

## 콩 原形質體內로의 담배 葉綠體 移入

車賢哲 · 曹聖昊 · 李光雄

(서울대학교 自然科學大學 植物學科)

## Incorporation of Tobacco Chloroplasts into Soybean Protoplasts

Cha, Hyeon Cheol, Sung Ho Cho and Kwang-Woong Lee

(Department of Botany, Seoul National University, Seoul)

### ABSTRACT

Chloroplasts isolated from tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Virginia 115) leaves have been transferred into protoplasts of soybean (*Glycine max* Merr. cv. Jangyeop) suspension-cultured cells with the help of polyethylene glycol (PEG). The increased yield in protoplasts of chloroplast uptake was depended upon the concentration of both PEG 4,000 and PEG 6,000. The highest yield (36%) occurred at 50% of both PEG, and the yield was decreased above this concentration. The rate of uptake with the incubation time was highest at one hour, then decreased. The process of the chloroplast uptake into the protoplasts was similar with that of a protoplast fusion, except forming invagination during uptake.

### 緒 論

高等 植物에서 有性生殖의 過程을 거치지 않고 새로운 雜種을 生成케 하는 것은 植物體, 특히 作物의 改良을 위한 植物育種學 및 生命工學에 있어서 매우 큰 關心의 대상이 되고 있다. 植物體의 品種 改良 技術은 突然變異에 의하거나 性週期를 이용하는 方法에 의한 것이 대부분이나, 만약 多樣的한 植物體 사이에서 遺傳情報를 移植 또는 移入하여 서로 交換할 수 있다면 이는 새로운 植物體를 획득하게 되는 무한한 可能性을 提法하게 될 것이다. 그러나 植物 細胞의 細胞壁은 遺傳物質 뿐만 아니라 細胞小器官 等の 移入을 阻害하는 根本的인 要因이 되어 왔던 바, Cocking(1960)에 의하여 많은 高等 植物의 組織 細胞로부터 特定 酵素液의 處理로써 成功的으로 裸出된 原形質體를 얻게 된 이후, 植物 細胞의 原形質

이 研究는 文敎部의 學術研究助成費의 支援으로 이루어진 것임.

體는, 단순한 原形質膜의 物理·化學의 特性(Ruesink, 1973)을 비롯하여, 細胞壁의 合成(Grout, 1975), 細胞小器官과 微生物體의 移入(Potrykus, 1975; Davey and Power, 1975), 雜種 形成(Nickell and Torrey, 1969; Carlson *et al.*, 1972; Melchers *et al.*, 1978) 등의 광범위한 연구에 이용되어 왔다.

植物 細胞의 遺傳物質을 體細胞의으로 變換시키는 데에는 몇 가지 接近 方法이 있다. 即 (a) 種內, 또는 種間의 細胞 融合(Constabel, 1976; Kao, 1977; Lee *et al.*, 1980), (b) 核, 葉綠體, mitochondria, 染色體 等の 原形質體內로의 移入, (c) 藍藻類, 細菌, virus 等, 微生物體의 原形質體內로의 移入, (d) 核酸의 原形質體, 分裂組織, 줄기, 子房 等에의 移入, (e) 遺傳子再組合 等の 方法을 생각할 수 있겠다.

이와 관련하여, 核內로의 DNA 移入(Ohyama *et al.*, 1977), 담배 原形質體內로의 DNA 移入(Uchimiya and Murashige, 1977), 菌類 原形質體內로의 *Azotobacter* 移植(Giles and Whitehead, 1976), 高等 植物 原形質體內로의 植物 核의 移入(Potrykus and Hoffmann, 1973; Binding, 1976) 등이 報告된 바 있으며, 葉綠體의 移入에 대하여는 高等 植物 原形質體內로의 藻類 葉綠體 移入(Bonnett and Eriksson, 1974)과 菌類 原形質體內로의 高等 植物 葉綠體 移入(Vasil and Giles, 1975) 등의 연구가 알려져 있을 뿐으로 활발한 연구는 이루어지고 있지 않은 실정에 있으나, 葉綠體는 원형질체의 融合體를 認知함에 있어서 뚜렷한 marker 를 제공하고(Kao *et al.*, 1974), 葉綠體의 Fraction I 단백질이 hybrid 세포를 認知하는데 사용되며(Kung *et al.*, 1975), 또한 葉綠體의 구조적 변화는 種間 융합체내 incompatibility 의 표현으로서 설명(Fowke *et al.*, 1977) 될 수 있으므로 지대한 관심의 대상이 되고 있는 것이다.

本 研究는 高等 植物의 原形質體內로 高等 植物의 葉綠體를 移入시키고자, 콩(*Glycine max* Merr. cv. Jangyeop)의 懸濁培養 細胞로부터 原形質體를 分離하고 여기에 fusogenic agent, PEG를 處理하여, 담배의 잎에서 分離한 葉綠體를 첨가, 혼합하면서 PEG 濃度와 處理時間의 最適 條件을 구명하고 아울러 葉綠體의 移入過程을 光學 및 電子顯微鏡으로 관찰하고자 한다.

#### 材料 및 方法

**原形質體의 分離.** 콩(*Glycine max* Merr. cv. Jangyeop)의 callus로부터 1주일 간격으로 懸濁培養 細胞를 1-B5 培地(Gamborg *et al.*, 1968)에 繼代培養하여 2~4 일된 細胞 懸濁液을 原形質體 획득의 材料로 사용하였다. 懸濁培養은  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 200 lux 의 連續光下에서 reciprocal shaker(80 rev/min)로 행하였으며, 原形質體의 分離는 細胞 懸濁液에 酵素液[*cellulase* (Onozuka R-10) 2.5%, *hemicellulase*(Sigma) 2.0%, *sorbitol* 100 mg/ml]을 加하여  $25^{\circ}\text{C}$ , 暗所에서 4~5時間동안 30 rev/min 으로 振盪한 다음 6 겹의 nylon filter 로 거른 후, 100 g 에서 3 分間 遠心分離하여 얻었으며, 이것을 原形質體 培養液에 다시 懸濁시켜 사용하였다.

**葉綠體의 分離.** Environmental growth chamber [ $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (낮)~ $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (밤), 3,000 lux, 相對濕度 60%, 光週期 16 時間]에서 키운 담배(*Nicotiana tabacum* L. cv. Virginia 115)의 어린 잎(길이 10~12 cm)을 材料로 사용하여 Jensen and Bassham(1966)과 Vasil and Giles (1975)의 방법에 따라 葉綠體를 分離하였다. 10 g 의 잎을 tap water 로 세척한 후 葉脈을 제거하고 2~3 mm 되게 잘게 잘라 미리 차게 한 分離液에 넣어 waring blender 로 4 秒間 高

速으로 마쇄한 다음 6겹의 gauze 로 濾過하여 1,000 g 에서 2 分間 遠心分離하였다. 沈澱物을 分離液에 懸濁시켜 葉綠體 試料로 사용하였다. 이 試料의 葉綠體 濃度는  $1.1 \times 10^7$ /ml 로 하였다.

原形質體內로의 葉綠體 移入 誘導. 上記 諸 過程에 의하여 얻어진 原形質體 懸濁液( $1.6 \times 10^5$  protoplasts/ml)과 葉綠體 懸濁液( $1.1 \times 10^7$  chloroplasts/ml)을 同量 混合하여 2 ml 를 만들고, 여기에 polyethylene glycol(PEG) 溶液(0.1 M glucose, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.7 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 5.5 의 溶液에 PEG 4,000 과 PEG 6,000 을 각각 添加하여 만들었다)을 添加한 후, 잘 섞는다.

1 時間後 이 혼합액을 2 ml 의 洗滌液(0.4 M glucose, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.7 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 5.7)으로 稀釋한 뒤 다시 3 ml 의 洗滌液을 添加하여 5 分間 放置한 다음, 700 rpm 으로 3 分間 遠心分離하였다. 葉綠體가 移入된 原形質體의 數는 Levy hemacytometer 로 測定하였다. 葉綠體 移入에 따른 현미경적 관찰도 아울러 수행하였다(Fowke *et al.*, 1977).

### 結果 및 考察

Jensen and Bassham(1966)과 Vasil and Giles(1975)의 방법에 의하여 담배의 잎에서 葉綠體를 분리한 결과, Plate 1-①에서 볼 수 있는 바와 같이 80~90%의 완전한 葉綠體를 얻을 수 있었다. 타원형인 이 葉綠體는 그 형태와 활성이 4 시간 정도 유지되었다. Luigi *et al.* (1980)은 귀리의 잎에서 分離한 엽록체가 92%라는 높은 NADP-GADPH의 활성을 보였다고 報告한 바 있으며, 원형 질체에서 분리된 葉綠體는 비교적 안정된 환경을 가지므로 그 활성이 높고 오래 가는 것으로 생각되었다.

葉綠體를 가지지 않고 있는 세포로서 콩의 현탁배양 세포를 이용하여, 원형질체를 분리한 결과,  $14 \mu\text{m} \sim 90 \mu\text{m}$ 의 다양한 크기의 직경을 갖는 원형질체를 얻었는데, 그 대부분은  $40 \mu\text{m}$  內外의 크기를 가지고 있었다(Plate 1-②). 원형질체는 液胞를 가지고 있었으며 細胞質流動이 활발한 상태로 있음이 확인되었고 엽록체는 가지고 있지 않았다.

葉綠體를 原形質體內로 uptake(移入)시키기 위하여 fusogenic agent 로 PEG 4,000 과 PEG 6,000 을 사용한 결과, 엽록체의 uptake 率은 2 種의 PEG 에서 유사하게 나타났으므로 PEG 4,000 을 사용한 결과만을 보면 Fig. 1 에 나타낸 바와 같다. Fig. 1 에 의하면 PEG 4,000 의 농도 30% 에서 葉綠體를 uptake 한 원형질체의 비율은 18.5%, 40%의 농도에서는 22.5%이었으며, 50% PEG 농도에서는 36.0%로서 가장 높게 나타났다. 이 이상의 농도인 60%의 PEG 농도에서는 31.5%로서 葉綠體 移入率이 낮아짐을 알 수 있었다.

Bonnett and Eriksson(1974)은 당근의 원형질체에 *Vaucheria*의 葉綠體를 移入하였는데 이들이 사용한 fusogenic agent 는 PEG 1,500 으로써 56%의 농도였고 uptake 率은 16%였다. 이 경우 藻類의 엽록체가 고등 식물의 원형질체내로 移入하는 率은 16% 정도였으나 Vasil and Giles(1975)는 고등 식물인 시금치의 엽록체가 菌類인 *Neurospora crassa* 의 원형질체내에 移入되는 率은 약 50%였다고 보고하였다. 한편, Nagata *et al.* (1979)은 PEG 4,000 을 50% 농도의 처리로써 원형질체 融合率이 40%라고 보고한 바 있다. 본 실험의 결과는 PEG 4,000 의 농도 50~60%로써 30% 이상의 비교적 높은 葉綠體 移入率을 나타냈는데, 이는 매우 바람직한 결과라고 볼 수 있겠다.

Fig. 2 는 50% 농도의 PEG 4,000 으로써 엽록체 移入이 일어나는데 소요되는 처리시간을

나타내고 있다. 1~120 분간에서 30 분의 간격으로 移入率을 조사했는 바, 처리 1 분후에 18%, 30 분후에는 33%이었고, 60 분후에는 35%로 가장 높았으며, 이 후 점차 낮아져서 120 분에서는 18%로 되었다. 그리고 120분 이후에는 급격히 감소되었음도 관찰된 바 있다.

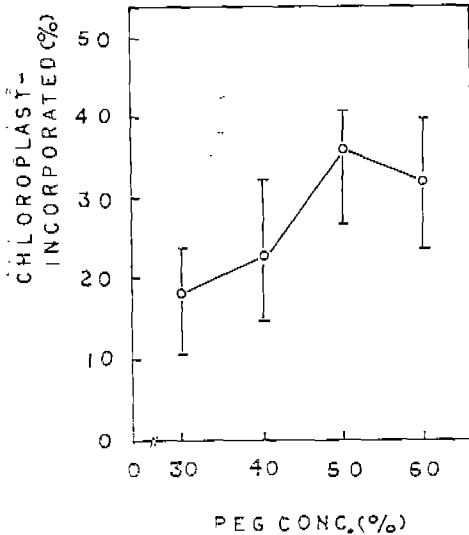


Fig. 1. Effect of concentration of PEG 4,000 on the tobacco chloroplast incorporation into soybean protoplasts.

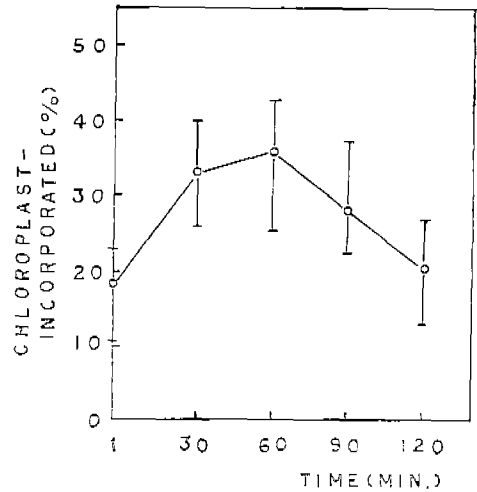


Fig. 2. Effect of incubation time on the tobacco chloroplast incorporation into soybean protoplasts during 50% PEG 4,000 treatment.

PEG 6,000을 40~60%의 농도로 5~10 분간의 처리로 고등식물의 엽록체를 齒類의 원형질체에 이입시킨 경우(Vasil and Giles, 1975)나, 담배의 엽록체를 담배의 원형질체에 이입시키는 경우에서 30%의 PEG 6,000과 20%의 dextran T<sub>40</sub>을 동시에 써서 20 분간 처리한 후 서서히 이들을 희석시켜 엽록체 이입을 획득한 보고(Mastrangelo, 1979)도 있다. 한편, 90 분 이상의 경우 移入率이 저하되는 것은 PEG가 원형질체와 엽록체의 膜에 불리한 영향을 준 것으로 사료된다.

葉綠體가 原形質體內로 들어가는 것은 원형질체 융합의 機作과 같이 PEG와 Ca<sup>2+</sup>이 엽록체의 막과 원형질체막 사이에 連結部位(bridge)를 형성하여 接着하고 이어 원형질체 막의 陷入이 일어나서 이입이 이루어지는 것으로 Kao(1980)는 설명하였는데 본 실험에서도 이와 유사한 현상을 볼 수 있었다. 즉, 엽록체는 원형질체의 막에 접촉하고(Plate 1-③, ④), 이후 합입이 일어나(Plate 2-⑥), 엽록체를 합입한 원형질체는 원형질체막의 물출현상을 나타나게 된다(Plate 1-⑤). 이후 이들은 원형질체속에 埋沒되게 된다(Plate 2-⑦). 이리하여 엽록체를 이입한 원형질체는 처음부터 엽록체를 포함하고 있는 葉肉細胞의 원형질체와 같이 보인다(Plate 2-⑦, ⑧). Plate 2-⑧a, b는 엽록체를 이입한 원형질체를 광학현미경에서 焦點을 달리하여 본 것이다. 이로써 엽록체는 원형질체 속에 완전히 들어가 있는 것임을 알 수 있다.

이와 같은 광학 및 전자현미경적 관찰 결과는 Vasil and Giles(1975)의 연구 결과와 거의 일치하는 것으로 나타났다. 앞으로는 이들 엽록체를 移入한 원형질체의 特性에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 思料된다.

## 摘 要

콩(*Glycine max* Merr.)의 현탁배양 세포로부터 cellulase 등의 酵素溶液을 처리하여 原形質體를 분리하고, 여기에 담배 잎에서 분리한 葉綠體를 PEG(polyethylene glycol) 4,000 과 6,000 을 처리, 移入시켰다. 移入率은 PEG 濃度가 증가함에 따라 높아져서 50% 농도에서 36%로 가장 높게 나타났으며 그 이상의 농도에서는 오히려 감소하였다. 또 PEG 처리시간에 따른 移入率은 60分 처리시에 35%로 가장 높았으며 이 후 급격히 감소하였다. 葉綠體가 原形質體內로 移入되는 과정은 原形質體 融合의 방식으로 接觸된 후 陷入에 의하여 이루어지는 것으로 관찰되었다.

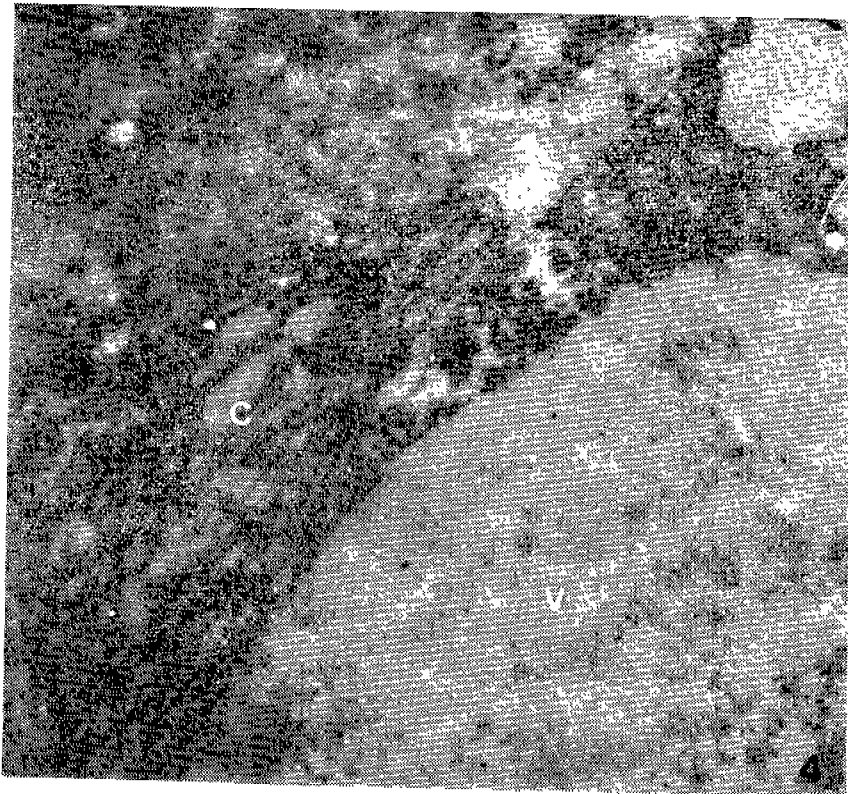
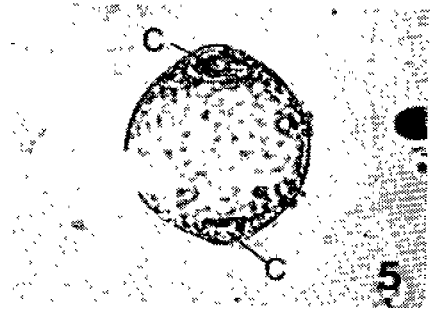
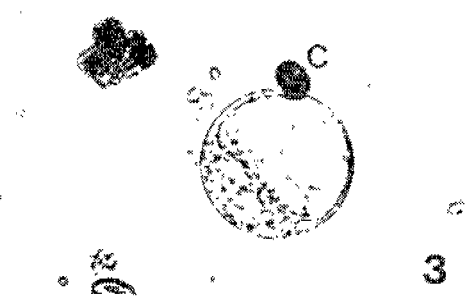
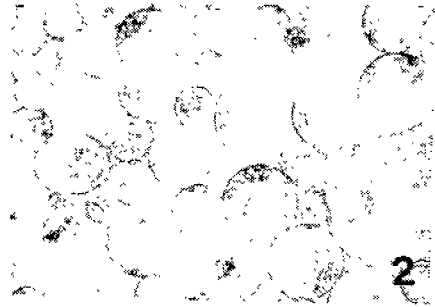
## REFERENCES

- Binding, H. 1976. Somatic hybridization experiments in solanaceous species. *Mol. Gen. Genet.* **144** : 171~175.
- Bonnett, H. T. and T. Eriksson. 1974. Transfer of algal chloroplasts into protoplast of higher plants. *Planta* **120** : 71~79.
- Carlson, P. S., H. H. Smith and R. D. Pearing. 1972. Parasexual interspecific plant hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69** : 2292~2294.
- Cocking, E. C. 1960. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature* **187** : 927~929.
- Constabel, F. 1976. Somatic hybridization in higher plants. *In Vitro* **12** : 743~748.
- Davey, M. R. and J. B. Power. 1975. Polyethylene glycol-induced uptake of microorganisms into higher plant protoplasts: an ultrastructural study. *Plant Sci. Lett.* **5** : 269~274.
- Fowke, L. C., F. Constabel and O. L. Gamborg. 1977. Fine structure of fusion products from soybean cell culture and pea leaf protoplasts. *Planta* **135** : 257~266.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **50** : 151~158.
- Giles, K. L. and H. Whitehead. 1976. Uptake and continued metabolic activity of *Azotobacter* within fungal protoplasts. *Science* **193** : 1125~1126.
- Grout, B. W. W. 1975. Cellulose microfibrils deposition at the plasmalemma surface of regenerating tobacco mesophyll protoplast: a deep etch study. *Planta* **123** : 275~282.
- Jensen, R. G. and J. A. Bassham. 1966. Photosynthesis by isolated chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56** : 1095~1101.
- Kao, K. N. 1977. Chromosomal behavior in somatic hybrids of soybean-*Nicotiana glauca*. *Mol. Gen. Genet.* **150** : 225~230.
- Kao, K. N. 1980. Expression of foreign genetic material through protoplast fusion, through uptake of prokaryotic cells and cell organelles. *In Plant cell cultures: Results and perspectives*, F. Sala, B. Parisi, R. Cella and O. Ciferri (eds.), pp.195~205. Elsevier, Amsterdam.
- Kao, K. N., F. Constabel, M. R. Michayluk and O. L. Gamborg. 1974. Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells. *Planta* **130** : 215~227.
- Kung, S. D., J. C. Gray, S. G. Wildman and P. S. Carlson. 1975. Polypeptide composition of Fraction

- I protein from paraxenial hybrid plants in the genus *Nicotiana*. *Science* **187** : 353~355.
- Lee, K.-W., S. H. Cho and H. C. Cha. 1980. The isolation and fusion of pea and barley mesophyll protoplasts. *Korean J. Bot.* **23** : 49~54.
- Luigi, F., De Fillippis, R. Hampp and H. Ziegler. 1980. Protoplasts as a mean of studying chloroplasts development *in vitro*. *Plant Physiol.* **66** : 1~7.
- Mastrangelo, I. A. 1979. Protoplast fusion and organelle transfer. In *Nicotiana*--Procedures for experimental use, R. D. Durbin (ed.), pp. 65~73. USDA, Washington, D. C.
- Melchers, G., M. D. Sacristan and A. A. Holder. 1978. Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Res. Commun.* **43** : 203~218.
- Nagata, T., H. Eibl and G. Melchers. 1979. Fusion of plant protoplasts induced by a positively charged synthetic phospholipid. *Z. Naturforsch.* **34c** : 460~462.
- Nickell, L. G. and J. G. Torrey. 1969. Crop improvement through plant cell and tissue culture. *Science* **166** : 1068~1070.
- Ohyama, K., L. E. Pelcher and D. Horn. 1977. DNA binding and uptake by nuclei isolated from plant protoplasts. *Plant Physiol.* **60** : 98~101.
- Potrykus, I. 1975. Uptake of cell organelles into isolated protoplasts. In *Modification of the information content of plant cells*, R. Markhan, D. R. Davies, D. A. Hopwood and R. W. Horne (eds.), pp. 169~179. Elsevier, Amsterdam.
- Potrykus, I. and F. Hoffmann. 1973. Transplantation of nuclei into protoplasts of higher plants. *Z. Pflanzenphysiol.* **69** : 287~289.
- Ruesink, A. W. 1973. Surface membrane properties of isolated protoplasts. *Colloq. Intern. Paris, Centre Natl. Rech. Sci.* **212** : 41~49.
- Uchimiya, H. and T. Murashige. 1977. Quantitative analysis of the fate of exogenous DNA in *Nicotiana* protoplasts. *Plant Physiol.* **59** : 301~308.
- Vasil, I. K. and K. L. Giles. 1975. Induced transfer of higher plant chloroplasts into fungal protoplasts. *Science* **190** : 680.

(1982. 12. 9. 接受)

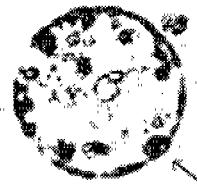
PLATE 1



## PLATE 2



8a



8b

## Explanation of Plates

## Plate 1

- ① Chloroplasts of *Nicotiana tabacum* L. cv. Vir. 115 isolated from leaf mesophyll cells. ( $\times 550$ )
- ② Protoplasts of *Glycine max* Merr. cv. Jangyeop isolated from suspension-cultured cells. ( $\times 250$ )
- ③ Tobacco chloroplasts adhering to a soybean protoplast after treatment with PEG 50%. ( $\times 560$ )
- ④ An electron micrograph showing a chloroplast(C) adhering to membrane of soybean protoplast. ( $\times 5,400$ )
- ⑤ Tobacco chloroplasts taken into the protoplast cytoplasm and causing a slight protrusion of the plasmalemma after treatment with PEG. ( $\times 580$ )

## Plate 2

- ⑥ A tobacco chloroplast(C) entering soybean protoplast (P), which formed an invagination, after treatment with PEG. ( $\times 5,400$ )
- ⑦ Tobacco chloroplasts 60 min after treatment with PEG having themselves in the protoplast. ( $\times 560$ )
- ⑧ Focal plane at(a), and focal plane above(b) chloroplasts incorporated into a protoplast. The regions surrounding the chloroplast are arrowed. ( $\times 560$ )