

고구마(*Ipomoea batatas*)의懸濁培養細胞의原形質體培養에 의한캘러스形成

劉長烈·*Daniel J. Cantliffe

(韓國科學技術研究院 遺傳工學센터, 植物細胞生物學研究室 : *Vegetable Crops Department, University of Florida, IFAS, Gainesville, Florida 32611, USA)

Callus Formation from Suspension Culture-Derived Protoplasts of Sweet Potato(*Ipomoea batatas*)

Liu, Jang R. and *Daniel J. Cantliffe

(Plant Cell Biology Laboratory, Genetic Engineering Center, Korea Institute of Science & Technology, P. O. Box 131, Cheongryang, Seoul; *Vegetable Crop Department, University of Florida, IFAS, Gainesville, Florida 32611, USA)

ABSTRACT

Protoplasts were enzymatically isolated from suspension cultures of sweet potato. High yields of single protoplasts were produced from nonembryogenic cell aggregates. However, most protoplasts obtained from embryogenic cell clumps were spontaneously fused during enzyme treatment; a small portion of them remained single. Upon transfer to Murashige and Skoog's(MS) liquid medium supplemented with 0.1 mg/l 6-benzyladenine(BA) and 1 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D), protoplasts from nonembryogenic cell aggregates sustained cell divisions to form callus. Upon subculture onto MS media with 0.2 mg/l 2,4-D or without growth regulators, the callus did not give rise to any organs. On the other hand, first cell division of single protoplasts from embryogenic cell clumps was sporadically observed.

緒 論

고구마의 세계 총 생산량은 전체 작물 중 6위를 점하며(Harlan, 1976, 아시아권에서는 탄수화물과 단백질의 중요한 공급원이 되고 있다. 주로 영양 번식을 하므로 無病株의 확보나 體細胞遺傳學的 方法에 의한 품종 개량을 위하여 組織培養기술의 도입이 요구된다. 고구마의 組織培養은 작물의 중요성에 비추어 비교적 한정된 범위에서 이루어져 왔으나(Henderson *et al.*, 1984), 최근에 이르러 體細胞胚發生(somatic embryogenesis)에 의한 植物體再生에 관한 일련의 연구가 보고되었다. 즉, 蔞(Tsai and Tseng, 1979), 莖頂(Jarret *et al.*, 1984; Liu and Cantliffe, 1984), 줄기, 뿌리 및 葉柄(Liu and Cantliffe, 1984, 1985)에서 얻은 캘러스에서 體細胞胚가 유도되었는데, 특히 莖頂端 分裂組織(shoot apical meristem dome)에서는 90% 이상의 재료에서 胚發生 캘러스가 유도되었으며 이로부터 體細胞胚가 발달하였다(Cantliffe *et al.*, 1987;

Liu *et al.*, 1989). 고구마의 原形質體 培養은 葉肉細胞로부터 얻은 原形質體를 培養하여 켈러스를 얻은 보고가 있으나(Bidney and Shepard, 1980) 植物體를 再生하였다는 보고는 아직 없다. 따라서 본 연구에서는 懸濁培養된 細胞로부터 原形質體를 유리하여 培養함으로써 植物體로의 再生을 꾀하였다.

材料 및 方法

植物材料 고구마(*Ipomoea batatas*(L.) Lam. cv. White Star)의 莖頂을 Liu와 Cantliffe (1984)의 방법에 의하여 1 mg/l의 2,4-D가 첨가된 배지에서 培養하여 胚發生 켈러스를 얻었다. 懸濁培養은 胚發生 켈러스를 잘게 썰어서 20 ml의 培地가 든 125 ml 삼각 플라스크에 넣고 시작하였다. 培地는 MS 무기염(Murashige and Skoog, 1962) 100 mg/l myo-inositol, 0.4 mg/l thiamine · HCl 및 30 g/l sucrose로 구성된 기본 배지에 5% coconut water(GIBCO)와 1 mg/l 2,4-D를 첨가한 것을 사용하였다. 본 연구에서 모든 배지와 용액은 pH 5.8로 조정하였다. 삼각 플라스크는 플라스틱이나 stainless steel 캡으로 막은 후 27°C의 暗所에서 100 rpm으로 조정된 gyrotory shaker 위에 놓고 培養하였다. 繼代培養은 3-7일 마다 하였는데, 非胚發生細胞의 aggregate에 대한 胚發生細胞 clump의 비율을 높게 유지하기 위하여 (胚發生細胞의 clump 및 非胚發生細胞의 aggregate에 대한 설명은 '結果 및 考察' 참조) 繼代培養시 삼각 플라스크를 흔든 후 30-60초 동안 방치해 두면 비중이 높은 胚發生細胞의 clump는 플라스크 밑에 가라앉았으며 非胚發生細胞의 aggregate는 배지 중에 부유하였으므로 이 非胚發生細胞의 aggregate를 피펫으로 제거하였다. 非胚發生細胞의 aggregate만을 따로 培養하고자 할 때는 胚發生細胞의 clump 培養과 동일 조건에서 培養하였다.

原形質體 遊離 및 培養 繼代培養 후 48시간 경과한 細胞懸濁液을 10 ml tube에 넣고 100×g로 10분간 원심 분리하였다. packed volume이 약 1 cm³인 細胞들을 수거하여 10 ml의 효소액에 넣은 후 함께 100×15 mm 플라스틱 petri dish에서 분산시켰다. 효소액은 2, 3, 혹은 4% cellulysin(calbiochem), 0.5% macerace(calbiochem), 9% mannitol에 CPW 무기염(Frcarson *et al.*, 1973)으로 조성하였다. 이밖에 필요에 따라 macerace를 제거하거나 0.5 혹은 1% Drisclose(Kyowa Hakko Kogyo)를 첨가하였다. 細胞와 효소액을 담은 petri dish는 parafilm으로 봉한 후 30 rpm의 gyrotory shaker 위에 놓고 暗所의 27°C에서 5-24 시간 동안 培養하였다. 유리된 原形質體를 분리하기 위하여 잔사를 구경 100 μm의 stainless steel mesh로 걸러 낸 후, 효소액을 100×g로 원심 분리하여 제거하였다. 가라앉은 原形質體는 9% mannitol에 CPW 무기염을 넣은 용액에 분산시킨 후 원심분리하여 용액을 제거하고 회수하는 과정을 2회 반복함으로써 잔유 효소액이 남지 않도록 하였다. 최종 원심분리는 21% sucrose에 CPW 무기염을 넣은 용액에 原形質體를 분산시킨 후 행하여 남은 잔사는 가라앉히고 原形質體는 용액의 상층에 떠올랐다. 이 原形質體를 피펫으로 수거하여 MS 기본 배지에 9% mannitol, 0.1 mg/l BA, 1 mg/l 2,4-D를 첨가한 배지(原形質體 培養培地)에 분산시킨 후 hcmacytometer로 1 ml 당 1×10⁴, 5×10⁴, 1×10⁵개의 原形質體가 되도록 희석하였다. 이것을 60×15 mm 플라스틱 Petri dish내에 가능한 한 가장 얇게 담아서 27°C의 暗所에서 培養하며 24시간마다 위상차 도립 현미경으로 관찰하였다. 유리된 原形質體가 細胞分裂을 계속할 경우에는 2주 경과 후 mannitol을 제거한 原形質體 培養培地를 48시간마다 0.2 ml 씩 점적으로 petri dish에 첨가해 줌으로써 기

존 배지의 osmolarity를 단계적으로 낮추어주었다. 原形質體 培養 4주 경과 후 발달한 colony는 MS 기본 배지 혹은 0.2 mg/1 2,4-D를 첨가한 고체 배지(0.8% phytagar [GIBCO] 첨가)에 옮겨 주고 27°C의 暗所에서 培養하였다.

結果 및 考察

懸濁培養에서 胚發生細胞는 대부분 직경이 0.5-1 mm에 이르는 clump 상태를 유지하였으며 더 이상 쉽게 서로 떨어지지 않았다. 증식 속도는 매주 2배로 증가하는 정도였다. 반면에 非胚發生細胞는 30-100개의 細胞로 구성된 직경 100-300 μm 의 aggregate를 이루었으며 매주 4배 이상 증가하였다. 2% cellulysin, 0.5% maccrase, 9% mannitol, CPW의 효소액으로 처리한 후 4-5시간이 경과되면 非胚發生 aggregate에서 직경이 40-50 μm 의 原形質體가 유리되기 시작하였는데 (Fig. 1A), 12-16시간 처리가 높은 수율의 原形質體를 얻기에 적당한 것으로 보였다. 培養 3일 후 대부분의 原形質體는 vacuolate 상태로부터 圓形을 잃고 약간씩 일그러졌으므로 細胞壁의 形成이 상당히 진행된 것으로 여겨졌다. 6-7일 후 1 ml당 5×10^4 개의 原形質體를 넣은 petri dish에서 약 40%의 培養된 原形質體가 첫번째 細胞分裂을 하였으며 (Fig. 1B), 10일 후 2번째 (Fig. 1C) 혹은 3번째 分裂(Fig. 1D)을 하였다. 2주 경과 후 10-20개의 細胞로 구성된 colony가 관찰되었으며 (Fig. 1E), 3주 경과 후 수백개의 細胞로 구성된 colony가 관찰되었다(Fig. 1F). 그러나 1 ml당 1×10^4 혹은 1×10^5 개의 原形質體를 넣은 petri dish에서는 10% 이하의 原形質體가 分裂을 계속하였다. 그 이후는 MS 기본배지 혹은 0.2 mg/1 2,4-D를 첨가한 고체 배지에서 繼代培養을 하였으나 어떠한 器官도 形成되지 않았다.

胚發生細胞의 clump를 非胚發生細胞의 aggregate에 사용한 것과 동일한 효소액으로 처리하였을 때는 非胚發生細胞의 aggregate를 처리하였을 때에 비해 대단히 낮은 빈도의 原形質體가 유리되었으므로 原形質體를 분리 培養할 수가 없었다. 原形質體 유리 빈도를 높이기 위하여 cellulysin의 농도를 4%까지 높인 효소액을 사용하였을 때는 수십 혹은 수백 개의 原形質體가 유리 과정에서 서로 융합하여 만들어진 巨大原形質體가 상당 수 발견되었으며 이러한 현상은 maccrase와 driselase첨가에 의해서 더욱 가중되어 단일 原形質體의 유리 빈도를 현격하게 낮추었다(Fig. 1G). 따라서 4% cellulysin만을 넣은 효소액으로 16시간 처리한 결과 직경이 15-20 μm 의 단일 原形質體가 상당한 빈도로 유리되었으므로 原形質體를 분리 배양할 수 있었다. 이들을 原形質體 培養培地에 옮겨주고 현미경으로 관찰하였던 바, 세포질의 밀도에 따라 투명도가 낮은 것과 높은 것의 2종류로 확연히 구별되었다(Fig. 1H). 이들을 胚發生과 非胚發生細胞에 대한 기술에 비추어 볼 때 (Liu and Cantliffc, 1984; Vasil *et al.*, 1983) 낮은 투명도의 것은 胚發生細胞로부터, 높은 투명도의 것은 非胚發生細胞에서 유리된 原形質體인 것으로 판단되었다. 이들 단일 原形質體 (직경 15-20 μm)가 非胚發生細胞에서 유리되었으면서도 일반 非胚發生細胞에서 유리된 단일 原形質體 (직경 40-50 μm)보다 훨씬 작은 이유는 이들이 分裂을 왕성히 하고 있는 細胞로부터 유리되었기 때문인 것으로 사료된다. 배양 개시 4-5일 경과 후 드물게 胚發生細胞로부터 유리된 原形質體(낮은 투명도의 것)에서 첫번째 細胞分裂을 관찰할 수 있었다(Fig. 1I). 그러나 그 이상의 分裂은 관찰되지 않았다. 반면에 非胚發生細胞에서 유리된 原形質體(높은 투명도의 것)에서는 전혀 細胞分裂을 관찰할 수 없었는데 이는 胚發生細胞에서 유리된 原形質體보다 고농도 효소 용액 처리에 의해 손상을 더 쉽게 받았기 때문인 것으로

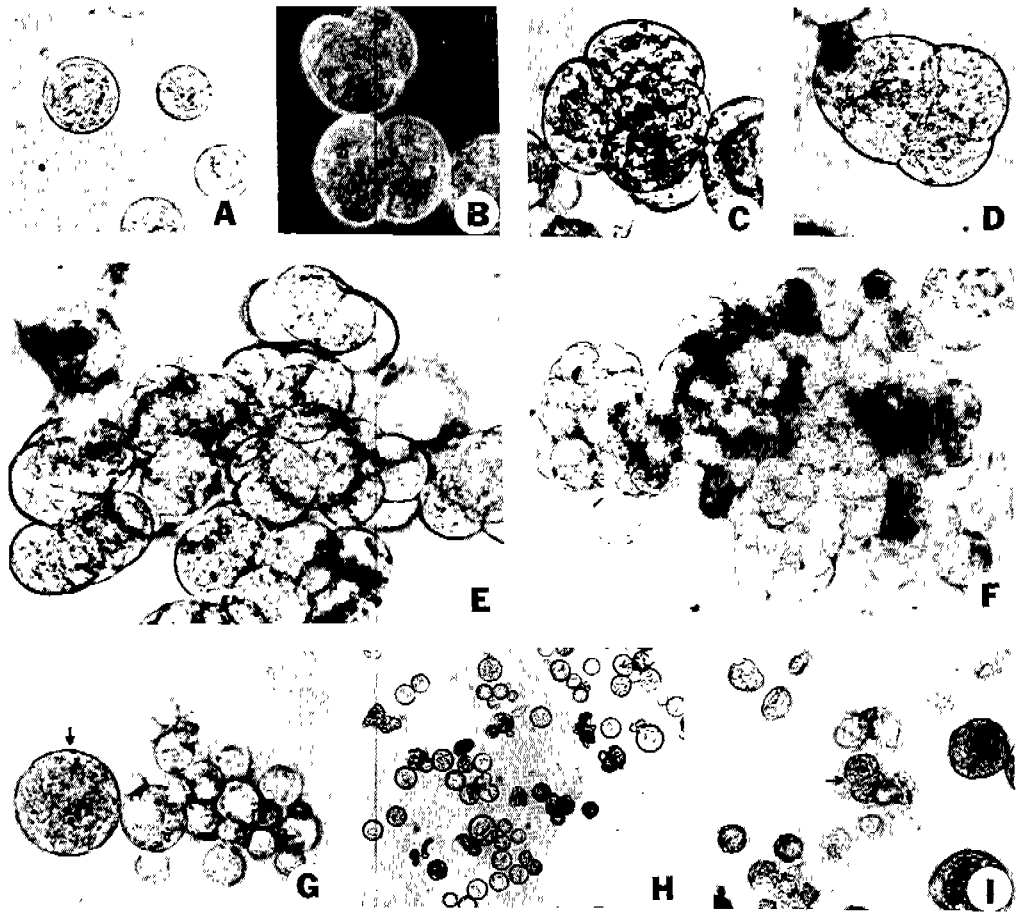


Fig. 1. Callus formation from suspension culture-derived protoplasts of sweet potato.

- A. Freshly isolated protoplasts from nonembryogenic cell aggregates.
- B. First division of protoplasts.
- C. Second division of a protoplast.
- D. Third division of a protoplast.
- E. High frequency of cell divisions.
- F. Colony formation from nonembryogenic cells-derived protoplasts.
- G. A large protoplast(arrow) obtained through spontaneous fusion of protoplasts during enzyme treatment.
- H. Nonembryogenic cells-derived protoplasts(transparent) and embryogenic cells-derived protoplasts(opaque).
- I. First division of a protoplast(arrow) isolated from an embryogenic cell.

로 여겨진다.

Bidney와 Shepard(1980)가 고구마의 葉柄에서 효소처리로 유리한 原形質體 및 葉肉細胞와 Schwcnk(1981)가 葉肉組織을 물리적으로 처리하여 유리한 細胞는 켈러스 단계까지 培養할 수 있었으나 植物體의 再生은 되지 않았다. 고구마의 葉組織(Sehgal, 1975)과 藥의 켈러스로부터 植物體의 再生이 보고되었으나 (Sehgal, 1978), 'White Star'를 재료로 한 본 연구의 예비실험에서는 재현되지 않았다. 켈러스에서 뿐만 아니라 葉組織에서 켈러스의 形成없이 직접 출기를 유도할 수 있는 빈도도 5% 이하로 대단히 낮았다(J. R. Liu, 미발표 데이터). 따라서 原形質體에서 발달한 켈러스에서 器官發生(organogenesis)경로를 통하여 植物體의 再生을 기대하기란 상당히 어려울 것으로 보인다. 이에 반하여 켈러스로부터 體細胞胚를 유도하기는 비교적 용이하다(Tsai and Tseng, 1979; Jarret *et al.*, 1984; Liu and Cantliffe, 1984, 1985; Cantliffe *et al.*, 1987; Liu *et al.*, 1989). 그러므로 고구마의 胚發生細胞에서 原形質體를 유리하여 이를 培養함으로써 體細胞胚發生 경로를 통하여 植物體를 再生할 수 있을 것이다. 이러한 방법으로 원형질체로부터 植物體를 再生한 예로는 화분과의 *Panicum maximum* (Lu *et al.*, 1981), *P. miliaceum* (Heyser, 1984), *Pennisetum americanum* (Vasil and Vasil, 1980), *Pennisetum purpureum* (Vasil *et al.*, 1983), *Oryza sativa* (Fujimura *et al.*, 1985; Coulibaly and Demarly, 1986; Yamada *et al.*, 1986; Abdullah *et al.*, 1986), *Zea may* (Rhodes *et al.*, 1988) 등이 있으나 특정 분류군의 식물에 한정된 현상으로 여겨지는 않는다. 그러나 胚發生細胞는 효소액 처리 중 유리된 原形質體가 서로 융합하여 본 연구에서와 같이 巨大原形質體가 유리되었다고 한다(Lu *et al.*, 1981; Vasil *et al.*, 1983). 巨大原形質體의 출현을 최소화하려면 懸濁培養의 細胞 aggregate의 크기가 충분히 작아야 할 것으로 사료되며 실제로 화분과의 原形質體를 유리한 懸濁培養의 細胞 aggregate의 직경은 20 μ 에 불과하여 (Abdullah *et al.*, 1986; Lu *et al.*, 1981; Toriyama and Hinata, 1985) 본 고구마의 懸濁培養의 세포 clump 보다 훨씬 작았다. 현재까지는 고구마 懸濁培養細胞의 aggregate의 크기를 줄이기 위하여 胚發生 켈러스를 懸濁培養에서 충분히 작은 aggregate로 부서지게 하는 데 효과가 있는 것으로 알려져 있는 AA 배지(Toriyama and Hinanta, 1985)를 사용하는 등의 다각적인 노력에도 불구하고 가능하지 않았다. 또한 본 연구에서 胚發生細胞로부터 단일 原形質體가 일부 얻어졌으나 培養시 겨우 1회의 細胞分裂에 그친 것은 고농도의 효소 처리에 의해 原形質體에 손상을 주었기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 懸濁培養細胞의 aggregate의 크기를 줄일 수 있다면 보다 낮은 농도의 효소에서도 단일 原形質體를 높은 빈도로 유리할 수 있게 되며 原形質體 손상도 적게 주어 原形質體는 지속적인 細胞分裂이 가능하게 될 뿐만 아니라 體細胞胚發生 경로를 통하여 식물체를 再生할 수 있을 것으로 전망된다.

摘 要

懸濁培養된 고구마의 細胞를 효소 처리하여 原形質體를 유리하였다. 非胚發生細胞의 aggregate로부터는 단일 原形質體를 높은 수율로 얻을 수 있었다. 그러나 胚發生細胞의 clump에서 유리된 原形質體는 효소 처리중 대부분 융합되어 巨大原形質體를 이루었으며 극히 일부만이 단일 原形質體였다. 非胚發生細胞의 aggregate에서 유리된 原形質體를 MS 액체배지에 0.1 mg/l BA와 1 mg/l 2,4-D를 첨가한 배지로 옮겨주었을 때 細胞分裂이 계속되어 켈러스를 形成하였다. 그러나 이 켈러스는 MS 기본배지 혹은 0.2 mg/l 2,4-D를 첨가한 MS 고체배지에서 繼代培養을 하였으나 어떠한 器官도 形成되지 않았다. 한편 胚發

生細胞의 clump에서 유리된 단일 原形質體는 드물게 첫번째 細胞分裂을 하였다.

參 考 文 獻

- Abdullah, R., E. C. Cocking and J.A. Thompson. 1986. Efficient plant regeneration from rice protoplasts through somatic embryogenesis. *Bio/Technology* **4** : 1087-1090.
- Bidney, D. L. and J. F. Shepard. 1980. Colony development from sweet potato petiole protoplasts and mesophyll cells. *Plant Sci. Lett.* **18** : 335-342.
- Cantliffe, D. J., J. R. Liu and J. R. Schultheis. 1987. Development of artificial seeds of sweet potato for clonal propagation through somatic embryogenesis. In , W. H. Smith and J. R. Frank (eds.), *Methane from Biomass: A Systems Approach*. Elsevier Applied Sci. pp. 183-185.
- Coulibaly, M. Y., and Y. Demarly. 1986. Regeneration of plants form protoplasts of rice, *Oryza sativa* L. *Z. Pflanzenzuchtg.* **96** : 79-81.
- Frearson, E. M., J. B. Power and E. C. Cocking. 1973. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Dev. Biol.* **33** : 130-137.
- Fujimura, T., M. Sakurai, H. Akagi, T. Negishi and A. Hirose. 1985. Regeneration of rice plants from protoplasts. *Plant Tissue Culture Lett.* **2** : 74-75.
- Harlan, J. R. 1976. The plants and animal that nourish man. *Sci. Am.* **235** : 89-97.
- Henderson, J. H. M., B. R. Phills and B. T. Whatley. 1984. Sweet potato. In, W. R Sharp, D. A. Evans, P. V. Ammirato and Y. Yamada(eds.), *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 2, Crop Species. Macmillan Publishing Co., New York. pp. 302-326.
- Heyser, J. W. 1984. Callus and shoot regeneration from protoplasts of Proso Millet(*Panicum miliaceum* L.). *Z. Pflanzenphysiol.* **113** : 293-299.
- Jarret, R. L., S. Salazar and Z. R. Fernandez. 1984. Somatic embryogenesis in sweet potato. *HortScience* **19** : 397-3908.
- Liu, J. R. and D. J. Cantliffe. 1984. Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of sweet potato(*Ipomoea batatas* Poir.). *Plant Cell Rep.* **3** : 112-115.
- Liu, J. R. and D. J. Cantliffe. 1985. Tissue cultre propagation development and its application to energy crops. *Proceedings of 1984 International Gas Research Conference.* pp. 622-629.
- Liu, J. R., D. J. Cantliffe, S. C. Simonds and J. F. Yuan. 1989. High frequency somatic embryogenesis from cultured shoot apical meristem domes of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *SABRAO J.* (Submitted)
- Lu, C. Y., V. Vasil and I. K. Vasil. 1981. Isolation and culture of protoplasts of *Panicum maximum* Jacq. (Guinea grass): somatic embryogenesis and plant formation. *Z. Pflanzenphysiol.* **104** : 311-318.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15** : 473-497.
- Schwenk, F. W. 1981. Callus formation from mechanically isolated mesophyll cells of soybean and sweet potato. *Plant Sci. Lett.* **23** : 147-151.
- Sehgal, C. B. 1975. Hormonal control of differentiation in leaf cultures of *Ipomoea batatas* Poir. *Beitr. Biol. Pflanzen.* **51** : 47-52.
- Sehgal, C. B. 1978. Regeneration of plants from anther cultures of sweet potato. *Z. Pflanzenphysiol.* **88** : 349-352.

- Rhodes, C. A., K. S. Lowe and K. S. Ruby. 1988. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic maize cell cultures. *Bio/Technology* **6** : 56-60.
- Toriyama, K. and K. Hinata. 1985. Cell suspension and protoplast culture in rice. *Plant Sci.* **41** : 179-183.
- Tsai, H. S. and M. T. Tseng. 1979. Embryoid formation and plantlet regeneration from anther callus of sweet potato. *Bot. Bull. Acad. Sinica* **20** : 117-1122.
- Vasil, V. and I. K. Vasil. 1980. Isolation and culture of cereal protoplasts. Part 2: embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of *Pennisetum americanum*. *Theor. Appl. Genet.* **56** : 97-99.
- Vasil, V. D. -Y. Wang and I. K. Vasil. 1983. Plant regeneration from protoplasts of Napier grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). *Z. Pflanzenphysiol.* **111** : 233-239.
- Yamada, Y., Z. Q. Yang and D. T. Tang. 1986. Plant regeneration from protoplast-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep.* **5** : 85-88.

(1989. 8. 22 接受)