬 수 있었다. 그러나 AAP 4.0%를 첨가하는 대신 단일효소액의 처리에서 엽체분해능이 AAP와 유사하였던 Driselase 4% 첨가로 바꾸어준 E5액의 처리시에는 E3 효소조합액의 사용에 비해 그 수율이 약 $\frac{1}{3}$ 로 크게 떨어졌다. 또한 E3, E4 효소조합액의 처리결과에 나타난 것 처럼 AAP를 첨가한 경우에도 그 첨가농도를 4%에서 2.5%로 낮추었을 때 원형질체의 수율이 절반이상 떨어졌다. 이러한 결과는 AAP에 갈래곰보의 엽체를 구성하는 조직성분을 분해하거나 원형질체를 나출시키기엔 적합한 효소가 존재하지만 그 특정분해효소의 활성이 어느 수준 이상일 때 효과가 있음을 보여준다. 본 연구에서 발견된 특이한 점은 2.0%의 Protease처리에 의해 원형질체의 분리수율이 크게 높여진 것으로 이는 지금까지의 보고와 차이를 나타낸다. 해조류의 엽체에서 원형질체를 분리한 연구에서, 대부분 protease를 주 효소로 함유한 papain을 전처리함으로써 수율을 한층 높일 수 있었으며 고수율의 원형질체를 분리한 경우에도 papain 또는 protease를 전처리하지 않으면 원형질체가 전혀 분리되지 않았다는 보고도 있다(Waaland et al., 1990). 그러나 본 실험에서는 10% papain을 전처리 하였을 때 전처리를 하지 않은 경우에 비해 그 수율이 약 15%만 높아졌다. 원형질체의 수율은 사용한 엽체의 상

Table 2. The efficiency of different enzyme combinations in releasing protoplasts from *M. papulosa thalli*

| No. | Enzyme combinations ¹ | Yields ($\times 10^4$ protoplasts/g FW) ² |
|-----|--|--|
| E1 | AAP 4.0% | 16.5 |
| E2 | AAP 4.0% + Macerozyme R-10 4.0% | 54.9 |
| E3 | AAP 4.0% + Macerozyme R-10 4.0% + Hemicellulase 4.0% | 107.6 |
| E4 | AAP 2.5% + Macerozyme R-10 4.0% + Hemicellulase 4.0% | 42.5 |
| E5 | Driselase 4.0% + Macerozyme R-10 4.0% + Hemicellulase 4.0% | 24.6 |
| E6 | AAP 4.0% + Macerozyme R-10 4.0% + Protease 2.0% | 90.4 |
| E7 | Hemicellulase 4.0% + Driselase 4.0% | 9.8 |
| E8 | Hemicellulase 4.0% + Driselase 4.0 + Protease 2.0% | 48.2 |

¹All enzymes were dissolved in filtered seawater containing 50mM MES buffer (pH 6.0) with 0.6M mannitol and 0.5% potassium dextran sulfate.

²Protoplast yields correspond to four hours incubation in enzyme mixtures.

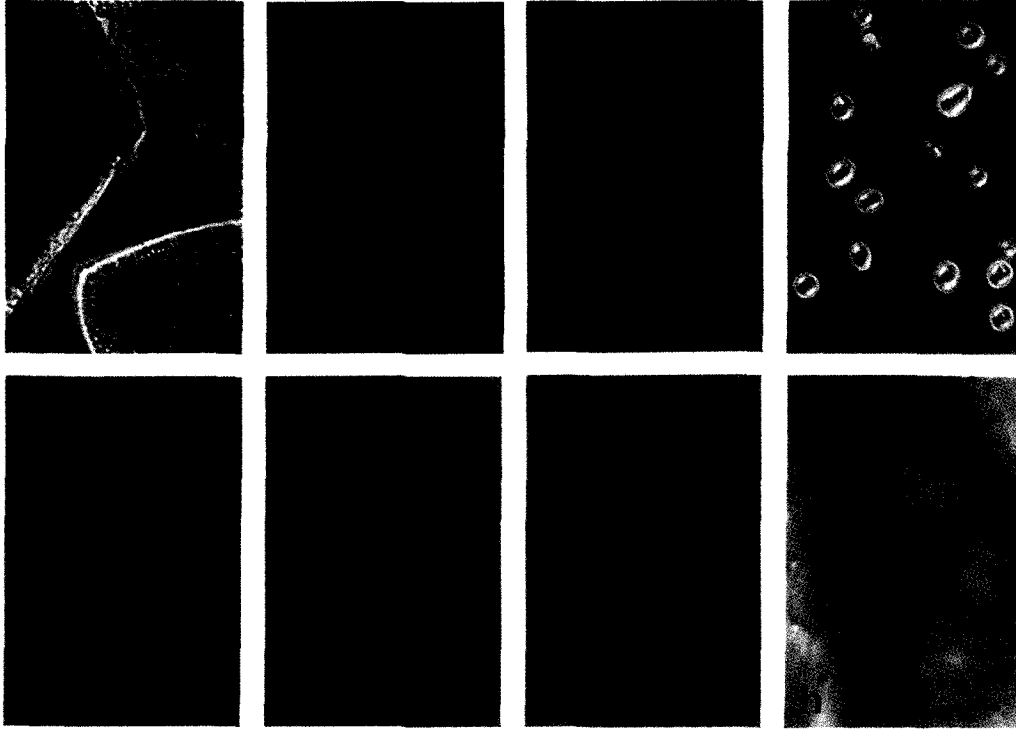


Fig. 1. Protoplast isolation and regeneration in *Meristotheca papulosa*. a, thalli tissue just incubated in enzyme solution; b, 30 minutes after enzyme treatment showing a few protoplasts; c, 4 hours after enzyme treatment showing many protoplasts; d, Freshly isolated protoplasts after washing and free of wall debris; e, a spore in nature; f, an abnormally large protoplast; g, two cell stage after 9 days in culture; h, 25-day-old germlings. Bars represent $50\mu\text{m}$ in a-c, $25\mu\text{m}$ in d, $10\mu\text{m}$ in e, $20\mu\text{m}$ in f-g, and $100\mu\text{m}$ in h.

태에 따라서도 차이를 나타내어 4월 중순에 채집한 엽체에서의 원형질체 수율이 Table 2와 같이 나타난 반면 5월초의 엽체에서는 동일효소액의 사용시에도 약 절반의 수율만을 얻을 수 있었다. 또한 원형질체의 수율은 엽체의 사용부위에 따라서도 차이가 있어 말단부 조직에서 가장 높았으며 기부에 가까운 조직일수록 크게 감소되었다. 이와 같은 조직의 상태에 따른 수율의 차이는 식물 원형질체 연구에서 흔히 보고된 사항이다 (Evans and Bravo, 1983).

AAP는 해조류의 엽체에서 원형질체를 분리하기 위한 효소로서 가장 많이 사용되어져 왔으며 그 결과 또한 다양한 해조류종에 유효한 것으로

보고되었다. 특히 이 효소는 고등식물의 원형질체분리에 사용되어 온 시판효소와 함께 사용할 때에 그 효과가 더욱 큰 것으로 알려져 있다 (Waaland et al., 1990). 그러나 AAP가 해조류의 원형질체 분리에 효과적일 뿐만 아니라 타 효소와의 조합처리시에도 가장 큰 영향을 끼치지만 단독으로 처리했을 경우에는 전혀 효과를 나타내지 못하는 경우도 있다 (Reddy et al., 1989). 이는 본 효소가 β -glucuronidase, sulfatase 등 해조류의 세포벽을 분해시킬 수 있는 여러 가지의 효소를 갖고 있기는 하지만 (Boyen et al., 1990) 중에도 따라 구성이 특수한 세포벽요소를 분해시킬 수 있는 효소활성이 낮거나 결핍된 경우로서 보조효

소의 복합처리가 반드시 필요한 경우이다. 이러한 사실은 본 연구에서도 AAP의 단독처리로서는 생체조직 1g당 16.5×10^4 개의 아주 낮은 세포 분리효과가 나타났지만 Macerozyme R-10, Hemicellulase, Protease 등의 조합으로 수율을 크게 높일 수 있었던 결과와 잘 일치한다. 그러나 본 실험에서 사용한 어떤 조합의 효소액 처리로서도 엽체조직의 완전한 분해를 통한 고수율의 원형질체를 획득하지 못하였는데 이러한 결과는 이들 효소조합액이 갈래곰보의 엽체조직분쇄를 통한 원형질체 분리에 최적의 조건이 되지 않는 것임을 나타낸다.

Sawabe 등(1993)은 갈래곰보와 유사한 조직으로 구성되어 있는 *Laminaria japonica* 엽체에 alginate lyase를 처리하여 다수의 원형질체를 분리할 수 있었는데, 이들이 분리한 세포가 본 실험의 갈래곰보 엽체에서 분리한 세포와 유사함을 볼 때 본 효소의 사용이 효과적일 것으로 기대되었다. 그러나 본 실험에서는 alginate lyase를 생성하는 *Vibrio alginolyticus* 조효소의 이용이 전혀 효과가 없었는데 이는 갈래곰보 엽체의 조직구성분이 그와는 또 다른 특이성을 갖는 것으로 볼 수 있다. 결국 갈래곰보의 엽체로부터 보다 높은 수율의 원형질체를 얻기 위해서는 금후 갈래곰보의 세포벽 구성분을 밝히는 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

본 실험에서 최적조합으로 나타난 효소액을 처리한 경우 분리된 원형질체의 수는 3.5~4시간 사이에 최대치에 이르렀으며 그 이후에는 처리시간이 길어져도 수율에 큰 변화가 없었다. 원형질체를 정제, 수거하는 방법도 수율에 큰 영향을 끼쳤다. 효소처리 후 분리된 갈래곰보의 원형질체는 최초 $24 \mu\text{m}$ 구멍크기의 나일론 mesh를 이용하여 미분해조직과 분리시키고 이것을 500rpm으로

3분간 썩 3회 원심분리 시킴으로서 수율의 감소와 함께 깨끗이 정제된 세포를 얻을 수 있었다. 이때 $30 \mu\text{m}$ 구멍의 나일론 mesh를 사용하면 다수의 소형세포가 손실될 뿐만 아니라 원심분리에 의한 원형질체의 세척과 미분해조직과의 분리가 용이하지 않았다.

분리된 원형질체는 갈래곰보의 엽체조직이 분홍색을 나타내는(Fig. 1a) 것과는 달리 색소체가 구분되지 않는 투명한 상태였으며 대부분 타원형을 나타내었다(Fig. 1d). 원형질체의 크기는 $7 \mu\text{m} \sim 24 \mu\text{m}$ 의 범위에 분포하였으나 $10 \sim 15 \mu\text{m}$ 범위의 것이 75.4%로서 가장 많았다(Table 3). 본 실험에서 원형질체를 분리하는데 사용된 엽체는 5월 하순경부터 시작되는 갈래곰보의 포자방출기 보다 이른 4월 초순에서 5월 초순 사이에 채취된 것이므로 분리된 세포에 포자가 섞여있지는 않았다. 또한 과포자 또는 사분포자는 홍갈색 색소체가 충만한 구형으로 평균직경 $16.5 \pm 1.8 \mu\text{m}$ 의 $13 \sim 20 \mu\text{m}$ 범위에 있으므로 원형질체의 모양이나 크기와 분명한 차이를 나타내었다(新村, 1974a; 喜田·谷口, 1992).

세포분열과 분화를 유도하기 위한 효율적인 방법을 찾고자, 분리한 갈래곰보의 원형질체를 0.2M mannitol을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우, 그리고 $20 \sim 35 \mu\text{g/ml}$ 의 Guillard 항생물질 조합액을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우를 ASP₁₂, f/2 등 2종의 배지를 사용한 조건에서 검토하였다. 항생물질 조합액을 첨가하지 않는 경우 배양체의 오염은 초기조직으로 사용한 엽체의 무균화상태에 따라 결정되었으며 일단 미생물에 오염된 세포는 즉시 항생물질을 처리해 주어도 대부분 사멸하였다. 본 실험에서는 Betadine액에 갈래곰보 엽체를 90초 처리하여 약 70%의 무균 엽체를 얻을 수 있었으나 금후 손상이 적으면서서

Table 3. Size distribution of protoplasts isolated from the thalli of *M. papulosa*

| Cell size, μm | ~6 | 7~9 | 10~12 | 13~15 | 16~18 | 19~21 | 22~24 | 25~ |
|--------------------------|----|------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| Distribution, % | - | 12.1 | 37.2 | 38.2 | 9.4 | 2.6 | 0.5 | - |

도 완전한 무균상태의 조직을 얻을 수 있는 방법이 마련되어야 할 것으로 본다. 그러나 무균화되지 않은 엽체에서 분리한 원형질체도 배양 초기에 35 μ l/ml 농도의 항생물질을 첨가하면 무균상태를 유지시킬 수 있었으나 그 농도를 20 μ l/ml로 낮추었을 때에는 대부분 미생물이 증식되었다. 초기배양시의 원형질체 생존율은 배지내 mannitol 농도가 0.2M일 때 높으면서 세포가 안정된 상태를 유지하였으나(Fig. 1d) 삼투압조절을 전혀 첨가하지 않은 경우는 세포의 괴사가 빠르게 일어났다.

Fig. 1g는 정제한 원형질체를 0.2M mannitol을 첨가한 ASP₁₂배지에 9일간 배양한 뒤 나타난 2분열된 세포이다. 세포의 분열은 f/2배지보다 ASP₁₂배지에 배양하였을 때 매우 용이하였으며 이 경우 원형질체는 미생물의 오염이 일어나지 않는 조건에서 약 25일 후에 발아하였다(Fig. 1h). 그러나 비후되거나 핵이 뚜렷하지 않은 세포는 실험된 어떤 조건에서도 세포분열이 일어나지 않았다. 본 연구에서의 세포분열과 발아체 형성에 소요된 시간은 자연상태에서 과포자나 사분포자가 24시간내에 2~4세포를 이루어 10일 후에 반구상체로 발달한다는 보고((新村, 1974a)와 비교할 때 크게 차이가 나 원형질체 배양의 제 조건에 대한 세밀한 연구가 필요함을 알 수 있었다. 한편 0.2M mannitol을 첨가한 ASP₁₂배지에 Guillard 항생물질 조합액을 35 μ l/ml의 농도로 처리하여 무균상태를 유지시킨 경우는 세포가 사멸하지는 않았으나 최초의 세포분열이 배양개시 후 15일이 지나서야 아주 낮은 빈도로 관찰되었으며 계속된 배양에도 전혀 발아하지 않았다. 따라서 항생물질의 첨가가 원형질체 배양에서의 무균상태유지에 필요하기는 하나 분화를 크게 저해함을 감안한다면 가능한 초기에 완전히 무균화된 조직을 이용해야 할 것으로 사료된다.

요 약

갈래곰보의 원형질체 분리와 배양 조건을 확

립하여 생명공학기술에 의한 유전적 형질개량의 기초조건을 마련코자 하였다. Abalone acetone powder, 소라의 내장조효소, *Pseudomonas*와 *Vibrio*의 조효소, Cellulase R-10, Macerozyme R-10, Hemicellulase, Pectinase, Driselase, Protease등을 0.6M mannitol과 0.5% potassium dextran sulfate를 함유한 50mM MES 해수완충액(pH 6.0)에 단독 또는 조합하여 조제한 효소액을 갈래곰보의 엽체에 처리하였을 때 Abalone acetone powder 4.0%+Macerozyme R-10 4.0%+Hemicellulase 4.0% 효소조합액의 처리로서 생체조직 1g당 107.6 $\times 10^4$ 개의 원형질체를 분리시킬 수 있었다. 갯 분리한 원형질체는 투명한 타원형으로 7 μ m~24 μ m의 범위에 분포하였다. 0.2M mannitol을 첨가한 ASP₁₂배지에 배양한 세포는 9일 후 분열되고 25일 후 발아하였다. ASP₁₂배지는 f/2배지보다 갈래곰보의 원형질체 배양에 효과적이었으며 Guillard 항생물질조합액의 처리는 분화에 장애가 되었다.

참 고 문 헌

- Amano, H. and H. Noda, 1994. Effects of plant growth regulators, organic acids, and sugars on growth and chemical constituents in the tissue culture of sea lettuce *Ulva pertusa*. Fish. Sci., 60 : 449-454.
- Boyen, C., B. Kloareg, M. Polne-Fuller, and A. Gibor, 1990. Preparation of alginate lyases from marine molluscs for protoplast isolation in brown algae. Phycologia, 29 : 173-181.
- Chen, L. C. M., 1987. Protoplast morphogenesis of *Porphyra leucosticta* in culture. Bot. Mar., 30 : 399-403.
- Chen, Y. C. and Y. M. Chiang, 1994. Isolation and regeneration of protoplasts of *Monostroma latissimum* Wittrock (Monostromataceae, Chlorophyta). Bot. Bull. Acad. Sin., 35 : 45-51.
- Cheney, D. P., 1986. Genetic engineering in seaweeds: applications and current status. Beihefte zur Nova Hedwigia, 83 : 22-29.
- Evans, B. A. and J. E. Bravo, 1983. Plant protoplast isolation and culture. Int. Rev. Cytol. Suppl., 16 : 33-53.

- Fujita, V. and S. Migita, 1987. Fusion of protoplasts from thalli of two different color types in *Porphyra yezoensis* Ueda and development of fusion products. *Jpn. J. Phycol.*, 35 : 201-208.
- Fujita, Y. and M. Saito. 1990. Protoplast isolation and fusion in *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *Hydrobiologia*, 204/205 : 161-166.
- Niwa, K., A. Miura, J. A. Shin, and Y. Aruga. 1993. Characterization and genetic analysis of the violet type pigmentation mutant of *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta). *Kor. J. Phycol.*, 8 : 217-230.
- Ohiwa, T., 1975. Behaviour of cultured fusion products from *Zygnema* and *Spirogyra* protoplasts. *Protoplasma*, 97 : 185-200.
- Polne-Fuller, M. and A. Gibor, 1987. Tissue culture of seaweeds. In K.T. Bird and P.H. Benson (eds), *Seaweed Cultivation for Renewable Resources*. Elsevier, Amsterdam. 219-239pp.
- Power, J. B. and J. V. Chapman, 1985. Isolation, culture and genetic manipulation of plant protoplasts. R.A. Dixon (ed), *Plant Cell Culture*. IRL Press, Oxford. 37-66pp.
- Provasoli, L., 1968. Media and prospects for cultivation of marine algae. In A. Watanabe and Hattori (eds), *Culture and Collections of Algae*. Proc. U.S.-Japan Conf. Hakone, Jap. Soc. Plant Physiol., Tokyo. 63-75pp.
- Reddy, C. R. K., S. Migita, and Y. Fujita, 1989. Protoplast isolation and regeneration of three species of *Ulva* in axenic culture. *Bot. Mar.*, 32 : 483-490.
- Reddy C. R. K. and Y. Fujita, 1991. Regeneration of plantlets from *Enteromorpha* (Ulvales, Chlorophyta) protoplasts in axenic culture. *J. Appl. Phycol.* 3 : 265-275.
- Reddy, C. R. K., M. Iima, and Y. Fujita, 1992. Induction of fast-growing and morphologically different strains through intergeneric protoplast fusions of *Ulva* and *Enteromorpha* (Ulvales, Chlorophyta). *J. Appl. Phycol.*, 4 : 57-65.
- Saga, N., M. Polne-Fuller, and A. Gibor, 1986. Protoplasts from seaweeds: production and fusion. *Beihefte zur Nova Hedwigia*, 83 : 37-43.
- Sawabe, T., Y. Ezura, and T. Kimura, 1993. Application of an alginate lyase from *Alteromonas* sp. for isolation of protoplasts from a brown algae *Laminaria japonica*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59 : 705-709.
- Tseng, C. H., K. Yamaguchi, and M. Nishimura, 1992. Alginate lyase from *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58 : 2063-2067.
- Van der Meer, J. 1987. The past, present, and future of tissue culture and biotechnology of seaweeds. In T. Stadler, J. Mollion, M.C. Verdus, Y. Karamanos, H. Morvan, and D. Christiansn (eds), *Algal Biotechnology*, Elsevier, London. 1-15pp.
- Vasil, I. K., 1976. The progress, problems and prospects of plant protoplast research. *Adv. Agron.*, 28 : 119-160.
- Waaland, S. A. and B. A. Watson, 1980. Isolation of a cell fusion hormone from *Griffithsia pacifica* Kylin, a red alga. *Planta*, 149 : 493-497.
- Waaland, J. R., L. G. Dickson, and B.A. Watson, 1990. Protoplast isolation and regeneration in the marine red alga *Porphyra nereocystis*. *Planta* 181 : 522-528.
- 국립수산진흥원, 1997. 유용해조류(꽃파래, 툯, 갈래곰보)양식개발시험. 해양수산부. 488pp.
- 新村 巖, 1974a. 토사카노리의孢子發生と生長. *藻類* 22 : 77-82.
- 新村 巖, 1974b. 토사카노리生育의季節的消長と孢子放出期. *藻類* 22 : 124-129.
- 喜田和四郎, 谷口三津夫, 1992. 토사카노리(食用海藻의栽培). 三浦昭雄 編著, 恒星社厚生閣. 124-132pp.
- 鬼頭 均, 1985. 노리의프로토플라스트의作出と個體の再生. *研究ジャーナル* 8 : 20-24.