

原形質體 分離, 培養 및 *Nicotiana* 種間 細胞融合에 關한 研究

윤 경 은 · 김 준 철 · 최 상 수 · 손 세 호

韓國煙草研究所 育種部

(1979. 9. 28 접수)

Isolation, Culture, and Fusion of *Nicotiana* Protoplasts

K. E. Yoon, J. C. Kim, S. J. Choi and S. H. Son

Korea Tobacco Research Institute, Suwon, Korea

(Received Sept. 28, 1979)

초 록

본 시험은 담배 싹품종 육종기술확립을 위하여 효율적으로 原形質體(protoplast)를 얻을수 있는 방법과 protoplast 배양조건을 조사하였다.

1. protoplast 를 효율적이며 경제적으로 얻을 수 있는 세포붕괴, 細胞模解離 酵素의 농도는 0.5% macerozyme + 2% cellulase (또는 meicellase)였다.
2. 효소처리시간은 품종간에 약간의 차이는 있었으나 4시간 이상이 필요하였으며 1인 작업량으로 보아 4시간이 가장 적합하였다.
3. 等張液을 만들기 위하여는 0.5~0.7 M의 mannitol 이나 sorbitol 을 이용하는 것이 좋았다.
4. 세포융합시에 Ca^{++} 이온의 농도는 중요하며 9 mM $CaCl_2$ 를 포함한 PEG 용액 (0.5g/ml) 을 쓰는 것이 가장 효과적이었다.
5. 분리된 protoplast 는 B-5 培地에서 계속분열하여 colony 를 형성하였다.

Abstract

For the preliminary study on tobacco cell fusion as one of new breeding techniques, the conditions that would be most effective in isolation, fusion, and culture of tobacco protoplasts were examined;

1. The enzyme solution of 0.5% macerozyme and 2% cellulase (or meicellase) was the most economic and efficient in isolating protoplasts from tobacco leaves.
2. The proper incubation period of tobacco leaves in cell wall digesting solution

was 4 hours

3. As an osmotic stabilizer, sorbitol or mannitol solutions were employed. The concentration of 0.5~0.7M of either hexitol gave satisfying results as the osmotic stabilizer.

4. The calcium concentration appeared to be an important factor in protoplast fusion. The adhesion of protoplasts was enhanced by enrichment of calcium ion in PEG solution. The highest frequency of protoplast fusion was obtained when tobacco protoplasts were incubated in PEG solution, containing 9 mM CaCl₂.

5. Cell divisions of the isolated protoplasts were continued and have generated colonies when they were grown on B-5 medium at 28 °C.

서 론

최근 조직배양의 발달은 생식세포의 관여없이 체세포의 융합에서 잡종식물을 얻을 수 있는 단계에 이르렀다. 1972년 Carlson 등(2)이 처음으로 *Nicotiana glauca* 와 *N. langsdorffii* 사이의 體細胞交雜을 시험관내에서 성공시켜 완전히 성숙한 種間雜種담배를 얻은 이후 많은 학자들의 관심을 모으게 되었다. Melcher 와 Labib(9) 등은 *Nicotiana tabacum* 내의 두가지 돌연변이체의 protoplast 융합에 의하여 잡종식물을 육성하였고 長尾(11)는 *N. tabacum* 의 돌연변이종과 *N. rustica* 에서 잡종식물을 육성하였다.

Nicotiana 속이 아닌 식물의 잡종식물은 같은 가지과(Solanaceae)인 tomato 와 감자사이의 잡종식물을 얻었다는 보고가 있다.(10) 1972년 이래 많은 연구자들이 잡종식물을 얻으려 했으나 잡종세포를 얻는 것과 달리 성숙한 잡종식물을 얻는데 성공한 예는 그리 많지 않으며 육성된 잡종식물도 실제 육종자로서 이용하지 못하는 상태이다. 본 시험은 체세포 잡종을 얻기 위한 육종기술확립의 일환으로 protoplast 분리, protoplast 배양 및 융합에 관한 실험을 시도하였다.

재료 및 방법

1. protoplast 解離

공시재료로서는 *N. tabacum* L. 에 속하는 BY4, 素香, 香草, Xanthi, 와 *Nicotiana* 중중 *rustica* 와 *glutinosa* 를 사용하였다. 이상의 공시식물에서 50~60 일된 苗의 하위엽을 채취하여 중성세제로 씻은 후 1% sodium hypochlorite 로 10분동안 소독하고 표피세포를 제거한 후 효소액을 이용하여 protoplast 를 분리하였다. 효소액은 0.5% macerozyme 과 2% cellulase 를 포함한 0.7M mannitol 용액을 시료 무게의 5배를 사용하였으며 해리된 protoplast 는 발이 고운 「나이롱」형걸로 걸러서 3분간 低速遠心分離(100×g)하여 침전된 protoplast 를 洗液(6)으로 수차 씻은 후 다음 단계로 들어갔다.

2. protoplast 융합 및 배양

protoplast 의 융합은 polyethylene glycol(PEG)를 이용하여 시도하였으며 PEG 처리 1시간후 부터 PEG를 10분간격으로 5회 씻어낸 후 Gamborg의 B-5 배지(4)에 배양하며 배양온도는 28°C로 맞추어 주었고 광도는 800Lux 정도였다.

결과 및 고찰

1. 효소의 효과

식물세포는 동물세포와 달리 견고한 세포막이 있어 이를 제거하지 않으면 protoplast 융합이

불가능하다. 세포막을 제거하는 데는 세포를 붕괴시키는 과정과 세포막을 해리하는 과정이 있어 2단계를 거치는 방법과 두가지 과정을 동시에 하는 1단계 처리방법이 있는데 본시험의 결과로는 2단계 방법보다 1단계 방법이 더 효율적이었으며 이 처리에서 세포막해리역할을 하는 meicellase와 cellulase의 효과를 보면 Table 1과 같았다.

macerozyme + meicellase 처리가 macerozy-

에서 보는 바와 같이 12시간 처리하면 protoplast는 많아지나 protoplast가 터지는 율도 높아갔다. 특히 24시간후에는 그 경향이 더 심하였다. Xanthi가 가장 protoplast를 해리하기가 쉬워 2시간 효소처리후에도 protoplast 수확이 좋았으며 원형질막이 터지는 율도 적었다. *N. glutinosa*는 *rustica*나 *tabacum*에 비하여 protoplast 수확이 적었다.(Table 3) 이상의 결과로 보아 분리·융합까지의 과정을

Table 1. Effect of Enzyme Solution on the Isolation of Tobacco Protoplasts

Enzyme Solution	Yield ^a	Number of Intact. Protoplasts ^b
M ^c + 1% Meicellase	38.0	—
M + 2% Meicellase	47.6	—
M + 4% Meicellase	61.5	80
M + 6% Meicellase	80.0	—
M + 1% Cellulase	29.8	—
M + 2% Cellulase	41.7	84
M + 3% Cellulase	66.0	—

$$a: \text{Yield} = \frac{1}{\text{transmission at } 630 \mu\text{m}} \times 100$$

$$b: \text{number of intact protoplasts} = \text{number of protoplasts in } 1.5\text{mm}^2 \text{ of Thoma's hemacytometer}$$

$$c: M = 0.5\% \text{ macerozyme}$$

me + cellulase 처리보다 세포붕괴힘이 큰 것 같으나 macerozyme + cellulase 처리에서 전전한 protoplast가 더 많이 생기는 경향이 있었으며 세포막해리효소의 농도가 높아질 수록 해리세포밀도가 높아갔으나 터지지 않은 전전한 protoplast를 얻는 비율이 떨어졌다. 세포막해리효소의 농도는 meicellase와 cellulase 모두 2% 수준이 가장 경제적인 농도로 사료된다.

2. 효소액 처리시간

효율적으로 protoplast를 얻을 수 있는 효소 처리시간은 4~12시간이 소요되나 Table 2

1일 단위 조작으로 시도할 경우 효소처리하는 4시간 정도로 지장이 없다

3. 삼투압 조절물질(osmotic stabilizer)농도의 효과

효소액이나 세액의 등장농도로는 0.5~0.7M 농도의 mannitol이나 sorbitol을 이용하는 것이 좋았다.(Fig. 1) 저장액인 0.1M mannitol 용액에서는 chloroplast가 원형질막쪽으로 쏠리고 거위가 터지는 경향이 많았으며(Fig. 2) 0.25M의 mannitol 용액에서는 protoplast가 터지는 정도가 0.1M mannitol 용액에서 보다 적었으나 역시 외부의 물이 세포내부로 흡수된 관계로

인지 chloroplast의 분포가 등장액에서와 달랐다.(Fig. 3과 Fig. 8 비교) 저장액에 protoplast를 넣었을 경우 가끔 Fig. 9와 같이 chloroplast가 빠져나간 듯한 텅빈 protoplast가 보일 때가 있었다. Uchida의 말에 의하면 (personal communication) 髓(pith)에서 나온 protoplast는 chloroplast가 거의 없다고 하나 Fig. 9에서와 같이 chloroplast가 protoplast에서 쏟아져 나오는 것을 관찰할 때가 있다. 이는 protoplast를 低張液에 넣었을 때 삼투압의 차이로 외부의 물이 세포내로 들어올 때 넓어진 원형질막의 틈, 아마 plasmodesmata사이를 통하여 chloroplast가 빠져나온 것이 아닌가 생각된다. 高張液에 올라가도 等張液에서의 protoplast와 달랐으며 (Fig. 5 ~ Fig. 7) 1.0 M mannitol 용액에서는 proto-

Table 2. Effect of Incubation Period of Tobacco Leaves in Enzyme Solution on Protoplast Isolation

Incubation Period	Number of Protoplasts ^a
1 hr	0
2	2
3	15
4	24
6	27
18	49

a : Number of Protoplasts = number of protoplasts in the area of 1mm² of Thoma's hemocytometer

Table 3. Some Characters of *Nicotiana Speciosa* Species Protoplasts

Species	Source	Characters			
		Diameter (μm)	Cytoplasmic	Yield of	
		Mean	Range	Strands	Protoplast ^c
<i>N. glutinosa</i>	YL ^a	53.1	42.6 - 61.9	poor	+
<i>N. rustica</i>	YL	31.0	23.2 - 46.4	poor	+++
<i>N. tabacum</i> Var.	YL	36.5	15.5 - 54.2	fair	+++++
Xanthi					
Hyangcho	YL	29.5	23.2 - 46.4	rich	++
BY 4	YL	31.3	27.1 - 42.6	fair	++
Sohyang 1	YFEL ^b	56.8	38.7 - 85.1	fair	++++

a : YL = Young Leaves

b : YFEL = Young, Fully Expanded Leaves

c : +++++ = Excellent, ++++ = Very good, +++ = Good, ++ = Fair, + = Poor

plast가 줄어들면서 커그리지기도 하고 (Fig. 6) 1.5 M의 manitol 용액에서는 거의 다 터져 버렸다.(Fig. 7) Takebe (14)등에 의하면 0.3 M에서 protoplast가 터지고 등장액으로는 0.8 M manitol 용액을 이용하였으나 본 시험의 결

과로는 0.8 M manitol은 너무 농도가 진한 것으로 관찰되었다. Takebe 등도 저장액에서는 chloroplast와 다른 세포내용물이 빠져나온 것으로 발표하였다.

효소액이나 세액의 농도조절로 등장액을 만드

는 것을 목적으로 하면 무기염류나 포도당, 자당등을 이용할 수 있겠으나 이들은 대사에 관여하기 때문에 protoplast가 세포막을 재생시킬 때 흡수가용되므로 자연적으로 滲透力 (osmotic potential)이 차차 감소되는 결과가 되어 이를 사용하지 않는 것이 좋겠다. 그러나 Gamborg 등(5)에 의하면 pea protoplast배양액의 삼투압조절제로서는 hexitol (mannitol이나 sorbitol)만을 쓰는 것보다 glucose를 같이 사용하면 protoplast가 더 잘 자라며 자당은 해로웠다고 하였다.

4 protoplast 융합 및 배양

세포융합은 protoplast해리시에도 자연적으로 생기는 경우도 있으나(6) 융합시에 융합매개액을 사용하면 융합률이 높아진다 (3, 12). 0.5 g/ml의 PEG 6,000을 protoplast 융합매개액으로 사용하였을 때 Ca⁺⁺이온의 첨가는 매우 중요하며 Ca⁺⁺이온이 들어가지 않았을 때는 protoplast 융합이 거의 일어나지 않았으며 9 mM의 CaCl₂가 들어간 PEG 액이 세포융합효과가 가장 좋았다 (Table 4).

분리된 식물의 protoplast는 (-) charge를 갖고 있는 것으로 알려졌다.(12) 칼슘이온은 화분관이 터지는 것을 막는 것과 같이(8) 원형질막이 터지는 것을 막아주고 (-) charge

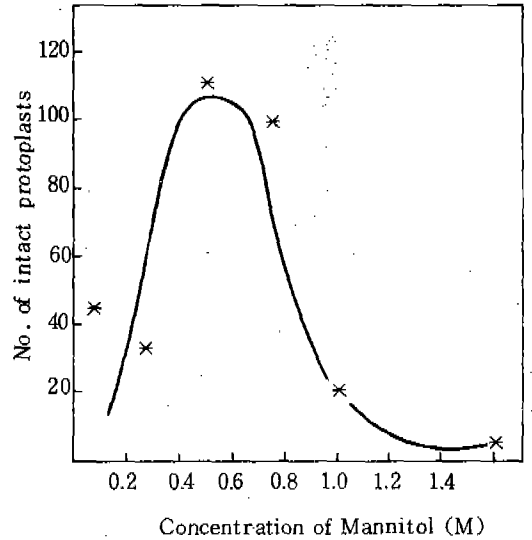


Fig. 1. Effect of osmotic stabilizer concentration on protoplast isolation.

를 띄고 있는 2개의 protoplast의 막을 서로 연결시켜 주는 역할을 함으로서 protoplast 융합을 돕는 것으로 생각된다. 그러나 농도가 높아지면 인접한 두 막사이를 연결해 주는 것보다 칼슘이온이 막의 (-) charge와 결합하여 두 막사이에서 서로 밀어내는 경향을 띄우게 되어 protoplast 융합률이 고농도의 Ca⁺⁺이온을 갖는 PEG 용액에서 떨어진다고 생각된다.

Table 4. The Effect of Calcium Concentration on Fusion of Tobacco Leaf Protoplasts
The Basal Medium Contained 0.5g/ml PEG 6000 and 0.1 M Glucose

Treatment		Fusion of Protoplasts ^b
Solution	Conc. of CaCl ₂ mM	
B ^a	0	-
B + CaCl ₂	3	+
B + CaCl ₂	6	+
B + CaCl ₂	9	+++
B + CaCl ₂	12	++

a: B = Basal Medium

b: - = Poor, + = Fair, ++ = Good, +++ = Very Good

PART I



Fig. 2. Protoplasts in 0.1M sorbitol solution (× 400).

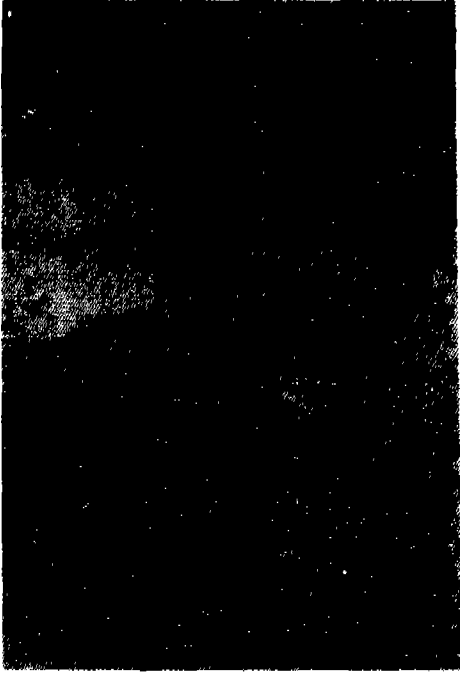


Fig. 3. Protoplasts in 0.25M sorbitol solution (× 400).

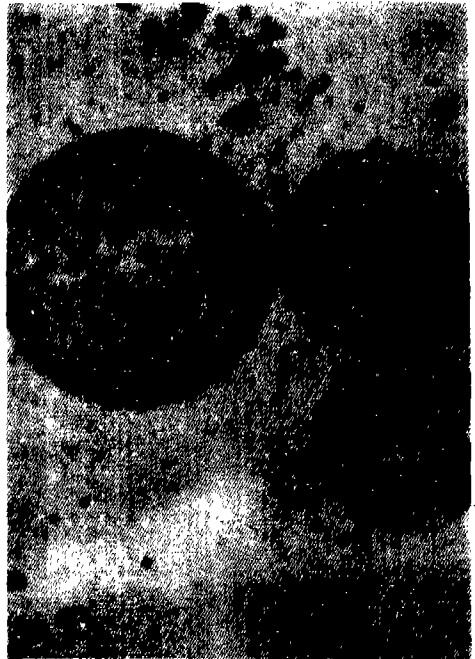


Fig. 4. Protoplasts in 0.5M sorbitol solution (× 400).

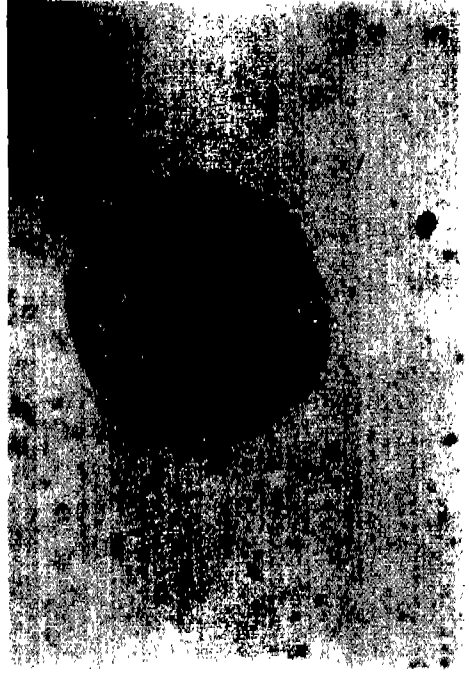


Fig. 5. Protoplasts in 0.75M sorbitol solution (× 400).

PART I



Fig. 6. Protoplasts in 1.0M sorbitol solution ($\times 400$).



Fig. 7. Protoplasts in 1.5M sorbitol solution ($\times 400$).



Fig. 8. Freshly isolated protoplasts in 0.6M sorbitol solution ($\times 400$).

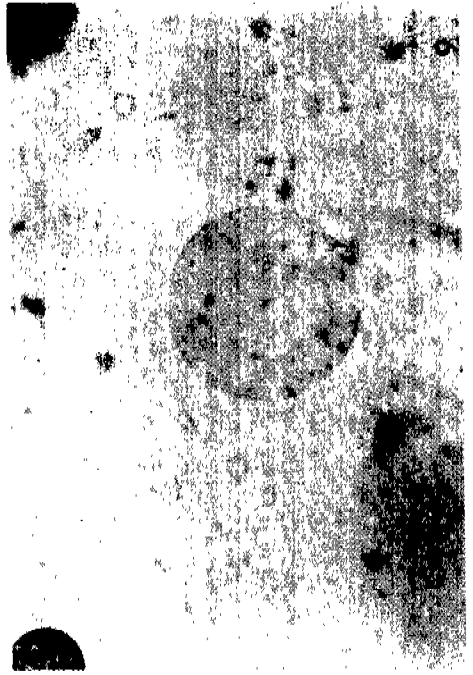


Fig. 9. Empty protoplast after losing its chloroplasts in 0.25M sorbitol solution ($\times 320$).

PART III



Fig. 10. Escape of chloroplasts from protoplast in low osmotic stabilizing solution ($\times 320$).



Fig. 12. Fusion between a few protoplasts.

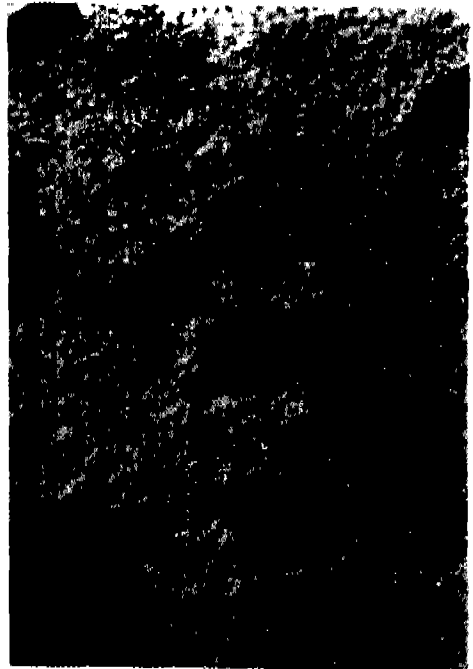


Fig. 11. Tobacco protoplast fusion between two protoplasts.



Fig. 13. Fusion between large and small cells.

PART W



Fig. 14. The early stage of protoplast fusion.



Fig. 15. Progress of fusion; 20 min. after the early stage (see Fig. 14.)

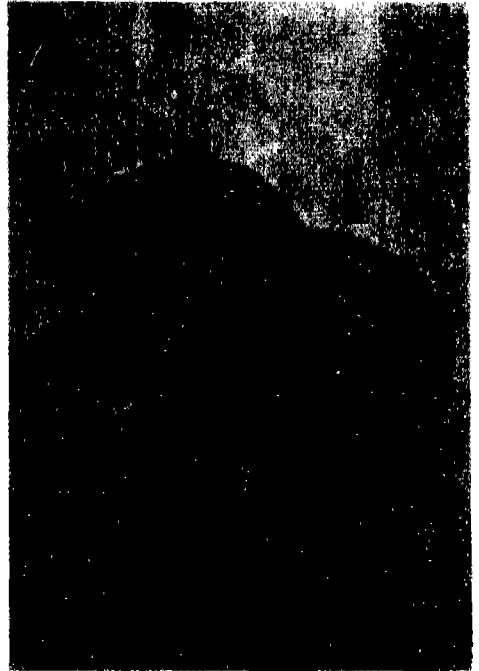


Fig. 16. A cultured protoplast undergoing the first cell division (X 320)



Fig. 17. Clusters of tobacco cells derived from a single protoplast at 1 week after plating (X 80)



Fig. 19. Colonies of tobacco cells at 18 days after plating.



Fig. 18. Tobacco protoplasts at 18 days after plating (x 80)

PEG를 이용하여 세포융합을 시도하면 Fig. 11에서와 같이 2개의 세포만이 융합되는 것도 있는 반면, Fig. 12와 같이 여러개의 protoplast가 한덩어리로 융합되는 경우가 있는데 융합당시의 조건에 따라 정도차가 있었다. Fig. 13에서 보는 바와 같이 때로는 protoplast의 크기가 아주 다른 protoplast가 융합되는 경우가 있다.

융합되는 과정은 제일 먼저 2개의 protoplast가 맞닿아야 하고 (Fig. 14 a) 그 후에 세포질이 이동하며 (Fig. 14 b) 두 세포사이의 세포막이 차차 없어지게 되어 하나의 융합된 세포로 된다. (Fig. 15)

융합된 세포는 Gamborg의 B-5배지에 접종하면 계속자라 colony를 이루었다. 한 종류의 protoplast를 B-5 배지에서 키우는 것을 조사한 결과 배양기에 넣은 후 수시간내에 1차 분열하며 (Fig. 16) 분열을 계속하여 18일이 경과한 때는 colony를 육안으로 볼 수 있었으며 (Fig. 17~19) chlorophyll도 계속 유지되었다. colony에서 다시 유식물이 출현하여 완전한 식물이 되는 과정은 현재 연구중에 있다.

참 고 문 헌

1. Burgess, J., and E. N. Fleming, *Planta* (Berl.), 118 ; 183-194(1974).
2. Carlson, P. S., H. H. Smith, and R. D. Dearling, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 69 ; 2292-2294(1972).
3. Cocking E. C., *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 23 ; 29-50 (1972).
4. Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima, *Exp. Cell Res.*, 50 ; 151-158 (1968).
5. Gamborg, O. L. J. Shyluk, and K. K. Kartha, *Plant Sci. Lett.*, 4 ; 285-292(1975)
6. Kao, K. N., and M. R. Michayluk, *Planta* (Berl.), 115 ; 355-367(1973).

7. Keller, W. A. and G. Meichers, Z. Naturforsch., 280 ; 737-741. (1978)
8. Kwack, B. H., and K. E. Park, Korean J. Bot., 12 ; 71-75(1969).
9. Melchers, G. and G. Labib., Molec. Gen. Genet., 135 ; 277-194(1974).
10. Melchers, G., M. D. Sacrtan, and A. A. Holder, Res. Commun., 43 ; 203-218(1978)
11. 長尾照義, 葉たばこ研究, 78 ; 70-72
12. Ruesin, K. A. W. Plant Physiol., 47 ; 192-195(1971)
13. Shenk, R. U., and A. C. Hildebrandt, Amer. J. Bot., 55 ; 731-735 (1972).
14. Takebe, I., Y. Otsuki, and S. Aoki, Plant Cell Physiol., 9:115-124 (1968)