식물조직배양학회지 제27권 제2호
Korean J. Plant Tissue Culture
Vol. 27, No. 2, 125~131 (2000)

애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 현탁배양세포의 원형질체로부터 식물체 재분화

김명덕 · 김준철* · 진창덕 · 임창진 · 한태진[1]
강원대학교 자연과학대학교 생명과학부, [1]한림대학교 자연과학대학 생물학과

Plant Regeneration from Protoplasts of Suspension Cultured Cells in *Arabidopsis thaliana*

KIM, Myoung Duck · *KIM, Joon Chul · JIN, Chang Duck · LIM, Chang Jin · HAN, Tae Jin[1]
Division of Life Science, Kangwon National University, Chunchon, 200-701, Korea
[1]Department of Biology, Hallym University, Chunchon, 200-702, Koera

ABSTRACT Protoplasts of *Arabidopsis thaliana* were easily isolated from the shoot-forming (SF) suspension-cultured cell clusters with 4 hours-shaking condition (40 rpm) on CPD enzyme solution containing 1% cellulase R-10, 0.25% pectolyase Y-23 and 0.5% driselase. Protoplasts were cultured on liquid KAO medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L kinetin, 200 mg/L spermidine and 68 g/L glucose. Also, protoplasts were cultured on 0.2 μM membrane filter placed onto CP solid medium containing the suspension cells as feeder cells in the dark at 25°C for 4 weeks. Protoplast-derived-SF calli were cultured on MS medium containing 0.05 mg/L IAA, 7 mg/L 2 ip and 30 g/L sucrose under the continuous illumination for four weeks. The frequency of shoot formation was about 50%. The regenerants were transferred into potting soil to grow mature plants. The regenerants formed the silques with seeds after 8 weeks of cultures.

Key words : Feeder cells, regenerants, SF calli, suspension cultured cell clusters.

서 론

고등식물의 세포로부터 많은 양의 원형질체를 효율적으로 분리할 수 있는 가능성이 증명된 이래 (Cocking 1961) 원형질체는 유전자 운반 (gene transfer), 유전자 발현 (gene expression), 체세포잡종 및 식물 바이러스학의 실험재료로도 비교적 널리 이용되어 왔으며, 식물분자 생물학 및 유전공학 등의 발전을 가능하게 하였다. 정상적인 식물세포를 분리하여 배양하는 일은 쉽지 않으나, 원형질체 단세포의 분리, 배양, 분열과 증식은 비교적 용이하기 때문에 최근에는 이 방법에 대한 연구가 활기를 띠고 있으며, 원형질체와 관련된 배양기술을 통한 식물체의 재배는 담배속, 페츄니아속, 고추속 등의 가지과나 국화과 등의 제한된 종내에서 이루어지고 있으며 (Shepard et al. 1980), 육종개발의 관점에서도 원형질체 배양을 통한 체세포잡종 식물체의 형성을 적용시킨다면 식물체내의 커다란 유전적 개선을 가져올 수 있을 것이다. 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)는 십자화과에 속하는 식물 (Koncz et al. 1992)로서 전형적인 개화식물이면서 게놈 (genome)의 크기가 70,000 kb로 매우 작을 뿐만 아니라 (Leutwiler et al. 1984) 반복적인 DNA가 거의 없는 까닭으로 게놈 지도 (genomic map) 작성이 용이하며 (Pruitt and Meyerowitz 1986) 돌연변이의 유발과 선택이 용이하고 한 세대가 짧아

*Corresponding author. Tel 033-250-8526
E-mail jckim@cc.kangwon.ac.kr

(Meyerowitz 1989) 식물분화기작을 구명하는 model system으로 이용되고 있으며 (Pattom and Meinke 1988), 또한 개화식물이면서 life cycle 및 genome organization 등에 있어서도 많은 장점을 가지고 있어 분자유전학적 방법을 조직배양 또는 원형질체 배양에 적용한 연구가 진행되고 있다 (Pattom and Meinke 1988; Chaudhury and Signer 1989). 본 연구에서는 애기장대의 현탁배양세포의 원형질체로부터 기관분화와 발달을 이루기 위해서 원형질체 분리율을 높이고 동시에 생존력을 지속시킬 수 있는 최적조건을 구명하는 배양방법을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

캘러스 유도 및 선별

애기장대 (*Arabidopsis thalian* (L.) Heynh. ecotype Columbia)의 종자를 4% NaOCl가 포함된 유한락스를 5%로 희석하여 20분동안 가볍게 흔들어 주면서 표면을 소독한 뒤, 멸균증류수로 5회 세척하였다. 세척한 종자를 1% sucrose가 포함된 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지에서 무균발아시켜 4~5주 동안 성장한 총생형 식물체의 줄기 절편체를 재료로 사용하여 0.5 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BAP가 첨가된 CP (CLC/*Ipomoea* basal medium, Duchefa cat. no. C0228) 배지에서 캘러스를 유도하였다. 캘러스 중에서 세포들이 매우 치밀하게 배열되어 있으며 그 표면에 광택이 있으면서 우유빛을 띠고 전반적으로 둥근모습을 나타내는 shoot-forming (SF) 캘러스를 선별하여 동일 배지로 계대배양하였다.

캘러스의 현탁배양

2회 이상 계대배양된 SF 캘러스를 잘게 자른 후, 생체량 0.5~1 g 정도를 250 mL Erlenmeyer flask에 50 mL의 CP 액체배지를 첨가하여 25℃ 암소에서 100 rpm으로 현탁배양하였다. 처음 2개월은 3~4일간격으로, 이 후로는 7일 간격으로 계대배양 하였으며 커다란 세포괴를 제거하기 위해서 860 μ 스테인레스체로 배양세포를 여과시켰다. 액체배양 4개월 후에 형성된 균일한 cell line은 새로운 배지를 첨가한 3일째 되는 세포 (2 mL)를 수거해 새로운 배지에 첨가하여 배양을 시작하였으며 배양 시작일부터 14일까지 2일 간격으로 세포를 회수해 packed cell volume (PCV) 및 dry weight (DW)를 측정하였다. PCV 측정은 현탁배양액을 눈금이 새겨진 15 mL 원심분리관에 옮기고 200 x g에서 5분간 원심분리 후 밑에 침적된 침전물의 부피를 측정하였으며, 세포 건중량은 여과지 (Whatman #2, ø 90 mm)에 세포를 회수한 후 60℃, 12시간 건조시킨 다음 측정하였다.

원형질체 분리 및 배양

원형질체 분리는 4개월 이상 현탁배양한 세포를 계대배양하여 3일 후에 380 μM cell dissociation sieve를 통과하여 수집된 세포를 사용하였으며 세포는 10 mL의 cell-protoplast washing (CPW, Frearson et al. 1973) 13M 용액을 첨가하여 4℃, 암소에 방치하여 전처리하였다. 전처리를 한 후에 CPW 13M 용액을 제거한 다음 0.2 μ membrane filter로 멸균한 CPD (1% Cellulase R-10, 0.25% Pectolyase Y-23과 0.5% Driselase)와 CM2 (1% Cellulase R-10과 0.25% Macerozyme R-10) 효소액에 pH 5.8로 적정한 CPW 13M을 첨가하여 27℃, 암조건에서 3~10시간 동안 정체배양 및 진탕배양(40 rpm)을 통해 원형질체를 분리하였다. 원형질체를 정제하기 위하여 효소혼합액을 230, 190, 74 그리고 45 μ cell dissociation sieve에 통과시켜 5분간 800 rpm으로 원심분리하였다. 2회 세척한 원형질체는 CPW 21S의 상층부에 넣고 10분간 800 rpm으로 비중차 원심분리하여 상층부의 건전한 원형질체를 5×10^4 cells/mL의 밀도가 되도록 희석한 후, 액체배양과 양육배양하였다. 배양배지로는 MS 배지에 2 mg/L NAA와 0.5 mg/L BAP가 첨가된 MSNB배지, 2 mg/L IAA, 0.5 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L 2ip가 첨가된 MSIDP배지 그리고 KM (Kao and Michayluk 1975)배지에 1 mg/L 2,4-D, 0.15 mg/L kinetin과 200 mg/L spermidine이 첨가된 KMDKS배지에 삼투조절제로 9% mannitol이 포함된 액체배지를 사용하였다. 양육 배양은 현탁배양중인 동종의 feeder cell (Krans et al. 1991)이 있는 CP배지 위에 0.2 μ membrane filter를 얹고 액체배양액 1 mL를 균일하게 퍼트린 다음에 암조건과 광조건에서 배양하여 세포분열을 유도하였으며, 생존율은 배양배지에서 하루 경과된 세포를 fluorescein diacetate (FDA)를 이용하여 측정하였다. 양육배양 2주 후에는 원형질체가 치상된 membrane filter를 새로운 feeder cell이 있는 CP 배지 위로 옮겨 배양하였으며, 원형질체의 분열정도를 살펴가며 mannitol의 농도를 3%씩 낮춘 동일한 액체배지를 첨가하여 microcolony 생성을 유도하였다. 캘러스 크기가 0.5~1 mm 정도 되면 membrane filter 전체를 feeder cell이 없는 CP 배지로 옮겨 캘러스를 증식하였다.

원형질체로부터 식물체 재분화

액체배양과 양육배양을 통해 microcolony가 형성되면 캘러스 증식배지로 옮겨 5 mm 이상 캘러스 크기로 생장을 유도한 다음, MS 기본배지에 0.05 mg/L IAA와 7 mg/L 2ip가 첨가된 재분화 배지로 옮겨 처음 2주 동안은 27℃, 16시간 광조건과 8시간 암조건에서 배양한 다음에 연속 광조건으로 옮겨 shoot 분화를 유도하였다. 분화된 shoot는 호르몬이 첨가되지 않은 MS 배지로 옮겨 root를 유도하였으며 순화과정을 거친 후에 토양으로 이식하여 완전한 식물체로 생장시켰다.

결과 및 고찰

캘러스 유도 및 현탁배양

기내에서 4~5주 동안 성장한 애기장대 *(Arabidopsis thaliana)* 식물체의 잎과 줄기 절편체를 CP 기본배지에 0.5 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BAP가 첨가된 배지에서 암조건으로 4주간 배양하여 캘러스를 유도하였다. 일반적으로 배발생 캘러스는 희고 단단하며 부서지기 쉬운 상태라고 보고되었는데 (Torello et al, 1984), 본 실험에서도 유도된 캘러스에서 표면이 매끈하고 잘 떨어지는 옅은 노란색을 띠는 shoot forming (SF) 캘러스를 형태적으로 선별하여 동일배지에 계대배양하였으며, 계대배양 4주 후에는 부피가 3~4배로 증가하였다 (Figure 1A). 2회 이상 계대배양한 캘러스로부터 SF 캘러스를 육안으로 선별하여 현탁배양의 재료로 사용하였으며 처음 2개월간은 3~4일 간격으로, 이 후로는 7일 간격으로 계대배양하였으며 27℃ 암소에서 100 rpm으로 진탕배양하였다. 배양 2개월 후부터 단일세포로 분리 (Figure 1B)가 되었으며 초기에 관찰되었던 세포질이 텅빈 세포들은 시간이 경과됨에 따라 제거되고 배양 4개월 후에는 10~50개 세포로 구성된 균질화된 옅은 노란색의 SF 캘러스 (Figure 1C)를 확보할 수 있었다. 이들 세포괴는 세포질이 매우 충만한 모습이었고 생존력이 높아 원형질체의 재료로 적합하였다. 또한 현탁배양에서 세포의 증식측정은 PCV (packed cell volume)로 하였으며, 생물량은 현탁배양 2일째까지는 세포분열이 거의 없었으며, 이 후 활발한 세포분열이 일어나 10일 후에는 PCV가 접종시의 4배가 되어 전형적인 sigmoid 곡선을 나타내었으며 (Figure 2), 계대배양은 PCV가 3배 이상이 된 8일 후에 하였다. 이와같이 생존력이 높은 SF 현탁배양 세포를 유지하기 위해 계대배양과정에서 규칙적으로 배지를 교환해 주는 것과 2주 간격으로 커다란 세포괴를 제거해 주는 것이 필수적이었다. 그리고 이전에 세포가 자랐던 조절된 배지 (conditioned medium)를 첨가함으로써 유도기를 줄일 수 있었는데, 이것은 조절된 배지내의 대사물들이 세포분열에 필요한 growth peptide인 phytosulfoteine과 같은 nutrient를 공급하는 것으로 생각된다. 이 과정에서 배지를 교환해 주지 않을 때는 배양세포는 갈변하여 고사하였으며 또한, 장기간 고체배지에서 배양된 캘러스는 현탁배양 동안 갈변화되어 현탁배양의 재료로 적합하지 않았으며 생존력이 높은 원형질체를 얻을 수 없었다.

현탁배양 세포의 원형질체 분리 및 배양

현탁배양 세포의 원형질체 분리를 위해 380 μ cell dissociation sieve를 통과하여 수집된 세포는 효소용액에 처리하기 전에 4℃, 암소에서 CPW 13 M 용액에 넣어 전처리 과정을 거쳐 대량의 건전한 원형질체를 얻을 수 있었는데, 이는 엽육원형질체 분리에서와 마찬가지로 1시간 동안의 전처리 과정이 효소처리에 의한 생리적 장애를 최소화하며 효소용액의 세포내 침입을 방지하여 원형질체의 안정성을 증가시켰기 때문이라고 생각된다 (Chung et al, 1986; Hyung et al. 1992). CPW 13 M 용액을 제거한 다음 0.2 μ membrane filter로 멸균한 효소용액 CPD (1% cellulase R-10, 0.25% pecto lyase Y-23과 0.5% driselase)와 CM2 (1% cellulase R-10과 0.25% macerozyme R-10)를 넣고 암조건에서 8시간 동안 정체배양과 4시간 동안 진탕배양 (40 rpm)을 통해 분리한 결과 (Figure 3), CPD 용액에서 4시간 동안 진탕배양시 생체량 1 g 당 106~107개의 건전한 원형질체를 얻을 수 있었으며, wassilewskija의 현탁배양 cell line (Ford 1990)과 비교시 높은 분리율을 보여주었다. 또한, 분리된 원형질체의 생존율도

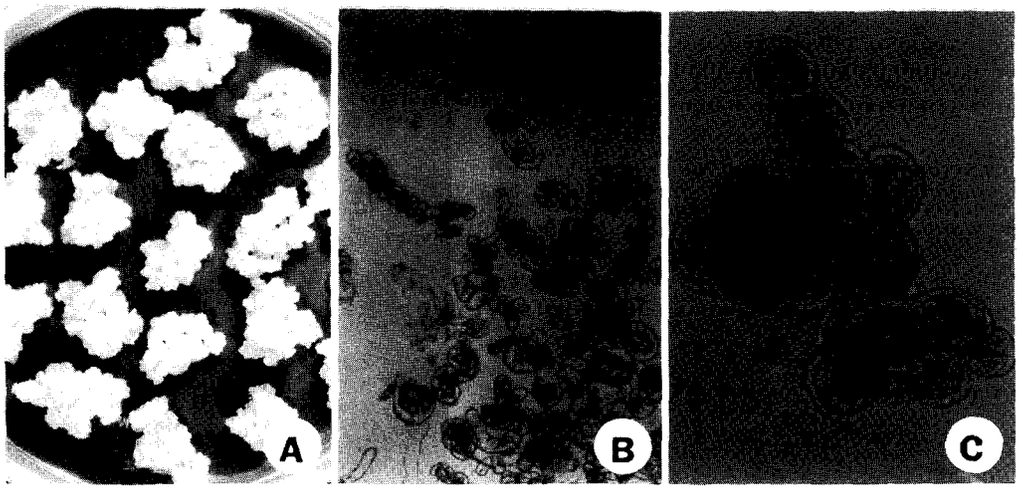

Figure 1. Suspension cultured cells of *Arabidopsis thaliana* in CP liquid medium. A, Proliferation of calli on CP medium containing 0.5 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L BAP after 4 weeks of cultures; B, Suspension cultured cells maintained for 4 weeks; C, Established suspension culture cells used for protoplast isolation after 4 months.

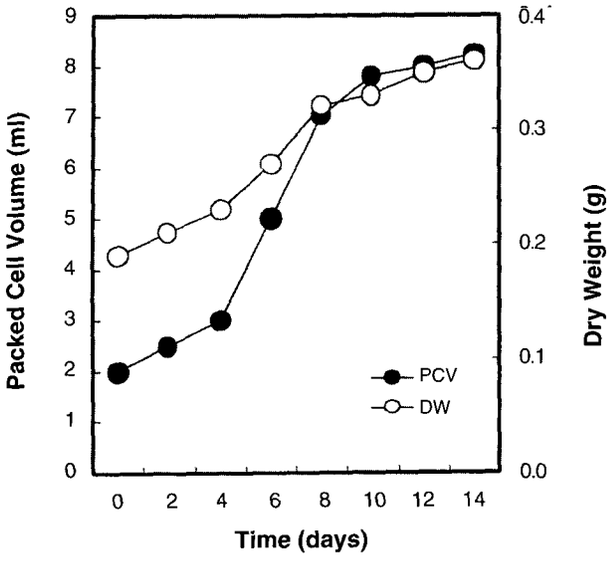

Figure 2. Measurement of packed cell volume and dry weight from the suspension cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. The results are displayed as the mean of values derived from five different cultures.

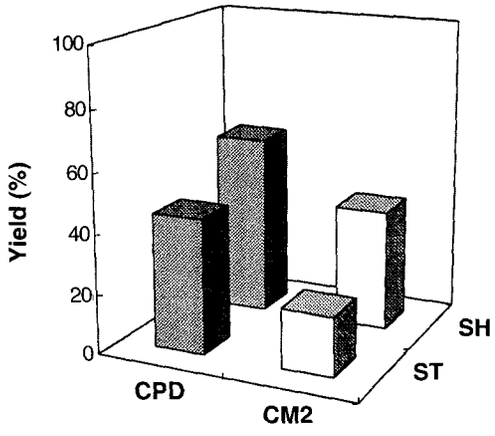

Figure 3. Yield of intact protoplasts. Protoplasts were isolated from the suspension cultured cell of *A. thaliana* in CPD (1% Cellulase Onozuca R-10, 0.25% Pectolyase Y-23 and 0.5% Driselase) and CM2 (1% Cellulase Onozuca R-10 and 0.5% Macerozyme Onozuca R-10) with shaking for 4 h (SH) and stationary for 8 h (ST) in culture conditions. The results are displayed as the mean of values derived from five different culture conditions.

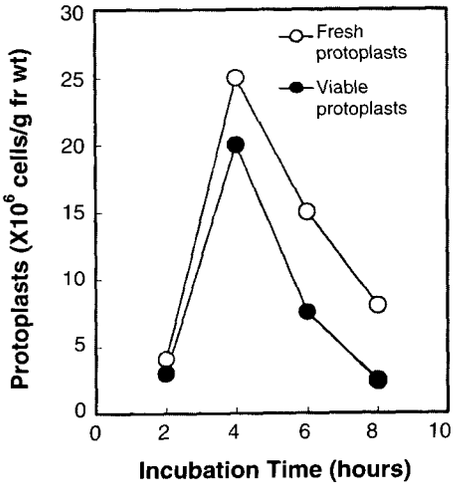

Figure 4. Effect of CPD enzyme on protoplast yield from the suspension cultured cell clusters of *Arabidopsis thaliana*. Freshly isolation protoplasts and viable protoplasts were observed under fluorescence microscope following staining with fluorescein diacetate. The results are displayed as the mean of values derived from five different cultures.

40%인 wassilewskija에 비해 80% (2×107 cells/g) 이상으로 높은 생존율을 얻을 수 있었는데 (Figure 4), wassilewskija의 경우는 2년 동안의 현탁배양 기간이 길어짐에 따라 세포의 활성이 떨어지는데 비해 4개월 동안 현탁배양한 cell line은 세포질이 충만하여 생존력이 높은 원형질체를 얻을 수 있었기 때문으로 사료된다.

효소액 제거 동안에 원형질체의 자발적인 융합과 세포벽이 제거되지 않은 세포들은 정제과정에서 제거되었으며, 초기 분리된 원형질체의 크기는 직경이 15~29 μ (Figure 5A)였으나, sucrose를 이용한 비중차 원심분리로 인해 세포의 평균 크기는 24.5 μ로서 엽육세포 원형질체의 평균크기 (38 μ)보다는 작았다. 원형질체 배양에서 원형질체의 세포벽 재생과 세포분열은 배지내 접종된 세포의 수와 첨가된 식물생장조절물질에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있으며 (Mayer and Cooke 1979), 애기장대의 최적의 접종 세포수의 범위는 4×10^4~5×10^4개로서 그 이하의 밀도나 그 이상의 밀도에서는 지속적인 세포분열을 관찰할 수 없었다. 분리된 원형질체의 배양은 MS 배지에 2 mg/L NAA와 0.5 mg/L BAP가 첨가된 MSNB, MS 배지에 2 mg/L IAA, 0.5 mg/L 2,4-D 및 0.5 mg/L 2ip가 첨가된 MSIDP, KM배지에 1 mg/L 2,4-D, 0.15 mg/L kinetin과 200 mg/L spermidine이 첨가된 KMDKS배지에서 각각 액체배양하였으며, 또한 현탁배양중인 동종의 feeder cell이 있는 CP 배지 위에 0.2 μ membrane filter를 얹고 현탁배양액 1 mL를 균일하게 접종하는 양육배양을 병행하였다.

동물, 식물 및 미생물 등 모든 세포에 존재하는 polyamine은 단백질과 핵산의 합성 및 세포분열 활성을 증가 (Palavan and Galston 1982)시켜 주고 특히, 분리된 원형질체의 생존력 유지 (Altman et al. 1977; Galston et al. 1978)뿐만 아니라, 노쇠되어 가던 원형질체를 낮은 농도의 polyamine에서 배양할 경우 DNA합성과 세포분열이 유도되었다는 보고 (Kaur-Sawhney et al. 1985) 등은 polyamine이 식물체의 생리적 조절물질임을 시사한다.

Table 1. Influences of different culture methods on protoplast division.

Culture Medium[a]	Days of Culture					
	0	7	14	21	28	35
MSNB	Division		Death			
MSNB	Division		Death			
KMDKS	Division			Colony		Callus

[a]MSNB, MS medium containing 2 mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP and 15 g/L sucrose; MSIDP, MS medium containing 2 mg/L IAA, 0.5 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L 2ip and 36 g/L glucose; KMDKS, KAO medium containing 1 mg/L 2,4-D, 0.15 mg/L kinetin, 200 mg/L spermidine and 68 g/L glucose.

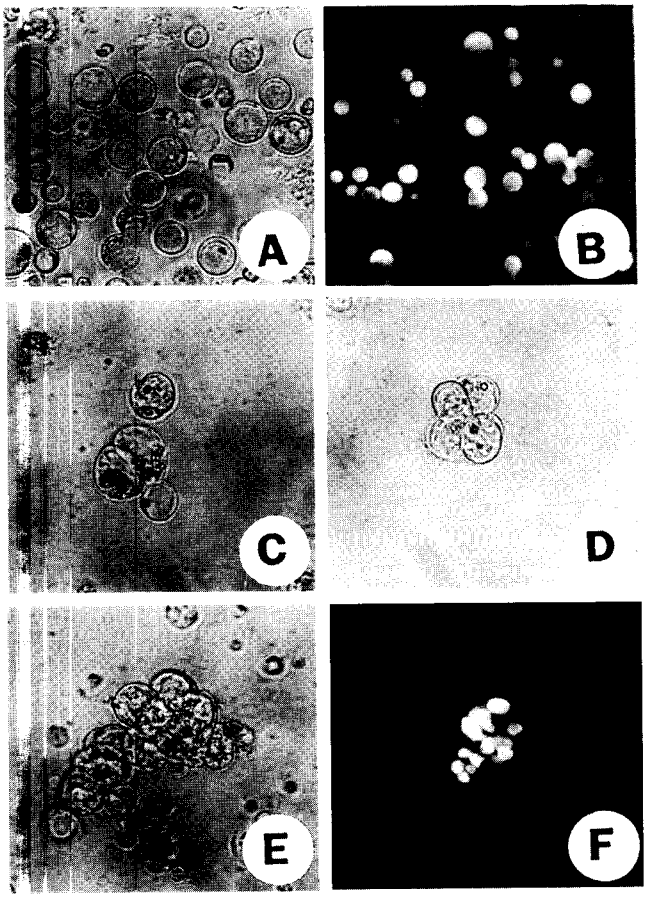

Figure 5. Protoplast derived cell colonies of *Arabidopsis thaliana*. A, Freshly isolation protoplasts; B, Viable protoplasts were observed under fluorescence microscope following staining with fluorescein diacetate; C, First cell division after 7 days of culture; D, Divided four cells after 14 days of culture; E and F, Microcolonies formed after 21 days of culture.

원형질체 배양액인 KMDKS는 polyamine인 spermidine을 첨가함으로써 원형질체의 분열능력과 생존력을 향상시켰기 때문에 MSNB와 MSIDP에 비해 배양이 진행되면서 세포분열이 활발히 일어날 수 있었고, 배양 4주 후에는 미세 캘러스 (micro callus)를 형성할 수 있었다 (Table 1). 처음 분리된 원형질체 (Figure 5A, 5B)는 배양 5~10일 경과 후부터 구형의 모습이 변형되면서 대부분 첫 세포분열 (Figure 5C)을 시작하였으며 시간이 경과됨에 따라 지속적인 세포분열이 일어나 (Figure 5D), 배양 3주 후에는 microcolony를 형성 (Figure 5E, 5F)하였다.

양육배양에서는 배양 2주 후에 원형질체가 치상된 membrane filter를 새로운 feeder cell이 있는 동일배지로 계대배양하였으며, 원형질체 분열 정도를 살펴가며 mannitol의 농도를 3%씩 낮춘 동일배지를 첨가하였다. Plating efficiency (Figure 6)는 액체배양에서보다 feeder cell이 첨가된 고체배지에서 배양하였을 때 30일 이후에 육안으로 볼 수 있는 36개 (0.5~1 mm)의 캘러스를 형성하였다. 이는 feeder cell의 첨가로 인하여 원형질체 분열을 자극하는 미지 nutrients 영향 (Kyozuka et al. 1987)이 원형질체 유래 캘러스의 생장을 촉진시킨 것으로 생각되며 또한, Wang과 Phillips (1984)가 보고한 것과 같이 캘러스를 형성하는 데 있어 삼투압을 조절해 줌으로써 효과적으로 세포분열을 이룬 것으로 사료된다.

현탁배양 세포 원형질체에서 유래된 SF 캘러스로부터 식물체 재분화

현탁배양 세포로부터 분리한 원형질체를 배양하여 유도된 캘러스에서 표면이 매끈하고 잘 떨어지는 SF 캘러스 (Figure

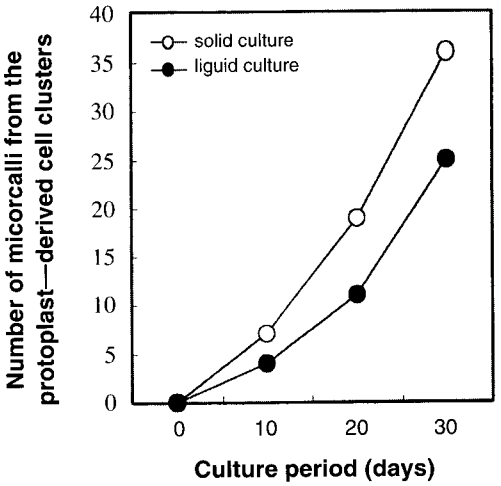

Figure 6. Plating efficiency of protoplast cultures of *Arabidopsis thaliana* in KMDKS medium containing 1 mg/L 2,4-D, 0.15 mg/L kinetin and 200 mg/L spermidine. The results are displayed as the mean of values derived from five different cultures.

Table 2. Effects of phytohormones on shoot formation from the protoplast derived callus of *Arabidopsis thaliana.*

Phytohormones (mg/L)			Frequencies of Shoot Formation	
IAA	2-ip	Kinetin	%[a]	Calli Numbers[b]
0.05	7	0	60	30.0±3.7
0.15	5	0	35	17.5±2.1
0.03	0	1	15	7.5±0.9

[a]For each experiment, 10 calli were tested with five different cultures, and the frequencies were measured by counting the number of calli regenerating more than one shoot per 50 calli.
[b]Mean ± standard error.

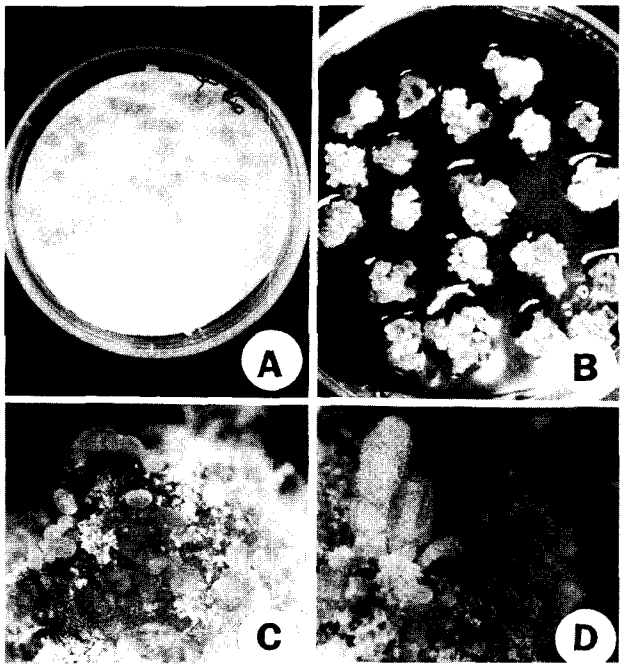

Figure 7. Somatic organogenesis from protoplast derived callus of *Arabidopsis thaliana.* A, Calli formation from protoplast derived colonies after 4 weeks of culture; B, Formation of green calli from organogenic calli on MS medium supplemented with 0.05 mg/L IAA and 7 mg/L 2-iP; C, Early stage of undifferentiated shoot primordial-like structure after 2 weeks of culture; D, Shoot primordia after 3 weeks of culture.

7A)를 형태적으로 선별하여 다양한 농도의 IAA, 2ip 그리고 kinetin이 첨가된 재분화 배지에 서 4주동안 배양한 결과 (Table 2), 0.05 mg/L IAA와 7 mg/L 2ip가 첨가된 배지에서 60%의 높은 shoot 형성률을 나타냈으며 auxin에 대한 cytokinin의 비율을 증가시킴으로써 shoot 형성이 촉진됨을 확인할 수 있었다. 또한 발생 양상은 SF 캘러스를 재분화 배지로 옮긴 후 녹화 (Figure 7B)되기 시작하여 구형배와 유사한 형태의 구조를 관찰할 수 있었으며 (Figure 7C), 배양이 진전됨에 따라 3주 후에는 shoot를 형성하기 시작하였다 (Figure 7D). 형성된 shoot는 자엽시기를 거쳐 발달 (Figure

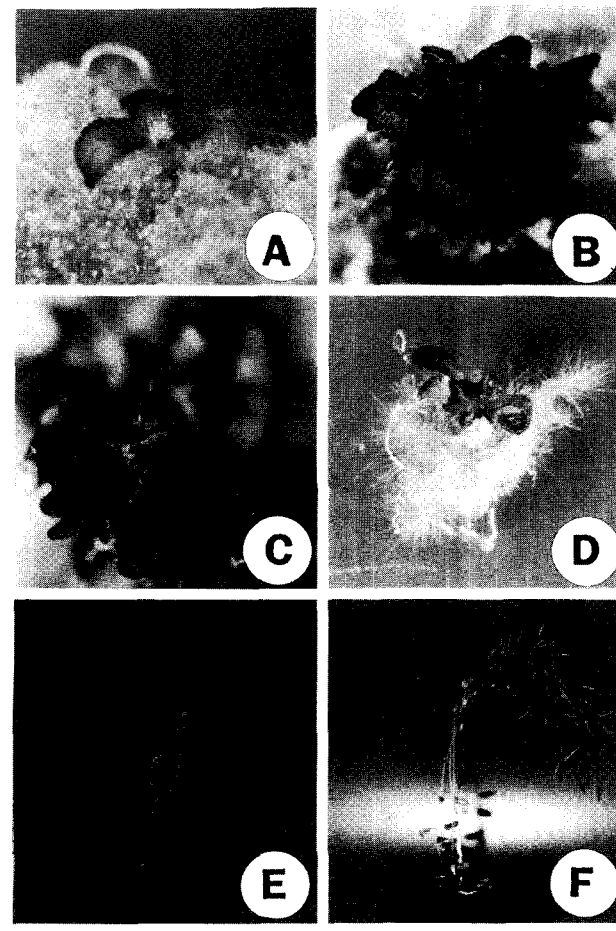

Figure 8. A regenerated whole plant from the protoplast-derived shoot of *Arabidopsis thaliana.* A, Formation of initial shoots after 2 weeks of culture; B, Formation of rosette leaves; C, Multi-shoots and leaves formation under continuous illumination after 4 weeks of culture; D, Root formation from differentiated shoot under continuous illumination; E, A regenerant potted in soil after 6 weeks of culture; F, Formation of siliques after 8 weeks of culture.

8A)하였으며 배양한 지 4주 후에는 6~10개의 rosette 잎 (Figure 8B)과 multiple shoot (Figure 8C)를 형성하였다. 이후에는 식물생장조절물질이 첨가되지 않는 MS 배지로 옮겨 뿌리 (Figure 8D)를 유도하였으며, 순화과정을 거친 다음에 토양으로 옮겼을 때 6주 후부터 추대 (bolting)와 화아를 유도할 수 있었다 (Figure 8E). 배양 8주 후에는 장각과 (silique)를 형성하여 완전한 식물체를 형성 (Figure 8F)하였으며, 장각과 (silique)로부터 종자를 얻을 수 있었다.

이로써, 애기장대의 현탁배양 세포괴로부터 분리된 원형질체를 효율적으로 분리하고 양육배양방법으로 배양함으로써 체세포배 형성없이 기내 *(in vitro)* 기관분화 (organogenesis)와 형태형성으로 식물체 재분화를 이룰 수 있었다.

적 요

원형질체는 현탁배양된 세포괴로부터 1% cellulase R-10, 0.5% pectolyase Y-23, 그리고 0.5% driselase가 포함된 CPD 효소용액에서 4시간의 진탕 (40 rpm) 조건에서 쉽게 분리되었다. 분리된 원형질체는 1 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L kinetin, 200 mg/L spermidine 그리고 68 g/L glucose가 포함된 KM 액체배지에서 배양되었으며, 또한 현탁배양중인 동종의 feeder cell이 있는 CP배지 위에 액체배양배지를 1mL 균일하게 퍼트린 후, 25℃, 암조건으로 4주간 양육배양하였다. 원형질체 유래 SF 캘러스는 0.05 mg/L IAA, 7 mg/L 2ip와 30 mg/L sucrose가 첨가된 MS 재분화 배지에서 광조건으로 4주동안 배양되었을 때, 60% 이상의 shoot를 형성하였다. 이후, 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 MS 배지로 옮겨 뿌리를 유도하였으며, 재분화된 식물체는 토양으로 옮겨 배양 8주후에 종자를 형성하였다.

사사 - 이 논문은 1998년 한국학술진흥재단 학술연구조성비 (과제번호: 98-015-000250)에 의해 지원되었음.

인용문헌

Altman A, Kaur-Sawhney R, Galston AW (1977) Stabilization of oat leaf protoplasts through polyamine-mediated inhibition of senescence. Plant Physiol **60**:570-574

Chaudhury AM, Signer ER (1989) Relative regeneration proficiency of *Arabidopsis thaliana* ecotypes. Plant Cell Rep **8**:368-369

Chung JD, Lee MH, Chun CK (1986) Isolation and culture of protoplast of ornamental tomato (*Lycopersicon esculentum* × *L. pimpinelifolium* cv. Tiny Tim) J Kor Soc Hort Sci **27**:289-303

Cocking EC (1961) A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. Nature **187**:927-929

Ford KG (1990) Plant regeneration from *Arabidopsis thaliana* protoplasts. Plant Cell Rep **8**:534-537

Galston AW, Altman A, Kaur-Sawhney R (1978) Polyamines, ribonuclease and the improvement of oat protoplasts. Plant Sci Lett **11**:69-79

Hyung NI, Kang SK, Lee CH (1992) Protoplast isolation and culture of grapes cv. 'Carnernet sauvignon' (*Vitis vinifera* L.) and 'Niagara' (*Vitis labrusca* L.) Kor J Plant Tiss Cult **19**:227-231

Kao KN, Michayluk MR (1975) Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. Planta **126**:105-110

Kaur-Sawhney R, Shekhawat NS, Galston AW (1985) Polyamine levels as related to growth, differentiation and senescence in protoplast-derived cultures of *Vigna aconitifolia* and *Avena sativa*. Plant Growth Regul. **3**:329-337

Koncz C, Chua NH, Schell J (1992) Method in *Arabidopsis* research. World Scientific Publishing Co., Singapore. pp 1-437

Krans E, Bautor J, Lorz H (1991) *In vitro* fertilization of single, isolated gametes of maize mediated by electrofusion. Sex Plant Reprod **4**:12-16

Kyozuka J, Hayashi Y, Shimamoto K (1987) High frequency plant regeneration from rice protoplasts by nurse culture methods. Mo. Gen Genet **206**:408-413

Leutwiler SL, Haugh-Evans RB, Meyerowitz ME (1984) The DNA of *Arabidopsis thaliana*. Mol Gen Genet **194**:15-23

Mayer Y, Cooke R (1979) Time course of hormonal control of first mitosis in tobacco mesophyll protoplasts cultivated *in vitro*. Planta **147**:181-185

Meyerowitz EM (1989) *Arabidopsis*, a useful weed. Cell **56**:263-269

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

Palavan N, Galston AW (1982) Polyamine biosynsessis and titer during various developmental stages of *Phaseolous vulgaris*. Physiol. Plant **55**:438-444

Pattom DA, Meinke DW (1988) High-frequency plant regeneration from cultured cotyledons of *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Rep **7**:233-237

Pruitt RE, Meyerowitz EM (1986) Characterization of the genome of *Arabidopsis thaliana*. J Mol Biol **187**:169-183

Shepard JF, Bidney D, Shahin E (1980) Potato protoplasts in crop improvement. Science **208**:14-17

Torello WA, Symington AG, Rufner R (1984) Callus induction, plant regeneration and evidence of somatic embryogenesis in *Red fescue*. Crop Sci **24**:1037-1040

Wang AS, Phillips RL (1984) Synchronization of suspension culture cells. In IK Vasil, ed, Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. 1. Laboratory procedures and their applications, Academic press, Inc. pp 175-181

(접수일자 2000년 1월 31일)