

# 당근 Protoplast에 관한 基礎研究

柳基中, 柳長杰

## A Study on the Protoplasts of Carrot

*Yoo Ki-jung, U. Zang-kual*

### Summary

Protoplast of carrot were isolated and purified from leaves, roots, and callus of root cambium cultured on MS medium, in order to investigate some basic characteristics of the carrot protoplasts.

1. During enzyme treatment, non-shaking brought about higher yield of protoplasts than shaking by which many protoplasts were destroyed.
2. The sizes of the isolated protoplasts were variable; root protoplasts were largest and leaf protoplasts smallest.
3. No color particle was observed in callus protoplasts, but green color in leaf and orange in root.
4. Protoplast densities of leaf and callus were slightly increased after 2-day incubation with the treatment of kinetin and BA, while decreased with the treatment of GA, NAA and IAA. Cell wall formation was observed from each treatment of growth regulator after 2-day incubation.
5. The protoplast fusions of leaf-root, and leaf-callus were easily recognized in virtue of their typical color and size. The degree of protoplast fusion obtained by PEG eluting method was 1-5%, higher than by the centrifugal method.

### 序 論

植物의 protoplast는 細胞로 부터 細胞壁을 기계적, 전기적 혹은 酵素를 처리하므로써 除去한 것으로, 삼투압을 비롯한 細胞環境의 변화 뿐만 아니라 원형질막과 세포벽 사이에 있는 重要한 蛋白質의 除去 등으로 인한 生理的 特性의 變化가 예상된다. 따라서 細胞生理研究에 있어서 protoplast를 細胞自體와 同 視할 수 있는나에 대하여는 논란이 있으나 (Burgess, 1978), 細胞壁이 없으므로 細胞가 직접

환경에 노출되어, 여러가지 처리에 대해 별다른 장애를 받지않고 反應한다는 점과 資源의 多樣性 때문에 여러 分野의 研究에 많이 利用되고 있다.

protoplast의 重要한 利用分野의 하나는 hybrid plant의 生産이다. protoplast는 一定한 조건에서 同種뿐만 아니라 異種間에도 융합이 가능하며, 傳統的方法으로는 不和合性 때문에 얻을 수 없는 hybrid를 얻을 수도 있다 (Power and Cocking, 1971)(Cocking, 1977). 물론 현재로서는 技術的인 어려움이나 관련분야의 연구미흡으로 異種間的 융합이나 융합된 protoplast로부터 植物體를 얻을 수 있

는 경우는 몇몇 植物에 限하며, 더우기 바라는 形질을 정상적으로 발현시키는 것은 어렵다. 그러나 앞으로의 연구에 의해 그 가능성은 커질 것으로 기대된다. protoplast융합기술은, 各種 stress 혹은 농약 등에 耐性이 있으나 정상 生育이 不可能한 細胞를 정상生育이 可能한 細胞와 융합시켜 hybrid를 얻는데 利用할 수 있다.

細胞壁을 除去한 다음 分離된 protoplast는 動物細胞나 protozoa와 마찬가지로 細胞質內로 DNA, plasmids, 핵, 염록체, mitochondria, bacteria, viruses 등을 도입할 수 있기 때문에 이 分野의 研究에도 利用되고 있다.

또 protoplast를 적절한 조건에서 배양하면 신속하게 細胞壁을 再生하는데 이것은 細胞의 生活性과 形成의 研究에도 重要하며, protoplast는 미생물과 비슷하게 培養할 수 있어서 단일 세포체로서 研究할 수 있는 長點이 있다.

本 研究에서는 protoplast에 관한 基礎研究로서, 당근의 잎, 뿌리, 그리고 뿌리의 形成層培養에서 얻은 callus로부터 protoplast를 分離, 精製하고 형태, 융합등을 비롯한 몇 가지 特性을 調査하였다.

### 1. 당근의 뿌리, 잎 및 callus 試料

protoplast는 당근의 뿌리, 잎, 뿌리조직을 배양하여 얻은 callus의 3가지로부터 分離했다. 당근 뿌리는 市中에서 구입하여 70% ethanol에 1分間, 20% hypochlorite 용액에서 15分間 표면살균하고, 形成層을 잘라서 protoplast를 分離한 시료를 사용하였으며, 잎의 protoplast는 당근을 수돗물(1日 1回 갈아줌)에 7~15일간 재배하여 새로 나온 잎을, 위의 뿌리에서와 같은 方法으로 살균하여 이로부터 分離하였다. callus의 protoplast는 뿌리 形成層을 배양하여 얻은 callus로부터 分離했다.

callus는 당근 뿌리를 70% ethanol에 1分間, 20% hypochlorite 용액에 15分間 살균하고 무균조건으로 形成層을 직경 약 5mm, 두께 약 2mm 조각으로 떼내어 培地 25ml를 넣은 삼각 flask에 4개씩 넣어 aluminum foil로 막은 다음 25℃에서 暗조건으로 30日 間 배양하여 얻었다(Dodds and Roberts, 1972). 이때 使用된 培地는 MS배지였으며(Murashige and Skoog, 1962) 그 組成은 Table 1과 같다.

## 材料 및 方法

Table 1. The formulation of MS medium

Ingradients	Concentrations (mg/l)	Ingradients	Concentrations (mg/l)
(NH <sub>4</sub> )NO <sub>3</sub>	1,650	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025
KNO <sub>3</sub>	1,900	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.024
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	400	myo-inositol	100
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370	nicotinic acid	0.5
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27.8	pyridoxine · HCl	0.5
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	thiamine · HCl	0.1
Mn SO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22.3	glycine	2.0
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.6	sucrose	30,000
H <sub>3</sub> B0 <sub>3</sub>	6.2	kinetin	0.1
KI	0.83	agar	1.0%
Na <sub>2</sub> M0O <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25	pH	5.7~5.8

## 2. Protoplast의 分離, 精製 및 培養

各組織의 細胞壁을 除去하기 위하여, 뿌리는 약 1mm 두께로, 잎은 약 1mm 폭으로, callus는 老化되지 않은 部分을 약 1mm 두께로 잘라서 各各 13% sorbitol을 함유한 MS培地の 無機鹽에 1시간 pre-plasmolysis한 다음 약 10배 酵素溶液으로 처리하였다. 酵素溶液은 cellulase(Onozuka R-10) 0.5%, pectinase(macerozyme R-10) 2.0%, sorbitol 13%, pH 5.4로 만들어 ultrafiltration하여 使用했으며, 25°C에서 20시간 처리했는데, 150rpm으로 계속 진탕한 것과 가끔씩 조심스럽게 흔들어 주며 방치한 두가지 방법을 비교했다.

酵素溶液을 처리하여 얻은 protoplast溶液을 44 $\mu$  체로 거른 다음 100 $\times$ g로 5분間 원심분리하여 상층부에 남아있는 組織 및 細胞 조각들을 효소용액과 함께 버리고 13% sorbitol을 함유한 MS배지를 가하여 조심스럽게 재분산시켜 다시 원심분리하였다 (Dodds and Roberts, 1982). 이 원심 분리조작을 3회 반복하여 protoplast를 정제하였다.

分離精製된 잎, 뿌리, callus protoplast에 대한 몇가지 植物生長調節劑의 영향을 보기위하여 各 protoplast를 GA, NAA, IAA, Kinetin 및 BA 농도가 各各  $10^{-5}$ M인 MS배지에 넣어 25°C, 暗條件으로 3日 동안 배양하여 protoplast 밀도 變化를 hemacytometer로 調査하였다.

## 3. protoplast 융합

상기와 같이 분리 정제된 뿌리 protoplast와 잎 protoplast, callus protoplast와 잎 protoplast를 융합유발물질인 polyethylene glycol을 사용하여 원심분리법과 PEG 용출법으로 융합시켰다.

원심분리법은 (Dodds and Roberts, 1982)  $10^5$  protoplasts/ $\mu$ l의 各 protoplast를 1:1로 섞은 혼합액에 3배의 PEG용출액을 가하여 잘 섞은 다음 100 $\times$ g로 10分間 원심분리한 후 상등액을 버리고 13%의 sorbitol을 함유한 MS배지용액을 가하여 재분산시켜 융합여부를 조사하였다. PEG용출용액은 0.

2M glucose, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 0.7mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 함유한 용액 50 $\mu$ l에 PEG-1540을 25g 녹이고 pH 5.8로 조정하여 만들었다.

PEG 용출법(Kao *et al.*, 1972) petridish에 20 $\times$ 25mm slide glass를 넣고 가운데에 protoplast 혼합액 0.15 $\mu$ l를 얹은 다음 약 5분간 정치하여 protoplast가 가라앉도록 하고 여기에 0.45 $\mu$ l의 PEG용출용액을 micro syringe로 조심스럽게 가하여 15~20분간 定置하였다. 그후 PEG 용출액 0.9 $\mu$ l를 micro syringe로 조심해서 가하고 10분 定置한후 다시 0.9 $\mu$ l를 더 가하였다. 다음에 PEG 용출액을 제거하기 위하여 13% sorbitol을 포함하는 MS배지용액 0.5 $\mu$ l를 가하고 10분후 다시 0.5 $\mu$ l를 가한 다음 10분후 피펫으로 slide glass위에 있는 용액을 제거하여 현미경으로 융합상태를 조사하였다. 이때 사용한 PEG 용출액은 50mM glycine, 0.3M glucose, 50mM CaCl<sub>2</sub>, pH 10.5로 만들었다.

## 結果 및 考察

### 1. Protoplast의 分離, 精製

protoplast를 分離하는데에는 (Evans and Cocking, 1972) 기계적인 方法, 전기적인 方法 그리고 細胞壁分解酵素를 利用하는 方法이 있는데, 기계적인 方法은 protoplast 收率이 작을 뿐만 아니라, 收率이 一定하지 않아 많이 사용되지 않으나 細胞壁分解酵素를 사용하기 곤란한 경우에는 유용하다. 최근에는 電氣場을 이용하는 方法이 개발되어 사용되고 있는 실정이지만 아직도 酵素를 利用하는 方法이 많이 쓰이고 있다.

本 研究에서는 효소처리 方法으로 cellulase와 pectinase의 혼합액을 사용하여 세포벽을 제거하고 protoplast를 分離하였다. 잎, 뿌리, callus에 효소용액을 처리할 때 뿌리조직은 비교적 효소용액에 침윤되기 쉬운 상태였으나 callus는 표면의 공기층이 쉽게 제거되지 않아 잘 침윤되지 않았으며, 잎은 작아서 epidermis를 제거하기 어려워 폭이 약 1mm 정도 되게 잘라서 효소용액을 처리했으나 쉽게 침윤되지 않았다. 따라서 효소용액이 조직내부로 잘 침투

되게 하기 위하여 효소용액을 처리하는 동안 150rpm으로 진탕하여 protoplast를 분리했다.

한편 진탕에 의해 protoplast가 파괴될 가능성이 (Zapata, 1981) 있으므로 진탕하지 않고 가끔씩 조심스럽게 흔들어 주면서 방치하여 효소용액을 처리한 후 protoplast를 분리해 보았다. 그 결과 진탕한 경우에는 잎, 뿌리, callus 모두 많은 protoplast가 파괴된 것을 관찰할 수 있었는데 특히 뿌리 protoplast의 파괴율이 높았다. 그래서 protoplast 收率은

진탕하지 않은 경우가 높았다.

## 2. 잎, 뿌리, callus protoplast의 특성 비교

Plate 1 은 효소용액을 처리하면서 진탕하지 않고 分離한 잎, 뿌리, callus protoplast의 300배 사진이다.

protoplast의 크기는 각조직간에 차이가 있었는데, 잎 protoplast가 제일 작고 뿌리 protoplast는 이

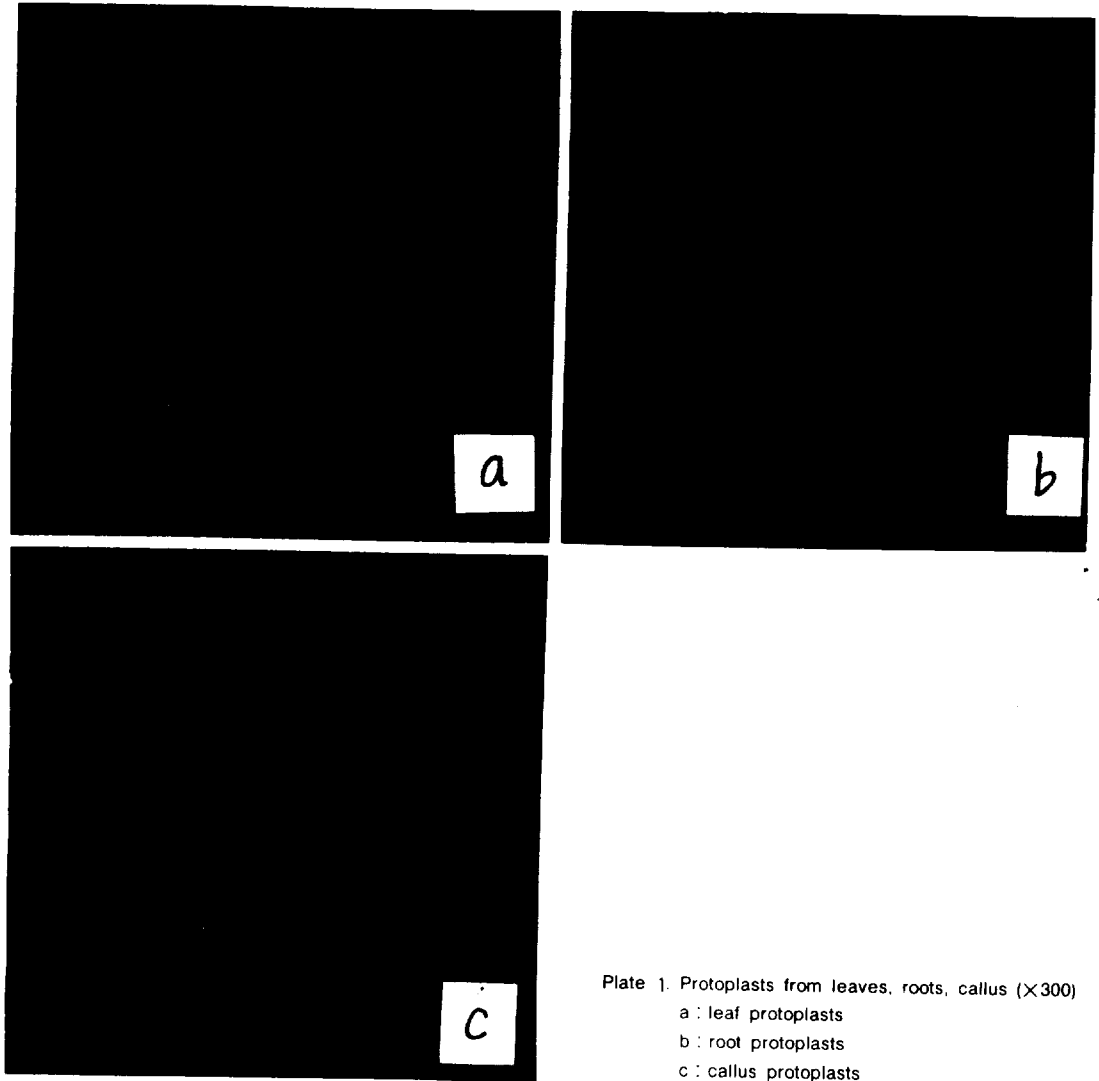


Plate 1. Protoplasts from leaves, roots, callus (×300)

a : leaf protoplasts

b : root protoplasts

c : callus protoplasts

에 비해 매우 컸으며 callus protoplast는 잎의 경우보다는 현저히 컸으나 뿌리의 경우보다는 작았다. 또 잎의 protoplast의 크기는 비교적 균일하였으나 뿌리의 경우에는 다양하여 거의 잎의 것과 비슷한 것도 있었으며 callus에서는 그 균일성이 잎과 뿌리 중간 정도였다.

protoplast의 색깔은 callus에서 비교적 투명하였으나 잎의 경우에는 엽록체의 녹색입자를 관찰할 수 있었으며 뿌리에서는 carotenoid의 황색 입자를 볼 수 있었다. 그런데 잎 protoplast내의 엽록체 입자들은 비교적 protoplast 내부 전체에 고루 분산되어 있었으나 뿌리 protoplast내의 carotenoid 입자들은 한 쪽으로 모여 있는 것이 많았는데 이것은 protoplast의 分離精製때 원심분리를 했기 때문인 것으로 생각

되었지만 이것이 viability에 영향을 주는지에 대하여는 확신하지 못했다.

### 3. 植物生長調節劑의 protoplast 배양에 미치는 영향

식물생장조절제인 GA, NAA, IAA, Kinetin, BA가 protoplast 배양에 독립적으로 주는 영향을 보기 위하여 각 성장조절제를  $10^{-5}M$ 이 되도록 조제한 MS기본배지에 잎, 뿌리, callus protoplast를 2일간 배양하며 protoplast농도의 변화를 조사한 결과는 Table 2.와 같다.

이상의 실험결과만으로는 各生長調節劑가 protoplast 배양에 어떤 영향을 주느냐 하는 것이 확실하

Table 2. Changes in density\* of protoplasts from leaves, roots and callus during incubation for 2 day, in the treatment with  $10^{-5} M$ 's of GA, NAA, IAA, Kinetin and BA.

	Leaf		Root		Callus	
	1day	2day	1day	2day	1day	2day
GA	71	25	10	7	15	5
NAA	58	17	12	12	1	1
IAA	33	29	3	2	14	6
Kinetin	51	63	9	6	4	4
BA	3	5	15	3	4	8

\*  $\times 10^6$  protoplasts/ $ml$

지 않으나 배양중의 protoplast 농도변화에 대한 경향을 보면 BA를 넣은 배지에서는 잎과 callus protoplast 농도가 증가했고, kinetin 처리에서는 잎에서 증가하나 callus에서는 불변이었고, NAA의 경우 뿌리와 callus에서 거의 변화가 없었다. 그러나 그 외 대부분의 경우에 감소하는 경향이었는데 그 이유는 분리된 protoplast 자체의 viability에(Watts *et al.* 1974) 기인하거나 培地組成에(Nagata and Takebe, 1970) 있어서 각 식물생장조절제를 단독으로 처리한데에 원인이 있는 것으로 생각된다. 각 protoplast 배양에서 2일후 세포막 이외에 또 하나의 막이 관찰되었는데, Asamisu, *et al.*(1984)의 연구에 의하면 protoplast 배양 수시간후부터 세포벽형성이 이루어지는 것으로 알려져 있는데 이로 미루어 보아 새로 관찰된 막은 세포벽일 것으로 생각된다. 또 배

양 2일후 protoplast의 크기가 커지고 작아진 것이 관찰되었다.

### 4. protoplast의 융합

융합촉진제로 PEG를 써서 protoplast를 융합시킬때, 많은 자료를 취급하기에 쉽고 간단한 方法은 혼합된 protoplast에 PEG 용출액을 넣고 원심분리하여 원심력에 의하여 protoplast를 접촉, 융합시키는 것인데 이 方法에 의해 잎과 뿌리, 잎과 callus protoplast의 융합을 시도한 결과 융합율은 모두 1% 미만으로 낮았다. 그래서 Kao등의 方法에(Kao *et al.* 1974) 따라 slide glass에 protoplast 혼합액을 넣고, PEG용출액을 넣고, 여기에 PEG 용출액을 가하여 PEG 용출액을 용출시키면서 융합시켜 보았다.

데 그 결과 1~5%로 증가하여 융합율을 고려할 때는 이 방법이 보다 효과적이었다.

Plate 2는 PEG-1540을 융합촉진제로 사용하여 잎 protoplast와 뿌리 protoplast, 잎 protoplast와

callus protoplast를 융합시켜서 얻은 융합된 protoplast의 300배 사진이다.

잎과 뿌리 protoplast間的 융합여부는 두개의 융합된 protoplast 내부에 있는 염록체와 carotenoid로

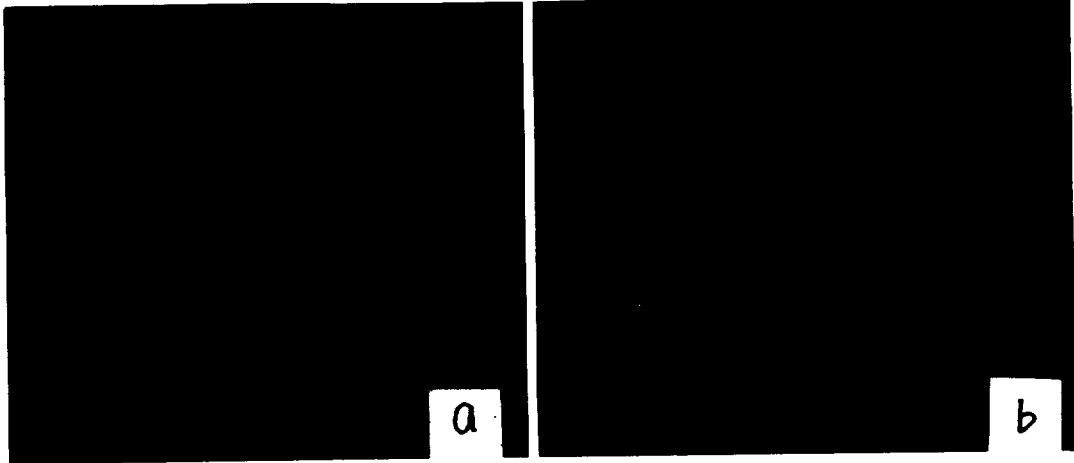


Plate 2. Fused protoplasts from leaf and root, leaf and callus (X300)  
a : leaf and root  
b : leaf and callus

쉽게 알 수 있었으며, 잎과 callus protoplast 間的 융합상태는 그 색깔과 크기에 의해 쉽게 확인할 수 있었다. 그림 a와 b에서 가운데 부분에 융합된 protoplast를 볼 수 있는데 이것은 융합시킨후 약 1시간이 지난 상태였는데 이때 두 protoplast 사이에 세포막은 남아 있었다.

## 摘 要

당근의 잎, 뿌리 그리고 뿌리의 형성층을 MS배지에서 배양하여 얻은 callus로부터, cellulase 및 pectinase를 처리하여 protoplast를 分離 精製하고 이들의 몇가지 특성을 조사하였다.

1. 酵素용액을 처리하는 동안 150rpm으로 진탕했을 때 protoplast가 현저히 파괴되었으며 진탕하지 않았을 때가 收率이 높았다.

2. protoplast의 크기는 조직에 따라 달랐는데 뿌리 protoplast가 가장 크고 callus protoplast가 이보다 조금 작았으며 잎의 경우는 현저히 작았다.

3. 잎 protoplast에서는 염록체, 뿌리 protoplast에서는 carotenoid 입자가 관찰되었으나, callus protoplast에서는 색소입자가 없었다.

4. MS기본배지에 GA, NAA, IAA, Kinetin, BA를 각각  $16^{-5}M$  첨가하여 각 protoplast를 배양한 결과 2일후 kinetin, BA에서 잎과 callus의 protoplast 농도가 다소 증가하였고 그외의 경우에는 감소하는 경향을 보였다. 2일후 각 protoplast의 세포막이 형성된 것을 관찰할 수 있었다.

5. PEG-1540을 사용하여 잎 protoplast와 뿌리 protoplast, 잎 protoplast와 callus protoplast를 융합시켰을 때 융합된 상태는 색소와 protoplast 크기에 의해 쉽게 확인할 수 있었으며, 융합율은 원심분리방법보다 PEG 용출법에서 다소 높아 후자의 경우 1~5% 수준이었다.

參 考 文 獻

- Asamizu, T., I. Tanaka, A. Nishi, 1977. Change in molecular size of cellulose during regeneration of cell wall on carrot protoplasts. *Physiols. plant.*, 40: 215-218.
- Burgess, J., 1978. Plant cells without walls. *Nature*, 275: 588-589.
- Cocking, E. C., 1977. Protoplast fusion. *Progress and prospects for agriculture. Span* 20, 5-8.
- Dodds, J. H., L. W. Roberts, 1982. Experiments in plant tissue culture, 120-126. Cambridge Univ. press, Cambridge.
- Dodds, J. H., L. W. Roberts, 1982. Experiments in plant tissue culture, 36-49. Cambridge Univ. press, Cambridge.
- Evans, P. K., E. C. Cocking, 1977. Isolated plant protoplasts in plant cell and tissue culture, 2nd ed., 103-135. ed. by H. E. Street., Univ. of California press, Berkley.
- Kao, K. N., F. Constabel, M. R. Michayluk, O. L. Gamborg, 1977. Plant protoplast fusion and growth of intergenetic hybrid cells., *Planta*, 120: 215-227
- Murashige, T., F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiols. plant.*, 15: 437-497.
- Nagata, T., I. Takebe, 1970. Plating of isolated tobacco mesophyll on agar medium. *Planta*, 99: 12-20.
- Power, J. B., E. C. Cocking, 1971. Fusion of plant protoplasts. *Sci. progr.*, 59: 181-198.
- Watts, J. M., F. Motoyoshi, J. N. King, 1974. Protoplasts of cells of tobacco mesophyll. *Ann. Bot.*, 38: 667-671
- Zapata, F., J.M.C. K. Sink, C. E. Cocking, 1981. Callus formation from leaf mesophyll protoplast of three Lycopersion species. *Plant Sic. Lett.* 23: 41-46.