韓作誌 27(2)147~154(1982) KJCS 27(2)147~154(1982)

植物原形質體의 分離, 培養 및 融合에 관한 硏究

崔祥周*·孫世鎬*·鄭元采**

Studies on the Isolation, Culture and Fusion of Protoplasts from Plant Mesophyll and Cells Cultured *in vitro*

Choi, S. J.*, S. H. Son* and W. C. Chung**

ABSTRACT

This study was conducted to investigate an effective method of protoplast isolation, the plating efficiency for cell division, and fusion of plant protoplasts by polyethylene glycol for somatic hybridzation. The effectiveness of protoplast isolation was different with the various enzyme concentrations, but, in the protoplast isolation from tobacco mesophyll, the enzyme solution with 0.5% macerozyme and 2.0% cellulase was very effective. The protoplast isolation from callus cultured *in vitro* for a long period was not obtained in any of the enzyme solution used. Protoplasts divided actively at cell densities above 10^4/ml and at 25°C under 12 hr illumination by inflorecient light (150 Lux), regardless of presence of agar. The highest frequency of protoplast fusion was obtained after treatment with a solution of 0.33 M polyethylene glycol 1500.

緖 言

植物組織培養은 近年에 큰 進展을 이루어 細胞膜이 除去된 原形質體의 培養과 融合에 關한 硏究가 대단히 주목을 끌게 되었다. 細胞膜이 除去된 原形質體는 單細胞로서 Totipotency를 갖고 있으며 細胞融合 및 高分子 粒子의 導入이 容易하다고 한다.[18] 高等植物의 組織과 培養細胞를 酵素로 處理해서 原形質體分離 技術은 1960年代에 急速히 進展되었다. 1900年代初期에는 原形質體를 機械的으로 抽出했지만 Cocking[3]은 처음으로 酵素處理로 토마토 根端組織으로부터 原形質分離를 成功시킨 후 現在에는 植物體의 여러 組織으로부터 原形質體를 얻을 수 있게 되었다.[2,20] 그러나 通導組織이나 木部組織은 2次細胞膜이 잘 發達되어 있어 原形質體分離가 어려우며 分裂이 旺盛한 葉肉組織이나 培養細胞에서 原形質體를 얻고 있다.

Nagata[15]에 依하면 最近 分離酵素로 많이 使用되고 있는 MacerozymeR-10이나 Cellulase Onozuka보다 適用範圍가 넓은 酵素를 發見하였는데 이는 Pectoriase Y-23으로 지금까지 細胞分離가 困難하였던 材料로부터 分離를 可能케 하였으며 有効한 細胞分離能力은 Macerozyme R-10의 100倍 以上이었다고 한다.

植物組織으로부터 原形質體의 分離方法은 組織에서 單細胞를 分離해서 이것을 原形質體로 하는 2段階法과 組織에서 直接 分離시키는 一段階法이 있는데 材料로 하는 葉이나 Callus의 生育段階 및 發酵處理方法에 따라 다른 경우가 있다고 한다.[18]

담배葉內에서 分離된 原形質體가 細胞膜이 再生되어 繼續 分裂을 行하는 能力을 갖고 있다는 것을 原形質體 培養을 通하여 처음으로 증명되었으며[16] 그 후 培養條件을 改良해서 器官分化까지 誘導해서 植物體를 再生시키는 일도 可能하게 되었다.

* 韓國人蔘煙草硏究所, ** 忠北大學校 農科大學.
* Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Suweon 170, ** Chungbuk National University, Dept. of Agronomy, Cheang Ju 310, Korea.

葉肉細胞의 Colony의 形成率은 細胞濃度에 따라 다르며 原形質體 分裂時 光은 培養初期에 500Lux程度의 弱光下에서 培養하는 것이 Colony形成이 좋다고 한다.[11]

植物原形質體의 細胞融合은 츄립原形質體에서 融合이 觀察된 以後 細胞融合에 關心을 集中하게되었다. Power[19]는 高濃度의 $NaNO_3$를 담배植物에서 分離된 原形質體에 處理하면 融合이 많이 일어난다고 하였으며 Keller와 Melckers[11]는 $NaNo_3$代身 High pH－High Ca條件下에 原形質體를 處理할 경우 高率의 融合이 發生된다고 하였다. 또한 Kao 等[9]은 分子量 1540 또는 1400의 PEG高濃度(33% wt／wt) 溶液을 原形質體에 處理하면 相互接着이 일어나서 PEG를 세척하는 過程에서 高率의 細胞融合이 일어난다고 하고 있다. 이外에도 PEG에 依해 Petunia屬, Daucus 屬, Nicotiana屬 等에 使用되어 植物體 再生에까지 이루어졌다.[5] Nagata[15]는 重合度 300－500의 PVA 溶液에 原形質體를 處理할 경우 PEG溶液과 同一하게 原形質體間에 相互接着이 일어나서 High pH－High Ca 培地로 PVA를 세척하는 과정에서 高率의 細胞融合이 일어난다고 하였다.

따라서 이러한 原形質의 培養 및 融合은 植物學者들의 關心을 끌게 되어 形質發現, 形成能形成의 基礎的 硏究의 手段으로서 硏究되어 왔으며 育種的인 面에서는 異種 異屬間의 交雜이 不可能한 組合에 있어서도 體細胞雜種의 育成이 成功된 바 있다.[6, 13, 17]

本實驗은 原形質體의 分離方法, 培養 및 細胞融合에 關한 基礎資料를 얻어 體細胞育成에 活用하고저 行하였던 바 그 結果를 報告하고자 한다. 本實驗을 위해 物心兩面으로 協力과 助言을 해주신 東京大學 工學部 內田安三教授任과 兒玉樣에게 衷心으로 感謝를 드립니다.

材料 및 方法

1. 原形質體의 分離：本實驗에 使用된 植物原形質體의 分離材料는 Xanthinc(*Nicotiana tabacum*) 완두, 박하葉과 당근의 根端組織 및 담배(SD－6S2)와 大豆의 Callus를 利用하였다.

原形質體의 分離材料中 葉의 採取는 多少 葉이 시든 것을 따서 70%의 알콜에 15～30秒, 2%의 次亞鹽素酸 溶液에 25秒 침지 시킨 후 물로 세척(4～5回)後, 表面의 水分을 멸균된 여지로 除去하였다. 효소처리는 Cellulase와 Macerozyme이 含有된 Mannitol液을 濾過器(Membranfilter)에 通過시켜 멸균 후 酵素 10ml當 試料1g을 注入하여 水槽中에 Callus는 10ml當 6g(F.W.)를 處理하였다. 原形質體의 分離方法은 2段階法과 1段階法을 利用하였으며, 2段階法은 表皮가 除去된 葉의 細胞를 遊離시키기 위해 Macerozyme를 15분 간격으로 4回 處理한 후 分離된 柵狀細胞의 細胞膜을 除去시키기 위해 10ml의 Cellulase를 注入시켜 處理하였다. 효소처리후 나이론망(38μ)으로 細胞殘砂를 걸러낸 후 遠心分離하여 原形質體를 分離하였다(rpm 1000, 5分). 1段階法은 細胞解離와 細胞膜 除去가 同時에 이루어지는 方法으로 Pectinase와 Cellulase가 含有된 Mannitol 溶液에 材料를 注入하여 2段階法과 同一하게 處理하였다.

2. 原形質體 培養：培養에 利用된 植物은 Xanthinc로서 葉肉細胞에서 分離된 原形質體를 培養培地로 최후로 遠心分離시킨 후 原形質體의 현탁액을 Nagata와 Takebe의 培養培地에 一定濃度로하여 페트리접시에 Plating하였다. 0.6% Aga가 含有된 培養培地는 45℃로 維持시켜 利用하였으며 細胞濃度의 測定은 Hemacytometer로 하였다. 培地注入까지 모든 作業은 無菌室에서 行하였으며 濾過器 피펫 및 硝子類는 乾燥機에서 滅菌處理하여(125℃, 30分) 使用하였다.

3. 原形質體 融合：融合에 利用된 植物은 담배(Xanthi nc)와 완두의 葉肉細胞에서 分離된 原形質體를 利用하였으며 融合은 Polyethylene glycol(PEG)溶液을 使用하였다. 植物細胞로부터 分離된 原形質體 현탁액 2ml을 페트리접시(6cmϕ)에 定置시킨 後 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, KH_2PO_4, Sucrose가 含有된 PEG 溶液 2ml을 注入하여 30分間 30℃ 2500Lux 恒溫室에 靜置培養後 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 50mM이 含有된 0.7 M Mannital溶液으로 5回 遠心分離(500 rpm)후 PEG 溶液을 除去시켰다. 30分後 현미경으로 관찰하여 融合率을 調査하였다.

結果 및 考察

1. 原形質體의 分離

植物細胞는 견고한 細胞膜이 있어 이를 細胞融合時 除去시키지 않으면 안되는데 酵素種類와 處理方法, 處理時間, 恒温 水槽의 振動數 等에 따라 많은 差異가 있는데 이를 處理別로 나타낸 結果는 表 1과 같다.

一般的으로 담배植物에 있어서 原形質體의 分離는

Table 1. Isolation of protoplast from tobacco mesophyll

Enzyme sol. (%)		pH	In incubator			Yield of protoplast
			Temp. (°C)	Time (hr)	Shaking/min	
A	sol.[a]	5.8	25	1.0	slow	+
B	sol.[b]	5.2	36	2.0	slow	
A	sol.	5.8	25	0.8	60	+
B	sol.	5.2	37	2.0	40	
A	sol.	5.8	25	0.8	25	++
B	sol.	5.2	37	2.0	–	
Macerozyme	0.5					
K D S	0.5	5.5	25	3.0	–	++
Cellulase	2.0					
Mannitol	0.7 M					

a : A sol. Macerozyme 0.5, KDS 0.5, Mannitol 0.7 M
b : B sol. Cellulase 2.0 Mannitol 0.7 M
+ : Fair, ++ : good

2段階法이 많이 利用되고 있으나[1,7,18] 實驗結果 振動을 行하지 않고 얻을 수 있는 1段階法도 Nagao[17]가 行한 바와 같이 活性 있는 原形質體를 얻을 수 있었다. (Fig. 1-C)

振動數에 따라 細胞膜 分離는 振幅 5cm, 分當 120回가 적당하다고 하였으나[16,18] 2段階法으로 原形質體를 分離한 結果 진동수가 아주 낮은 경우보다 A液에 細胞를 解離시킬 경우 0.8時間에 25回 處理가 좋은 結果를 얻을 수 있었다(Fig 1-A). 그 후 B液에 處理할 경우 振動을 行하는 것보다 恒溫水槽에 靜置하는 경우가 좋은 結果를 얻을 수 있었다. 이는 分離된 細胞가 振動數가 많을 수록 原形質膜이 쉽게 파괴되는 것으로 생각되며 또한 高滲透壓下에 있어서 原形質 分離가 일어난다고 볼 수 있다. 따라서 담배葉肉細胞에서 가장 活性 있는 原形質體를 얻기 위해서는 原形質分離가 일어나기 쉬운 2段階法보다 1段階法이 安全한 原形質體를 얻을 수 있을 것으로 보인다.

완두葉肉表皮를 除去하여 原形質體를 分離한 結果는 表 2와 같다. 완두 植物의 原形質體의 分離는 담배植物과는 달리 2段階法은 活性 있는 原形質體를 얻을 수 없었다. 이것은 연약한 완두葉肉細胞를 分離시키기 위해 Macerozyme으로 4回 處理時 原形質分離가 쉽게 일어나기 때문으로 생각된다.

酵素處理가 끝난 완두葉肉의 原形質體는 一般植物이나 Callus에서 分離된 原形質體와 같이 培地가 높은 張力을 갖고 있는 物理的 理由 때문에 完全한 球型의 原型質體를 얻을 수 있었다(Fig 1-D). 1段階法中 Cellulase 2%, Macerozyme 0.5%가 含有된 溶液에 25℃, 1時間, 12回 振動하는 區가 가장 良好한 結果를 얻을 수 있었는데 Constabel[12]이 行한 바와 同一하였고 Weber[22]도 1段階法으로 活性 있는 原形質體를 얻는 바와 같이 완두 植物에 있어서는 酵素液 處理時 振動數가 強할 수록 球型의 原形質體를

Table 2. Isolation of protoplast from pea mesophyll

Enzyme sol (%)		pH	In incubator			Yield of protoplast
			Temp. (°C)	Time (hr)	Shaking/min	
Macerozyme	0.5			0.7	–	+
		5.5	25°C			
Cellulase	2.0			1.0	40	++
				1.0	12	+++
Mannitol	0.7 M			1.5	40	+
A sol.		5.8	25	1.0	60	±
B sol.		5.2	35	2.0	–	

A sol : Macerozyme o.5, KDS 0.5, Mannitol 0.7 M
B sol : Cellulase 2.0, Mannitol 0.7 M
+++ : very good, ++ : good, + : Fair, ± : poor

얻기가 困難할 것으로 보인다.

담배 Callus로부터 原形質體의 分離結果는 表 3과 같다. A液과 B液을 달리하여 處理한 區가 同時에 處理한 1段階區보다 良好한 結果를 얻을 수 없었다.

1段階區中 효소 농도가 높은 區가 좋은 結果를 얻을 수 있었는데(Fig 1-B) Yamada가 담배 수조직에서 培養한 Callus를 利用하여 原形質體를 分離한 結果와 同一하였다. 一般的으로 Callus를 植物의 一部位에서 採取하여 長期間 繼代培養해온 Callus를 材料로 할 경우 細胞가 老化되어 活性이 떨어져 原形質體 分離에 영향을 미칠 것으로 보인다. 老化된 Callus로부터 原形質體의 分離가 어려운點은 繼代培養할 경우 培地內 物質도 영향을 미칠 것으로 보이며 따라서 分離時 強力한 解離作用을 할 수 있는 他酵素를 併行하거나 濃度를 달리하여 處理해야만 좋은 結果를 얻을 수 있을 것으로 보인다.

담배나 완두 以外의 植物에서 原形質體를 分離한 結果는 表 4와 같다. 당근의 根端細胞組織을 利用하여 原形質體를 分離한 바 Kameya[10]가 行한 바와 같이 1段階法中 Macerozyme 0.5%, KDS 0.5%, Cellulase 5%가 Mannitol 0.7 M에 含有된 區가 活性있는 原形質體를 얻을 수가 있었다(Fig 1-E). 따라서 葉肉에서보다는 根組織에서 原形質體를 分離시키기 위해서는 Cellulase濃度를 4% 以上 處理하여야만 細胞膜 除去가 可能할 것으로 思料된다.

효소 處理時間에 있어서도 恒温槽에 2時間 35℃

Table 3. Isolation of protoplast from tobacco callus cultured *in vitro*

Enzyme sol. (%)				pH	In incubator			Yield of Protoplast		
	a)	b)	c)		Temp. (°C)	Time (hr)	Shaking/min	a)	b)	c)
Cellulase	2.0	3.0	5.0							
Macelozyme	0.5	1.0	2.0	5.5	35	1.5	40	±	±	++
K D S	0.5	0.5	0.5							
(Mannitol	0.7 M)									
A sol.				5.8	25	0.5	60		±	
B sol.				5.2	35	2.0	20			
A sol.				5.8	25	0.8	30		±	
B sol.				5.2	35	4.0	20			

A sol. Macerozyme 0.5 + potassium dextran sulphate (KDS) 0.5 (Mannitol 0.7 M)
B sol. Cellulase 2.0
± : poor ++ : good

Table 4. Isolation of protoplast from some plant mesophyll and soybean callus cultured *in vitro*

Source	Enzyme sol. (%)		pH	In incubator			Yield of protoplast
				Temp (°C)	Time (hr)	Shaking/min	
Spinach	A sol		5.5	25	1.0	–	±
Carrot[b]	MK*	2.0 C					–
	MK	3.0 C	5.2	37	2.0	50	+
	MK	4.0 C					++
	MK	5.0 C					++
Papermint[a]	A sol.		5.5	35	2.0	20	+++
					3.0	80, 45	–
Soybean[c]	C sol.		5.2	31	3.0	20	–
Soybean[c]	D sol.		5.8	25	0.5	20	–
	E sol.		5.2	36	2.0	20	

* MK, C : Macerozyme 0.5 KDS 0.5 Cellulase
A sol. : Macerozyme 0.5 Cellulase 2.0 Mannitol 0.7M
C sol. : Macerozyme 1.0 Cellulase 5.0 Hemicellulase 5.0 Mannitol 0.6M
D sol. : Macerozyme 0.5 KDS 0.5 Mannitol 0.7M
E sol. : Cellulase 2.0 Mannitol 0.7M
a : Mesopyll b : Epidemal c : Callus

로 50回 振動이 좋은 結果를 얻을 수 있었으나 Kameya는 15時間 靜置 培養하여 좋은 結果를 얻었는데 이는 時間이 오래 所要되어 培養時 活性度에 큰 영향을 미칠 것으로 보인다.

박하의 葉內 原形體分離는 振動數 20回로 處理한 區가 良好한 結果를 얻을 수가 있었는데(Fig 1-F) 완두葉肉 細胞로부터 分離와 同一하였다. 大豆의 葉肉細胞로부터 原形質體의 分離는 現在 利用中인 酵素液處理로는 良好한 分離가 어려워 Callus로부터 原形質體 分離方法이 많이 利用되고 있다.[20] 大豆의 Callus로부터 原形質體分離는 長期間 培養으로 細胞의 活性이 떨어져 효소의 농도를 높게 하여 處理하거나 1段階 및 2段階法을 適用시켜도 좋은 結果를 얻을 수 없었다. 따라서 大豆의 Callus로부터 原形質體의 分離는 培地條件 酵素濃度, 培養期間 等에 따라 差異가 있을 것으로 보이며 強力한 分離能力을 갖는 酵素(Pectoriase Y-23)을 處理한다면 效率的인 原形質體를 얻을 수 있을 것이다. 따라서 大豆의 Callus 로부터 分離는 培養期間이 짧고 老化되지 않는 材料를 利用하여야 하며, 老化된 Callus로부터 原形質體가 分離되었어도 活性度가 떨어질 것으로 思料된다.

2. 原形質體의 培養

植物 原形質體의 培養은 담배 葉肉細胞에서 分離된 原形質體의 현탁액을 Nagada와 Dakebe 培地에 2500 Lux, 25℃로 維持된 恒温室에 培養한 結果는 表 5와 같다.

담배 原形質體의 培養은 細胞濃度가 10^3 以上/ml이어야 可能하였고 1次分裂은 3日後부터 시작되어 繼續分裂이 일어나 Colony를 3週後에 確認할 수 있었다[16] (Fig 2, A-F). 10^2/ml에서는 分裂이 可能한 미생물인 경우와는 달리 植物의 原形質體 分裂은 一定한 濃度가 維持되어야만 原形質體間의 어떤 相互物質이 細胞間 交換되어 分裂이 일어나는 것으로 생각되며 植物種類 및 培地條件에 따라서도 달리 나타날 것으로 思料된다. 담배 葉肉을 材料로 利用時 原形質體分離는 可能하였지만 分裂을 볼 수 없었는데 이는 植物細胞가 一定期間이 經過된 後에야 한개의 細胞로서 活性度가 높아져 分裂이 可能하지 않을까 보인다.

Table 5. Influence of cell density on plating efficiency[a]

Source	Cell density in plate[b] (Calls/ml)	Plating efficiency
Tobacco mesophyll protoplast	8.8×10^5	+++
	2.7×10^4	+++
	1.3×10^3	+
	2.5×10^2	−

a : protoplasts were cultured in Nakada and Dakebe medium (1971)
b : cell density measured with hemacytometer
+++ : very good + : fair − : poor

分裂條件를 달리하여 담배葉肉 原形質體의 현탁액을 Nakada와 Dakebe培地에 10^4/ml를 Plating 하여 그 結果를 調査한 바 表 6과 같다.

Table 6. Cell division condition after tobacco protoplast inoculation into medium

Cell division condition[a]	Medium[b]	Cell division[c]
2500 Lux 24 Light	Agar	+
	Liquid	+
24 Dark	Agar	±
150 Lux 12 Light	Agar	++
12 Dark	Liquid	++
150 Lux 24 Light	Agar	+
	Liquid	+

a : Temp. 25°C
b : Nakata and Dakebe culture medium
c : 8 days after inoculation

25℃의 恒温室에 光度와 明暗을 달리하여 處理한 바 2,500 Lux 24時間 光條件이 150 Lux 12時間 光暗 條件보다 分裂이 떨어지는 傾向이었다. 原形質體는 分裂初期에 光에 敏感한 反應을 보이는 것으로 思料된다. 培地上에 寒天의 含有 여부는 分裂이 큰 영향을 미치지 않았으며 植物體 再生時 Colony 形成 後 Callus를 培地에 옮기기 쉬운 長點으로 많이 利用되고 있다. 原形質體의 分裂은 5,000 Lux 以上에서는 不可能하였고 처음 Plating 후 12時間 150 Lux 光下에서 細胞分裂을 일으킨 후 2,500 Lux 28℃에 靜置培養하면 좋은 結果를 얻을 수 있었는데 Nagao[17] 가 行한 結果와 同一하였다.

3. 原形質體의 融合

交雜이 不可能한 組合의 育成은 細胞融合에 依해 可能하며 PEG溶液을 處理하여 融合細胞를 養成한 바[6,13,14,17] PEG 6000를 담배와 완두의 葉肉原形質體에 處理한 結果는 表 7과 같다.

PEG溶液을 담배葉肉 原形質體에 處理한 바 PEG 濃度가 增加할 수록 融合率이 增加하는 傾向이었다.

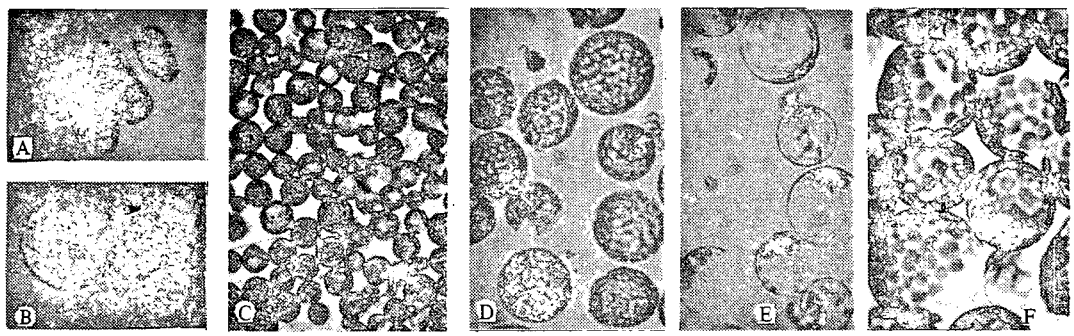

Fig. 1. Isolated protoplasts of higher plants mesophyll and callus cultured in vitro.
A : Plaisade parenchyma cells isolated from pea mesophyll.
B : Tobacco callus protoplasts. C : Tobacco mesophyll protoplasts. D : Pea mesophyll protoplasts.
E : Carrot epidermal protoplasts. F : Papperiment mesophyll protoplasts.

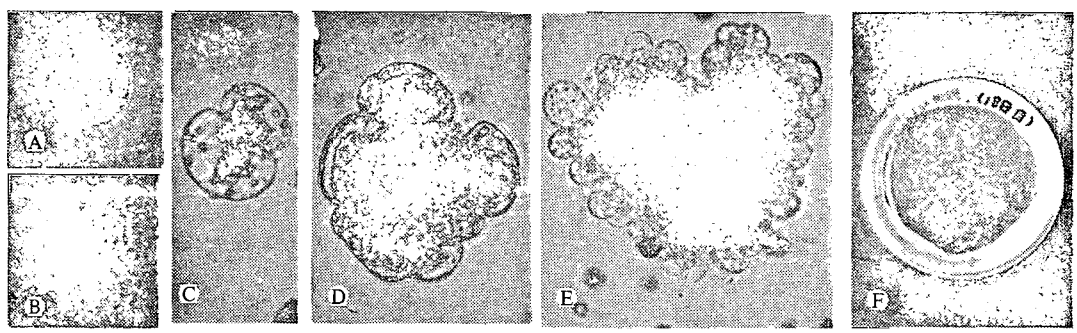

Fig. 2. The division process of tobacco protoplast cell.
A : Protoplasts, at the time of isolation. B : At 2-3 days after plating, protoplast form changed.
C : At 4-6 days, the start of the first division. D : Clusters of about 8-16 cells at 10-12 days.
E,F : Clusters of about 20-45 brownish cell at 15-18 days.

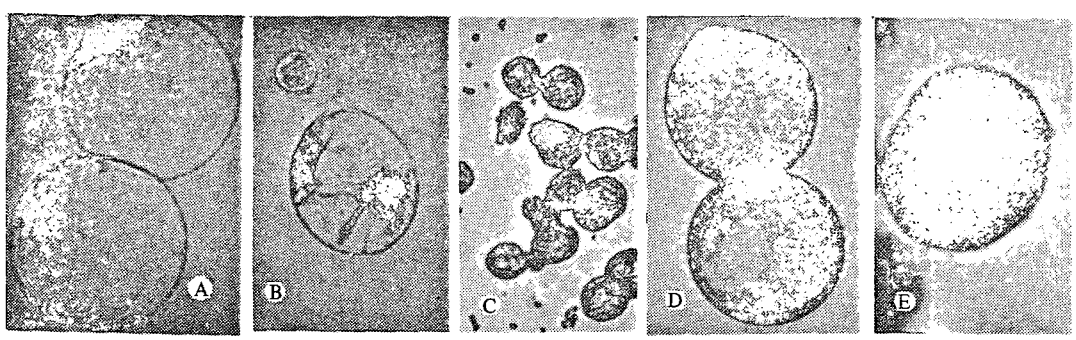

Fig. 3. Fusion of protoplasts in progress.
A,B : Carrot protoplasts fusion between two protoplasts.
D,E : Tobacco protoplasts fusion between two protoplasts.
C : Fusion between a few tobacco protoplasts.

Table 7. The effect of PEG 6000 concentration on the fusion of tobacco mesophyll protoplast

Treatment			
Sol.	PEG 6000	conc.	Fusion efficiency (%)
PEG sol.[a]	0.01M		1.6 (8/500)
	0.02		9.7 (49/508)
	0.03		35.0 (150/402)

a : *PEG sol. contained with* $Cacl_2$ *10mM,* KH_2PO_4 1mM and Sucrose 0.35M (PH 5.5)

一般的으로 PEG溶液에 處理할 경우 原形質體間에 相互接着이 일어나 一定時間이 經過된 後 Eluting 溶液으로 PEG를 洗滌하는 過程에서 細胞融合이 많이 일어났다(Fig 3, D-E). 細胞融合은 原形質體를 Mannitol溶液으로 3～4回 遠心分離시켜 PEG 溶液을 洗滌하는 過程에서도 自然的으로 融合되는 경우도 있으며[9] 이러한 傾向은 遠心分離時 原形質體間 相互接着되어 融合되는 現象으로 考察된다. 融合時 PEG溶液에 Ca^{++}이온의 첨가는 原形質體融合에 매우 큰 役割을 한다고 하는데 Ca^{++}이온 濃度를 달리하여 處理한 結果는 表 8과 같다.

PEG 1500의 0.33 M에 $CaCl_2$濃度를 달리하여 완두葉肉에서 分離된 原形質體에 處理하였을 때 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$濃度가 높을 수록 高度의 融合率이 일어났다. 이것은 分離된 植物의 原形質體는 "－"이온을 갖고 있어서 Ca^{++}이온이 첨가될 경우 2個의 原形質體를 相互 連結시켜주는 가교 役割로 보여진다. 이는 Nagata[14]가 行한 結果와 同一하였고 原形質體의 融合은 細胞濃度 현탁액에 5ml의 PEG溶液을 1 : 1로 첨가했을 때 2個의 原形質間에 融合이 이루어지며 이以上의 比率로 融合時에는 原形質體間에 特異한 接合體가 나타난 것으로 觀察되었다(Fig 3－C). 따라서 原形質體 融合은 PEG溶液만으로 良好한 結果를 얻을 수 없으므로 High pH－High Ca法과 併用해서 使用되어져야 하며 이는 Nagao[17], Constabel[5]이 行한 結果와 一致하는 傾向이었으며 당근의 根端細胞에서 分離된 原形質體間의 融合에 있어서도 同一한 傾向을 보였다(Fig. 3, A–B).

Table 8. The Effect of PEG sol. on the fusion of pea mesophyll protoplast.

PEG sol.		Fusion efficiency (%)
A sol.[a] + $CaCl_2 2H_2O$	10.5mM + KH_2PO_4 0.7mM	43.9
A sol. + $CaCl_2 2H_2O$	7mM	27.3
A sol. + $CaCl_2 2H_2O$	3.5mM	23.1

[a]A sol. PEG 1500 0.33M + Glucose 0.1 M (PH 5.5)
Eluting sol. $Cacl_2 2H_2O$ 50mM + 0.7M Mannitol (PH 10)

摘　　要

植物原形質體를 利用하여 體細胞雜種을 育成하기 基礎資料를 얻고자 植物의 葉肉部位, Callus에서 効果的인 原形質體의 分離, 適合한 培養條件 및 細胞融合에 關한 條件을 調査한 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 培養 融合條件에 適合한 植物原形質體의 分離方法은 여러 種類의 酵素濃度에 따라 다르지만 담배 및 완두葉肉 原形質體分離에는 Macerozyme 0.5％, Cellulase 2.0％, KDS 0.5％, Mannitol 0.7M의 酵素溶液에 處理時 活性 있는 原形質體를 얻을 수 있었다.

2. 培養中인 담배 및 大豆의 Callus로부터 原形質體分離는 培養期間에 따라 細胞活性度가 떨어지거나 쉽게 파괴되는 現象을 보여 良好한 原形質體를 얻을 수가 없었다.

3. 原形質體의 培養은 培養培地에 Plating할 경우 細胞濃度에 따라 差異가 있었으며 1.0×10^4/ml 以上이어야 分裂이 可能하였고 培養條件은 150 Lux 12時間 光暗處理後가 細胞分裂 및 增殖이 가장 旺盛하였다.

4. 細胞融合은 PEG濃度가 重要하며 PEG 1500 0.33 M에서 $CaCl_2$濃度가 높을 수록 融合率이 增加되는 傾向이었다.

引　用　文　獻

1. Bajay Y.P. S.(1977) Plant cell, tissue and organ culture Springer verlag, Berlin: 467.
2. C, Harn and Moon Za Kim(1973) Fusion of protoplasts, isolated from mesophyll cells of *N. rustica* Korean J. Breeding Vol. 5, No. 1: 1-4
3. Cocking E.C.(1960) A method for the isolation of plant protoplasts and vactuoles. Nature 187: 962-963.
4. _____(1972) Plant cell protoplasts-isolation and development. Ann. Rev. Pl. Physiol. 23: 29-50.

5. Constabel F., and K.N. Kao(1974) Agglutination and fusion of plant protoplasts by polyethylene glycol. Can. J. Bot. 52: 1603-1606.
6. Carson P.S., H.H. Smith., and R.D. Dearing (1972) Parasexual interspecific plant hybridization. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69: 2292-2294.
7. Enzmann-Becker G.(1973) Plating efficiency of protoplasts of tobacco in different light conditions. A. Naturforsch 28: 470-471.
8. Gamborg O.L. and R.A Miller(1972) Isolation, culture and uses of plant protoplasts. Can. J. Bot. 51: 1795-1799.
9. Kameya T.(1973) The effects of gelatin on aggregation of protoplasts from higher plants. Planta 155: 77-82.
10. _____, and H. Uchimiya(1972) Embryoids derived from isolated protoplasts of carrot. Planta 103: 356-360.
11 Keller W.A. and Melchers(1973) The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion. Z. Naturforsch. 28. C: 737-741.
12. Kao K.N., W.A. Keller, and R.A. Miller(1970) Cell division in newly formed cells from protoplasts of soybean. Exptl. Cell. Res. 62.: 338-340.
13. Melchers, G., and G. Labib(1974) Somatic hybridization of plants by fusion of protoplasts. Molec. Gen. Genet. 135: 277-294.
14 Nagata, T.(1978) Trends of the cell fusion of plant protoplasts. The Cell 10: 804-811.
15. _____(1978) A novel cell-fusion method of protoplasts by polyvinyl alcohol. Naturwiss 65. S: 263.
16. _____, and I. Takebe(1970) Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. Planta 92.: 301-308.
17. Nagao, T.(1978) Somatic hybridzation by fusion of protoplasts. Japan. J. Crop. Sci. 47(4).: 491-498.
18. 岡田善雄(1971) プロトプラストの分離と培養. 朝倉書店, 133-141.
19. Power, J.B., S.E. Cummins, and E.C. Cocking (1970) Fusion of isolated plant protoplasts. Nature 225.: 1016-1018.
20. Reid, R.K. and A.W. Galston(1975) Experiment on the isolation and cultivation of protoplasts and calli from agriculturally important plants. Biochem. Physiol. Pflanzen 168. S.: 473 483.
21. Takebe, I., Y. Otsuki, and S. Aski(1968) Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. Plant & Physiol 9. 115-124.
22. Weber, G., F. Constabel, F. Williamson, L. Fowke, and O.L. Gamborg(1976). Effect of preincubation of protoplasts on PEG-induced fusion of Plant cells. Z. Pflangen Physiol. Bd. 79. S.,: 459-464.