

## 原形質培養과 體細胞雜種

韓 昶 烈

(原子力廳 放射線農學研究所)

## Plant Protoplast Culture and Somatic Cell Hybridization

Harn, Changyawl

(Radiation Research Institute in Agriculture, Office of Atomic Energy)

(1972. 9. 28 접수)

### ABSTRACT

This paper includes a review on recent development on protoplast culture, regeneration of plant from protoplast, and fusion of isolated protoplasts, and also describes the possibility of obtaining interspecific or intergeneric hybrid plants through asexual fusion of protoplasts of cells from distantly related plants which are not crossed by the ordinary sexual method.

植物의 異種 또는 異屬間에 人爲交雜에 의해 新種, 新屬을 만들어 낸 예는 많고 그 歷史도 오래다. 몇가지 例를 들면 種間雜種의 例로써는 *Brassica oleracea* 와 *B. campestris*와의 交雜으로 *B. napus*의 合成, *Nicotiana tabacum*과 *N. glutinosa*와의 交雜으로 *N. digluta*를 만들었고, *Hibiscus glutino-textilis*는 *H. esculentus*와 異種 *H. manihot*의 交雜으로 만들어졌다. 屬間交雜의 例로써는 *Raphanus*屬과 *Brassica*屬間의 *Raphano-Brassica*, *Aegilops*와 *Triticum*과의 屬間雜種 *Aegilotriticum*, 胡麥과 小麥間의 雜種 *Triticale* 등이 있고, 그밖에도 蘭科植物에서는 *Cattleya*屬, *Laelia*屬, *Brassavola*屬, *Sophranitis*屬間에 2元, 3元, 4元屬間交雜이 自由自在로 되어 Lc, Bl, Slc 등 多數의 新屬들이 만들어졌다. genome이 다른 異種間, 異屬間交雜을 하면 F<sub>1</sub>은 대개 不稔이 되나, F<sub>1</sub>의 染色體를 倍加하면 異質倍數體가 되어 稔性은 다시 回復된다. 育種에서는 F<sub>1</sub>을 直接 利用하는 수도 있고, 倍加 個體를 쓰는 수도 있다.

現在까지의 異種, 屬間交雜은 주로 異種植物間의 genome 分析에 의한 類緣關係究明, 어떤 植物의 起源 또는 推定原種의 探索 등 植物學上的 目的과 實地 育種

에 雜種을 利用하기 위한 目的 등으로 實施되어 왔는데, 對象이 된 植物은 많은 植物中 극히 一部에 不過 하였다. 그 理由는 이런 研究들 할려면 그들 間에 반드시 交雜이 되어야 된다는 條件이 따르기 때문이다. 植物에서 種 以上の Taxon이 다르면 交雜이 안되는 수가 많다. 植物의 種, 屬은 오래전 外部 形態의 特徵을 주로 해서 分類되었기 때문에 近代 生物學의 各 分科의 새로운 知識을 토대로 한 分類, 例를 들면 類緣 關係 等を 考慮한 分類와는 맞지 않는 境遇도 있다. 交雜親和性 하나만 보더라도 異屬間에 交雜이 아주 잘 되는 植物이 있는가 하면, 어떤 것에서는 同一種內 異型間에 交雜不親和를 나타내는 것도 있다. 그러나 대개의 境遇 異種, 屬間에 交雜이 잘 안된다는 것은 形態爲主의 分類이지만 比較的 잘 되었다고 볼 수 있다.

萬一 이 많은 植物들에서 種屬間에 交雜이 안되는 것을 交雜이 되지 한다면 그 意義는 尙르 를 것이다. 植物學上에서는 近緣植物間의 類緣關係, 現存植物들의 水平進化의 研究, 新種, 屬의 合成을 마음대로 할 수 있을 것이다. 應用分野에서의 意義 또한 尙르 것이다. 育種이 高度로 進行되던 作物이 가지고 있는 現存 遺傳子는 全部 利用되기 때문에 因子源의 缺乏이 생기므로

因子들 近緣野生植物에서 求하게 된다. 또 品種은 우리 要求에 맞도록 改良되기 때문에 育種이 高度化될수록 品種은 虛弱해진다. 한편 近緣植物들은 野生이기 때문에 강한 耐性因子—耐病, 耐虫, 耐寒暑, 耐鹽—들을 가지고 있으므로 단일 異種, 異屬間에 交雜을 出来る 할 수 있다면 이런 優秀한 因子들을 作物에 導入할 수 있을 것이다. 이 點 하나만으로도 育種學上的 意義가 일마나 큰가를 짐작할 수 있다.

異種, 屬間에 交雜이 안된다 하지만 작은 그 정도에 의해서 가지가 있다. 그중 受精後 雜種幼胚가 發達하는 途中에 死滅하는 것이 있는데 이런 것은 胚培養으로 雜種을 얻을 수가 있으며, 異種間에 開花期가 다르기 때문인 것은 人爲적으로 花期를 調節함으로써 交雜種子를 얻을 수도 있다. 그러나 大部分의 境遇 異種屬間에는 花粉發芽, 花粉管的 伸長, 受精 등이 안된다. 이런 것은 이 植物들이 오랜 歲月이 지나면서 생긴 生理的 生殖隔離이기 때문에 現在技術로는 花粉發芽, 花芽管伸長, 受精 등을 시키고 幼胚를 形成시켜 交雜不規和을 交雜和合化 시키지는 못한다.

여기서는 交雜이 안되는 異種間, 異屬間의 交雜을 原形質融合에 依한 體細胞雜種을 통해서 實現시킬 수 있는 可能性을 생각해보고자 한다 (Schenk and Hildebrandt, 1968; Nickell and Torrey, 1969). 이것은 異種間交雜이 普通手段으로는 안되는 2種의 原形質을 融合시키고, 이 原形質에 細胞膜을 다시 形成시킨後, 이 雜種細胞에서 植物體를 再分化시킴으로써 兩種植物의 體細胞가 가지고 있는 genome이 섞여진 새로운 植物을 만들자는 것이다. 以上은 極히 簡單한것 같지만 많은 難點들이 있다. 即 植物의 原形質을 活性을 弱화시키지 않고 裸出し시켜야 된다는 것, 原形質이 다시 細胞膜을 形成할 수 있게 하는 方法, 再生된 細胞에서 植物體를 再分化시키는 問題, 그 다음은 2種의 原形質을 融合시키는 것, 이때 Heterokaryon 및 核融合問題, 融合核의 gene balance와 活性關係, 融合核의 細胞膜形成能 및 植物體再分化能 등 許多한 難點들이 있다. 이밖에도 이런 操作은 無菌 및 營養缺乏 狀態下에서 實施하고, 또 遠心分離, Vacuum pumping을 해도 裸出原形質의 活性에 影響을 안주도록 하셔야 되므로 容易한 일은 아니다. 이제 그 難點들中的 하나하나에 대하여 檢討해 보기로 한다.

原形質을 裸出し키는 것은 오늘날 그다지 힘든 일은 아니다 (Ruesink and Thimann, 1966; Otsuki and

Takebe, 1969; Power and Cocking, 1969). 이것은 1960年 Cocking이 Tomato의 根端을 Cellulase로 處理하여 原形質을 分離시킨 것이 契機가 되었는데 最近 2~3年來 여러 高等植物의 原形質을 살아 있는 狀態로 裸出し키는 方法이 急速度로 發展되었다. 일의 莖肉組織, 뿌리 기타 生長點組織 등에서 먼저 單細胞를 分離시키고, 또 이 單細胞의 膜을 除去하여 原形質을 裸出し킨다. 이때 組織細胞의 原形質이 어느 程度 原形質分離狀態로 있고 또 破壞안되도록 適合한 Osmoticum을 쓰는데 Mannitol, Sucrose, Sorbitol, 靈類 등의 適合 Molec 溶液들이 이 目的으로 使用된다. 組織에서 單細胞를 游離시키는데는 Pectinase를, 單細胞에서 細胞膜을 除去하여 原形質을 裸出し키는 데는 Cellulase를 處理한다.

다음은 일단 이와 같이 裸出된 原形質이 다시 細胞化되고 植物體로 再分化될 수 있는지의 問題인데 原形質이 다시 細胞膜을 形成하였다는 結果는 콩, 담배 등에서 最近 報告되었다 (Keller et al., 1970; Miller et al. 1971; 薙部, 1971). 일단 細胞만 되면, 近來 組織, Callus, 單細胞培養技術이 많이 發達되었기 때문에 이런 細胞에서 植物體를 再分化시키는 것은 그다지 힘든 일이 아니다. 이와 같이 해서 原形質培養에서 다시 植物體까지 再生시킨 例로는 1971年 Takebe et al.가 담배의 葉肉原形質으로써 담배를, 1972年 Grambow et al.은 당근의 Callus 由來의 原形質에서 당근을 再分化시킨 것이 있다.

다음은 原形質融合인데 異種, 屬間의 融合보다 우선 同種原形質을 어떻게 하면 融合시킬 수 있는가 問題이다. 原形質融合에 대한 報告는 1970年 Power et al.이 燕麥의 同種原形質間의 融合을 報告한 바 있다. 콩 (Miller et al., 1971), 당근 (Grambow et al., 1972)에서도 示唆한 바 있지만 그 眞否에 대해서는 아직 論難이 많다. 原形質의 融合을 爲하여는 Plasmolemma의 電氣的 性質의 變化, 原形質의 Plasmolysis와 Deplasmolysis, 溶液의 Ion 條件 등이 問題될 것이고 이밖에도 原形質融合이 반드시 核融合은 아닌데 核融合條件에 對해서는 아직 모르는 點이 많다. 原形質融合問題에서 急先務는 우선 同種原形質間에라도 自由로 融合시킬 수 있는 方法을 確立하는 것이다 (Fig. 1, 韓, 未發表).

以上과 같은 여러 問題들이 잘되면 마지막으로 異種의 兩 原形質을 融合시키고, 이것에 細胞膜을 形成케 하며, 나아가서는 雜種植物을 誘起시키는 것인데, 여

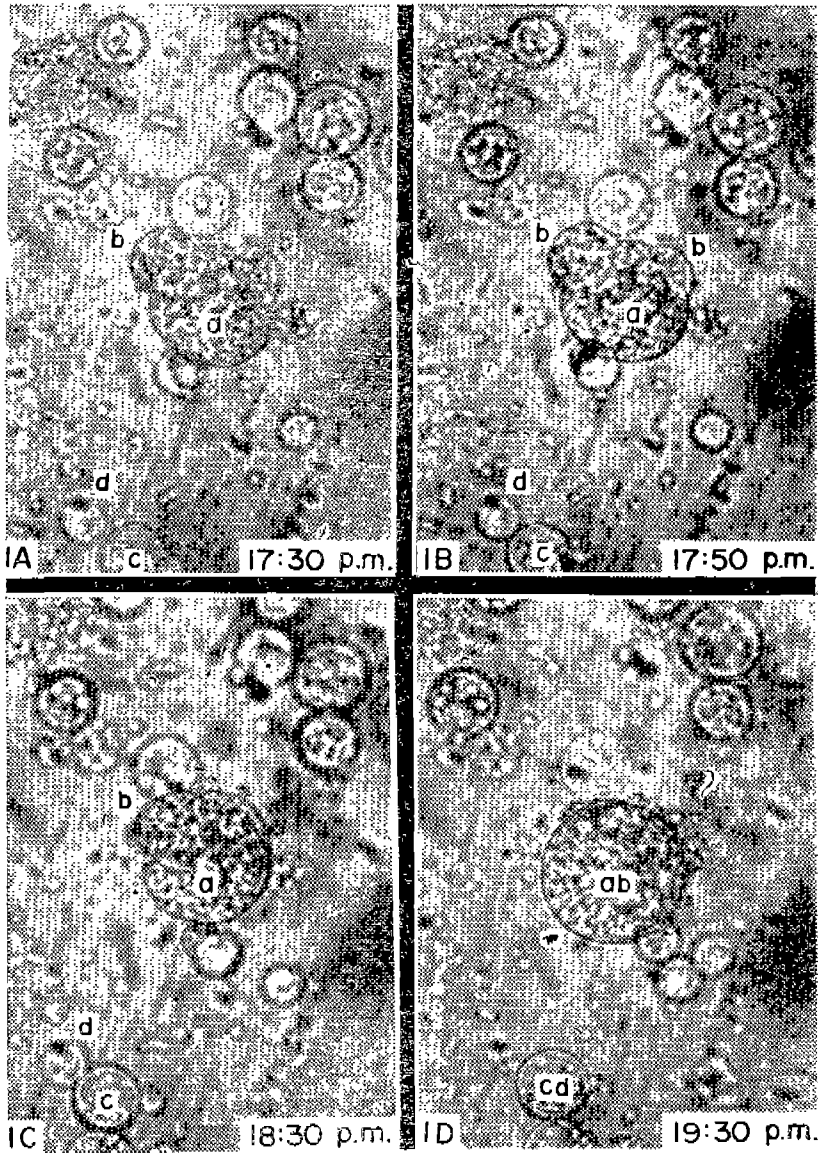


Fig. 1. Fusions of rice protoplasts: rice tissues were macerated and cell walls were dissolved in pectinase-cellulase mixture of 0.56 M sucrose osmoticum, and the protoplasts resulted were transferred to 0.25 M sodium nitrate for the acceleration of protoplasmic fusion. The time protoplasts were transferred was 17:05 p.m.

Fig. 1A. One large protoplast (a) starts to fuse synchronously with two smaller protoplasts (b). Below left, two protoplasts (c, d) of dissimilar size lie side by side (17:20 p.m.); Figs. 1B, C. a and b's almost fused and in Fig. 1C part of one b is still identifiable. c and d are stuck together (Fig. 1B at 17:50 p.m. and Fig. 1C at 18:30 p.m.); Fig. 1D. Fused giant protoplast (ab) has rounded-off and below left, c and d protoplasts also fused completely (cd) (19:30 p.m.) (Harn, unpublished).

기서 가장 難點은 異種原形質을 融合시켰을 때 核이 Heterokaryon 狀態로 있느냐 融合核을 곧 形成하느냐이다. 이런 것은 人爲으로 調節하기가 困難한것이기 때문에 더욱 問題거리가 된다.

다음은 體細胞由來의 2種의 核이 합쳐졌을 때 兩種에서 온 遺傳子의 集合이 그 核의 機能 即 活性, 細胞膜形成能, 分裂能 나아가서는 分化能 등이 있도록 均衡이 되어 있는가이다. 이 問題는 比單原形質融合에서 뿐만 아니라, 異種間의 受精에 의한 交雜에서도 마찬가지인데 兩種의 類緣關係의 近遠에 의해 交雜의 難易가 決定된다. 그런데 受精에 의한 交雜時는 雌雄配偶子의 種類에 따라 遺傳組成의 均衡이 맞는 것 안맞는 것 등이 있기 때문에 『交雜이 잘 안되는 植物에서도 간혹 交雜이 되는 수도 있다』는 例를 흔히 본다. 이것을 좀더 상세히 說明하면 類緣關係가 比較的 近 種屬間에 交雜을 할 때 兩種의 配偶子의 因子組成에 따라 그 중에는 受精도 안되는 것, 受精後 死滅되는 것, 接合子가 幼胚形成 도중 囊退되는 것, 種子形成까지는 되지만 種子發芽가 안되는 것, 雜種植物까지 되는 것 등 區區할 것이다. 즉 이런 境遇에는 交雜이 可, 否의 二範疇로 나뉘질 않고, 交雜이 힘들지만 되는 수도 있다고 할 수 있어 交雜에 融通性이 있다. 그 實例로 배추와 무우의 屬間交雜에서 볼 수 있다. 우리는 배추에 Pseudogamy를 誘起시켜 自家不和合系를 育成키 爲해 흔히 배추의 柱頭에 무우의 花粉을 授粉시킨다. 이때 무우의 精核은 卵細胞에까지 가면서도 卵核과 融合하지 못하고 精核이 消滅되어 버리지만 배추의 卵細胞는 精核의 刺戟으로 單爲生殖을 하는 수가 있는데 이때 滅數卵은 卵割時 染色體倍가가 되기 때문에 생긴 배추는 Homo 2倍體가 되어 結局 自家不和合個體가 된다. 이와 같이 배추와 무우는 遠緣이기 때문에 兩屬의 配偶자가 親和性이 없지만 그렇다고 해서 전혀 交雜이 不可能한 것은 아니고 0.3% 정도로 雜種種子가 생긴다 (韓·李, 1962). 그러나 이런 雜種은 한결같이 뿌리는 배추뿌리같이 작고, 잎은 무우잎같이 結球를 안하여 전혀 利用價値가 없는 것이 생긴다. 다시 말해서 그런 遺傳子組成의 것은 均衡이 맞아 受精을 해서 個體까지되지만 큰 結球를 支配하는 因子와 큰 뿌리에 關與하는 因子들을 가진 配偶자들은 비록 受精이 되어도 遺傳子組成에 均衡이 안맞아 早期에 接合體致死가 될 것이다. 이와 같이 授粉, 受精에 의한 交雜에는 交雜 可, 否에 融通性이 있을 수 있지만 異種原形質의 融合時에는 兩種의 genome 全體이 합쳐지는 고로 配偶子처럼 選擇

性이 없고 融合核의 遺傳子組成은 한 種類이기 때문에 均衡이 맞으면 살고, 안맞으면 死滅해 버린다. 因子組成이 안맞아 融合核이나 雜種細胞가 죽는 것은 人爲으로 調節할 수는 없다.

以上 말한 것 中 重要한 部分을 要略하면 植物에서 原形質을 分離하였다가 다시 植物體로 再分化시킬 수 있는 方法 即 (1) 植物組織→游離單細胞→原形質→細胞膜形成→植物體再生을 여러 植物에서 可能하게 하고, 다음은 同種原形質間의 融合 即 (2) 原形質<sup>></sup>融合核→細胞膜形成의 研究가 여러 植物에서 成功되어야 되겠다. (1)과 (2)를 自由로 할 수 있을 때 最終 目標인 (3)  $\Delta$ 植物(AA genome)→原形質<sup>></sup>原形質融合(AABB genome)→雜種細胞→雜種植物(AABB)을 企圖할 수 있다. 再言하지만 이중 힘든 問題는 原形質이 다시 細胞膜을 形成하는 것, 同種 또는 異種間의 原形質 및 核의 融合問題, 融合核의 細胞膜形成 및 個體發生될 것이고 또 注意하여야 할 點은 原形質을 살아있는 狀態로 取扱하여야 되기 때문에 處理中의 營養, osmoticum, 處理時間, 無菌操作 등을 어떻게 하던 原形質의 活力에 支障이 없게 하는가 일 것이다.

授粉, 受精에 의해 交雜이 안되는 것을 細胞雜種에 의해 試圖할 때 어느 정도 可能할까. 即 『受精에 의해 交雜이 되는 異種間은 가깝고, 안되는 것은 遠緣이 아닐까? 이것을 細胞雜種으로써 雜種을 얻으려 할 때 대개는 遺傳子組成의 不均衡으로 失敗되거나 안올까?』라는 疑問도 生길 것이다. 事實 우리가 異種, 屬間의 類緣關係를 論할 때 交雜親和性은 가장 重要한 基準의 하나이다. 그러나 動植物의 分化를 보면 어떤 것은 形態的 變化가 거의 없이 生殖的 隔離때문에 異種으로 分化된 것이 있는가 하면, 反面 形態, 生態의으로는 심한 變異가 있는데도 生殖的으로는 極히 親和性이 있는 것 등 生物의 種, 屬分化는 그 樣相이나 정도가 대단히 千奇百怪하다. 異種, 屬일수록 受精에 의한 交雜이 안되는 境遇가 많은 것은 사실이지만 交雜이 안된다해서 반드시 兩種의 因子 組成이 不均衡을 이룬다고는 할 수 없기 때문에 細胞雜種에 의한 種, 屬合成의 可能性은 극히 크다고 본다.

組織에서 原形質을 分離시키고, 이 原形質에서 다시 植物體로 再分化시킬 수 있게 되었다. 또 原形質間의 融合도 可能하게 되었다. 이 두 『可能』이 합쳐져 今後

異種, 屬의 原形質이 融合되고 여기서 雜種細胞와 雜種植物이 誘起되게 되어 第 3의 可能이 達成되는 날 植物學이나 農學에서는 또하나의 劃期的인 事件으로 記錄될 것이다.

### 參 考 文 獻

- Cocking, E. C., 1960. A method for isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*, 187 : 962-963.
- Grambow, H. J., K. N. Kao, R. A. Miller and O. L. Gamborg, 1972. Cell division and plant development from protoplasts of carrot cell suspension cultures. *Planta (Berl.)*, 103 : 348-355.
- 韓昶烈·李炳基, 1962. 배추青邦苦根×무우蔚山在來의 屬間雜種에 대한 細胞遺傳學的 研究. *식회지*, 5 : 21-24.
- Keller, W. A., B. Harvey, O. L. Gamborg, R. A. Miller and D. E. Evleugh, 1970. Plant protoplasts for use in somatic cell hybridization. *Nature*, 226 : 280-282.
- Miller, R. A., O. L. Gamborg, W. A. Keller and K. N. Kao, 1971. Fusion and division of nuclei in multinucleated soybean protoplasts. *Can. J. Genet. Cytol.*, 13 : 347-353.
- Nickell, L. G. and J. G. Torrey, 1969. Crop improvement through plant cell and tissue culture. *Science*, 116 : 1068-1069.
- Otsuki, Y. and I. Takebe, 1969. Isolation of intact mesophyll cells and their protoplasts from higher plants. *Plant and Cell Physiol.*, 10 : 917-921.
- Power, J. B. and E. C. Cocking, 1969. A simple method for the isolation of very large numbers of leaf protoplasts by using mixtures of cellulase and pectinase. *Biochem. J.*, 111(5), *Proc. Biochem. Soc.*, 33P.
- , S. E. Cummins and E. C. Cocking, 1970. Fusion of isolated plant protoplasts. *Nature*, 225 (14) : 1016-1018.
- Ruesink, A. W. and K. Thimann, 1966. Protoplast: preparation from higher plants. *Science*, 154 : 280-281.
- Schenk, R. U. and A. C. Hildebrandt, 1968. Somatic hybridization: A new approach to genetic change. *Amer. J. Bot.*, 55 : 731.
- Takebe, I., G. Labib and G. Melchers, 1971. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Naturwissenschaften*, 58 : 318-320.
- 建部到, 1971. 高等植物의 프로토플라스트: 新しい質験系としての 可能性について. *Symp. Cell Biol.*, 22 : 205-212.