

완두 (*Pisum sativum* L.) 葉肉細胞 原形質體의 分離 및 融合

權一瓊·金達雄·金仁燮*

慶北大學校 農科大學 農學科

*慶北大學校 農業科學技術研究所

Isolation and Fusion of Pea Mesophyll Protoplast

Kwon, Yil Chan · Kim, Dal Ung · Kim, In Seob*

Dept. of Agronomy, Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

*Inst. of Agric. Sci. & Tech., Kyungpook Natl. Univ.

Summary

This experiment was conducted to identify the enzyme treatment time, calcium ion effect, enzyme concentration and leaf position for protoplast isolation. It was also performed to determine the adequate molarity on protoplasts, and to investigate the incubation time, pH, PEG concentration and DMSO effect for protoplast fusion.

The results obtained were summarized as follows ; The optimal time of incubation in enzyme solution was 4 hours. And the protoplast releasing time was delayed by $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ addition to the enzyme solution compared with no added one. The viability had kept up to above 95% until the 4 hours after digestion.

The high viability of the protoplast was preserved more than 16 hours by adding $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ to digestion solution. The enzyme concentration had no effect on protoplast yield in range from 1% to 5% and the first or second leaf from the top of the plant produced the highest protoplast yield among the leaf position tested.

The purity of healthy protoplast was better in 0.4M and 0.5M sucrose than in others, and the percentage of protoplast aggregation was more 20% to 50% in PEG 6,000 compared with 4,000 and PEG 1,500. Even though the percentage of protoplast aggregation was less increased by 3% to 7% than without DMSO, its treatment was effective to induce binucleated protoplasts.

緒 論

1970年代初 부터 組織培養技術, 分子生物學等 諸分野의 發展에 따라 生命科學이 脚光을 받게 되었다. 그리고 既存品種이 漸次 減少하고 遺傳 資源이 單一化되어지는 가운데 變異의 擴大가 必要하게 되었고, 生物生産이 資源의 有限性 때문에 再考되었다.

1960年 Cocking⁵⁾이 토마토의 根部組織을 酵素 處理하여 原形質體를 分離하는 方法을 導入한 후 Kao等¹¹⁾은 原形質體의 細胞壁 形成 및 細胞分裂

을 報告하였고, Takebe等²²⁾에 의해서 처음으로 分離된 原形質體로 부터 植物體를 얻을수 있었다. 細胞壁을 酵素的으로 除去한 原形質體를 다시 核을 包含한 다른 原形質體에 融合시켜, 그 融合한 原形質體로 부터 個體를 發生시키고자 하는 研究로 發展됨에 따라 Harn⁷⁾, Power等¹⁹⁾은 sodium nitrate를 融合誘道物質로 使用했으며, Kameya와 Takahashi⁸⁾는 sodium 이온이 融合을 誘道한다고 報告하였다. Keller와 Melchers¹⁴⁾는 高溫(37°C), 高알카리(pH10.5), 高濃度の calcium이온이 原形質體의 融合에 有效하다고 하였고, Kao와

Michayluk¹²⁾ 및 Wallin等²³⁾은 처음으로 polyethylene glycol을 사용하여融合을誘導했으며, Kameya⁹⁾는融合誘導物質의含量, 滲透壓, 原形質體의投與量이融合에重要하다고하였다. Carlson等³⁾은 *Nicotiana glauca*와 *Nicotiana langsdortii*의原形質體를融合시켜植物體를再分化시켰으며, Melchers等¹⁶⁾은 토마토와 감자의原形質體를融合시켜分化시킴으로써從來의交雜育種의限界를넘어섰다.

이에本研究는適正酵素濃度 및 葉의適正採取部位가原形質體分離및活性도에 미치는影響과 polyethylene glycol의處理時間, 濃度, pH 및添加材가原形質體의融合에 미치는影響을究明함으로써 다수의異形核融合體를 얻어植物體의再分化를시킬수 있는基礎資料를 얻고자實施하였다.

材料 및 방법

本試驗에使用된완두는1983年英國 Plant Breeding Institute에서분양받은“Eaton”으로1984年9月30日播種하고그잎을採取하여表皮를완전히除去한後cellulase(Onozuka R-10)와macerozyme(R-10), 그리고CPW염²⁰⁾이含有된mannitol液을試料1g當10ml씩處理하였다. 原形質體의融合을 위해서는2,500 lux⁶⁾, 常溫(약24°C)에서CaCl₂·2H₂O, KH₂PO₄, glucose가包含된polyethylene glycol(以下PEG)溶液1.2ml를中央部に넣고그위에原形質體混合液0.6ml를적하한다음그위에1.2ml融合處理液을添加하여고르게움직여섞은후定置시켜서調査하였다.¹⁰⁾

原形質體의酵素處理時間別calcium 이온 영향 및 活性度; 2%(w/v)의cellulase, 0.5%(w/v)의macerozyme, 0.55M mannitol 溶液에1%(w/v)의CaCl₂·2H₂O를添加한것과添加하지 않은pH 5.8인溶液을使用하여26°C 恒溫器에暗狀態로定置한後每時間마다손으로흔들어原形質體를分離시켜서haemocytometer로分離된數를調査하였으며, 分離된原形質體는MS培地에무기염이含有된0.01%(w/v)의fluoresceine diacetate (FDA)를原形質體混合液에等量으로混合하여螢光顯微鏡으로活性도를調査하였다.¹⁷⁾

酵素의濃度 및 處理時間이原形質體分離에 미치는影響; 0.5%(w/v) macerozyme, 0.55M mannitol, 0.5%, 1%, 3%, 5%의cellulase (Onozuka R-10)을各各添加하여處理時間別原形質體의分離率을haemocytometer로調査하였다.

葉位別原形質體의分離程度; 播種7週後완전히展開된1~2, 3~4, 5~6, 7~8葉을選別하여2% cellulase, 0.5% macerozyme, 0.55M mannitol, CPW염이含有된pH 5.8인酵素溶液을試料1g當10ml씩處理하여26°C 暗狀態의恒溫器에定置한後每時間마다손으로흔들어서分離된原形質體를haemocytometer로調査하였다.

Sucrose濃도가原形質體의回收에 미치는影響; 分離된原形質體를50×g로遠心分離하여酵素溶液을완전히除去하고洗滌溶液에50×g로다시遠心分離한後0.3M, 0.4M, 0.5M, 0.6M, 0.7M, 0.8M의sucrose溶液에100×g로遠心分離하여haemocytometer로原形質體와찌꺼기의數를調査하였다.

PEG의處理時間이原形質體融合에 미치는影響; 10mM CaCl₂·2H₂O, 0.7mM KH₂PO₄, 0.2M glucose, pH 5.5인溶液에PEG 1,500, 4,000, 6,000을各各50%(w/v)씩添加하여2,500 lux 照度下の常溫에서處理하여融合率을調査하였다.

pH가原形質體의融合에 미치는影響; 10ml CaCl₂·2H₂O, 0.7mM KH₂PO₄, 0.2M glucose가含有된50%(w/v)의PEG 6,000 溶液을pH 3.8, 4.8, 5.8, 6.8, 7.8로調整한後2,500 lux 照度下の常溫에서各各60分間處理하여이에따른融合率을調査하였다.

PEG濃도가原形質體融合에 미치는影響; 10mM CaCl₂·2H₂O, 0.7mM KH₂PO₄가含有된50%(w/v)의PEG 6,000 溶液에glucose를0.2M, 0.3M, 0.4M, 0.5M을添加하였고, 0.03M, 0.13M, 0.23M의glucose가含有된50%(w/v)의PEG 1,500 및glucose가添加되지 않은40%의PEG 1,500 溶液에10mM CaCl₂·2H₂O, 0.7mM KH₂PO₄를넣어서이들融合液의마지막濃도가0.26M, 0.36M, 0.46M, 0.56M인溶液을2,500 lux 照度下の常溫에서60分間處理한後融合率을調査하였다.

Dimethyl sulfoxide가原形質體融合에 미치는效果; 10mM CaCl₂·2H₂O, 0.7mM KH₂PO₄, 0.2M

glucose가 함유된 PEG 6,000, 50%(w/v) 용액에 5%, 10%, 15%, 20%, 25%의 dimethyl sulfoxide를添加한後, 2,500 lux 照度下의 常溫에 60分間 處理하여 이에 따른 效果를 調査하였다.

結果 및 考察

原形質體의 酵素 處理時間別 calcium이온 效果 및 活性度; 時間別 原形質體 分離率은 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 添加하지 않은 區에서 빠른 原形質體 分離가 일어났으나 빠른 時間에 原形質體가 損傷되었고, 處理 4時間째 부터 原形質體의 分離된 數가 固定되어 8時間까지 별다른 變動이 없었으나 16時間과 24時間處理에 있어서는 急激한 破壞를 보였다. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 에 의하여 全般的으로 原形質體 分離가 늦어지고, 오랫동안 活性도가 維持되는 것으로 보아 原形質體의 막에 影響을 주는 것으로 추정되며, 많은 原形質體를 單時間 酵素 處理하여 얻기 위해서는 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 添加하지 않아야 할 것으로 思料된다. 그리고 24時間 酵素處理에 의해 試料가 褐色으로 變하는 것으로 보아 齊²¹⁾가 報告한 polyphenol性物質의 酸化防止材를 添加해 주는 것이 좋을 것으로 판단된다 (그림 1).

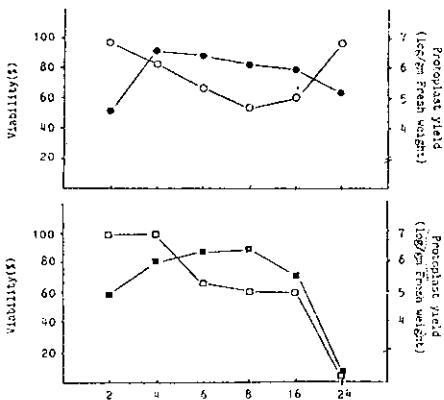


Fig. 1. The rate of protoplast production and calcium ion effect in incubation time. Viability (○), Protoplast yield (●) of added 1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and Viability (□), Protoplast yield (■) of no added one contained with 2% cellulase, 0.5% macerozyme, 0.55M mannitol.

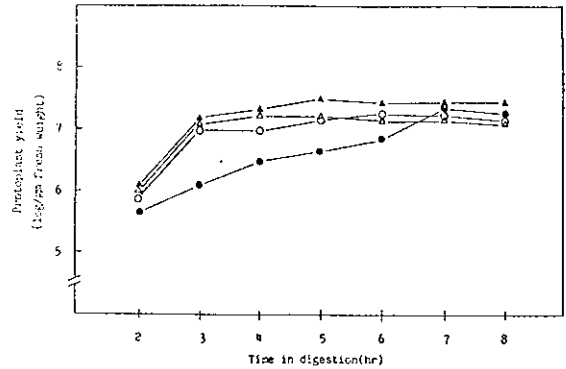


Fig. 2. The rate of protoplast isolation between enzyme concentration and digestion time. 0.5% (●), 1% (○), 3% (△), 5% (▲) cellulase contained with 0.5% macerozyme, 0.55M mannitol.

酵素的 濃度 및 處理時間이 原形質體 分離에 미치는 影響; 0.5%의 cellulase를 處理한 區에서는 7時間까지 原形質體 分離가 서서히 增加하여 그후에는 다른 處理區와 비슷한 原形質體의 分離率을 보였으며, 1%, 3%, 5%의 cellulase를 處理한 區에서는 時間別 原形質體 分離의 差異가 거의 없었고, 酵素處理 4時間째에도 活性도가 95% 이상 維持하고 있었으므로 1%의 cellulase를 使用하여 原形質體를 分離하는 것이 有利할 것으로 思料된다(그림 2).

葉位別 原形質體의 分離程度; 全般的으로 下位葉으로 갈수록 原形質體의 分離率이 떨어졌으며, 下位葉에서 原形質體가 分離된 경우 大部分이 葉綠體가 含有되어 있지않은 것으로 보아 葉肉組織이 아닌 다른 組織의 細胞로 推定된다. 또 sodium citrate가 原形質體 分離에 chelating agent로 使用된 것⁴⁾으로 미루어 細胞壁의 두께와 pectin物質의 性質變化가 重要な 影響을 미치는 것으로 推定되며 1~2葉에서 3~4時間 酵素處理하는 것이 試料 1g 당 2.1×10^7 개의 높은 原形質體分離가 일어나는 것으로 보아 植物體의 生理的 條件이 原形質體分離, 活性度 및 培養에 많은 影響을 미치므로 完全히 展開된 어린잎을 使用하는 것이 有利할 것으로 思料되며, 이는 Arnold와 Eriksson²⁾의 報告와 비슷한 傾向을 보였다(表 1).

Sucrose 濃度가 原形質體의 回收에 미치는 影響; sucrose 濃度가 0.3M에서는 原形質體 및 찌꺼기를 거의 찾아 볼 수 없었고, 濃度가 增加할

Table 1. The rate of protoplast isolation in different leaf position

Leaf position	Incubation time(hr)					
	1	2	3	4	5	6
1st-2nd	274*	523	2100	2140	2300	2300
3rd-4th	1	299	419	655	836	641
5th 6th	-	6	10	14	10	30
7th-8th	-	9	59	70	192	250

* 10⁴ protoplast yield/gm fresh weight.

수록 原形質體의 數가 줄어들고 반면에 찌꺼기의 숫자가 增加하는것으로 보아 原形質體가 收縮되어 沈澱되는 것으로 推定되며, 0.4M 및 0.5M에서 가장 良好한 狀態를 維持하고 있는 것으로 비루어보아 適定濃度라 思料된다(그림 3).

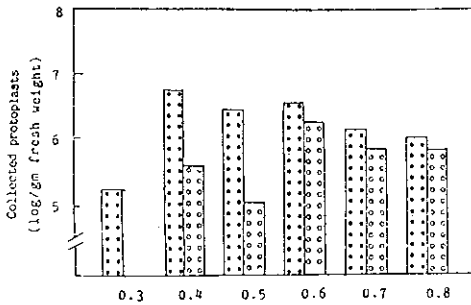


Fig. 3. The relationship between various molarity and purification in pea mesophyll protoplasts. Protoplast(●), debris(■).

PEG의 處理時間이 原形質體 融合에 미치는 影響; PEG 6,000의 경우 75分 處理에서 가장 많은 融合이 일어났으며 이 후에는 減少되는 傾向을 나타내었다. PEG 4,000에서는 60分 處理에서 53.59%의 融合率을 나타내었고 PEG 1,500의 경우에는 全般的으로 낮은 20% 미만의 融合率을 나타내었다. PEG 6,000을 處理한 경우에는 Lee等¹⁵⁾의

Table 2. The relationship between different incubation time of PEG treatment and fusion activity in pea mesophyll protoplasts.

Fusogenic agent	Incubation time(min)					
	15	30	45	60	75	90
PEG 6000 (50%)	47.60 ¹⁾	46.13	62.40	62.84	70.42	63.90
PEG 4000 (50%)	37.64	32.19	33.56	53.59	47.37	33.56
PEG 1500 (50%)	17.36	16.72	19.94	19.32	16.51	17.50

1) Fusion percentage.

報告와 비슷한 傾向을 보였으며 處理時間이 30分 이상 經過함에 따라 活性度에 나쁜 影響을 미치므로 이보다 짧은 時間의 PEG 溶液의 處理가 必要할 것으로 思料된다(表 2).

pH가 原形質體의 融合에 미치는 影響; pH에 따른 融合效果는 pH 5.8에서 62.84%로 가장 높았으며 pH가 높아지거나, 낮아질수록 融合率이 減少하는 傾向을 나타내어 20%이상의 差異를 보였다(그림 4).

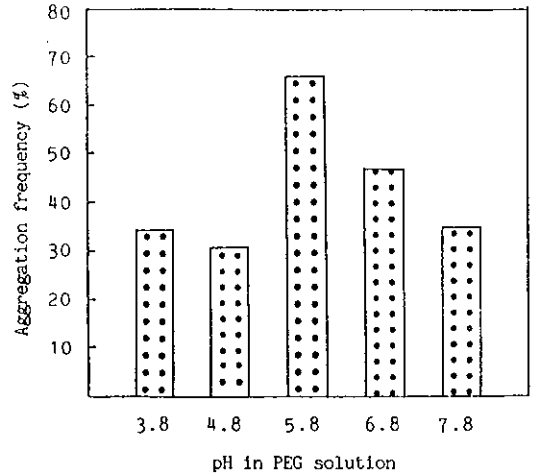


Fig. 4. The relationship between pH of PEG solution and aggregation activity in pea mesophyll protoplasts. The PEG(50%) solution contained with 10 mM CaCl₂ · 2H₂O, 0.7 mM KH₂PO₄, 0.2M glucose.

PEG濃度가 原形質體 融合에 미치는 影響; PEG 6,000溶液에서는 0.26M에서 가장 높은 62.8%의 融合率을 보였으며 0.36M, 0.46M, 0.56M에서는 별다른 融合率의 差異를 보이지 않았으며, PEG 1,500溶液에서는 0.26M에서 20.95%로 가장 높았으나 濃度變化에 따른 融合率의 差異는 分子量 自體의 差異에 의한 것으로 推定되며, PEG 溶液의 濃度에 의해서 融合率의 差異를 보이는 것으로 보아 Kao等¹³⁾의 報告와 일치하는 傾向을 보였으며 이는 낮은 濃度에서 融合이 잘되는 것으로 思料된다(表 3).

Demethyl sulfoxide가 原形質體 融合에 미치는 效果; Demethyl sulfoxide를 15% 이하로 添加했을 때는 큰 融合率의 變化를 보이지 않았으나 이보다 많은 量을 添加했을때 融合率이 떨어

Table 3. The relationship between various molarities in PEG solution and fusion activity in pea mesophyll protoplasts

Solution ¹⁾	Molarity	Fusion frequency (%)
50% A + 0.2M Glucose + C + D	0.26	62.84
50% A + 0.3M Glucose + C + D	0.36	41.39
50% A + 0.4M Glucose + C + D	0.46	41.93
50% A + 0.5M Glucose + C + D	0.56	40.41
40% B + C + D	0.26	20.95
50% B + 0.03M Glucose + C + D	0.36	15.10
50% B + 0.13M Glucose + C + D	0.46	17.37
50% B + 0.23M Glucose + C + D	0.56	19.32

1) A : PEG 6000, B : PEG 1500, C : 10mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, D : 0.7mM KH_2PO_4

졌다. 그러나 이는 dimethyl sulfoxide를添加하지 않았을때보다 融合率이 3~7% 減少하는傾向을 보였으며, dimethyl sulfoxide를添加함에 의해서 2개 혹은 3개의 原形質體가 融合되는 率이 높았다. 이는 Locking⁵⁾이 PEG溶液의 處理에 있어서 多核 heterokaryon의 生成化率이 높고 heterokaryon의 繁殖可能한 形態는 binucleate라한 點으로 미루어, dimethyl sulfoxide의 添加가 有效한 것으로 思料된다(그림 5).

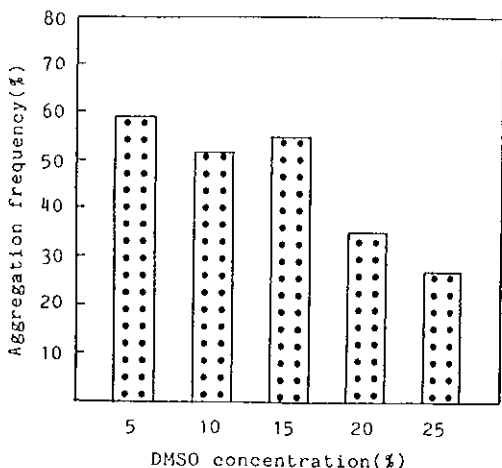


Fig. 5. The relationship between various DMSO concentration and aggregation activity in pea mesophyll protoplasts.

摘要

원두葉肉細胞의 原形質體分離 및 融合에 있어서 酵素의 處理時間, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 의 效果, 酵素의 濃度와 葉의 位置에 따른 原形質體의 分離에 미치는 影響과 Mole 濃度에 따른 遠心分離效果,

PEG溶液의 處理時間, 酸度에 따른 融合效果 그리고 dimethyl sulfoxide 添加效果를 究明하기 위하여 實施한 實驗의 結果는 다음과 같다.

1. 原形質體의 分離에는 4時間의 酸素處理가 가장 良好했고 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 의 添加에 따라 原形質體의 分離速度가 늦어졌으며 活性度는 4時間까지 變動이 없었고 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 에 의해서 活性度가 長期間 維持되었다.

2. 酸素의 濃度는 1%이상의 處理에서 거의 同一한 原形質體分離率을 나타냈으며 上位 1~2葉이 가장 좋은 原形質體分離率을 보였으며 遠心分離效果는 0.4M, 0.5M에서 良好하였다.

3. 原形質體融合은 PEG 6000溶液 75分 處理에서 좋은 融合率을 보였다. 그러나 30分 以內의 處理가 活性度에 影響을 미치지 않았으며 pH 5.8인 PEG 6000의 0.2M溶液에서 가장 높은 62.84%의 融合率을 나타내었다. dimethyl sulfoxide에 의한 效果는 融合率이 3~7% 減少하지만 binucleate의 誘道에 有效한 것으로 推定된다.

引用文獻

- Ahkong, Q. F., D. Fisher, W. Tampion and J. A. Lucy : 1975. Mechanism of cell fusion. *Nature*, 253 : 194~195.
- Arnold, S. V. and T. Eriksson : 1976. Factors influencing the growth and dividing of pea mesophyll protoplasts. *Physiol. Plant*, 36 : 193~196.
- Carlson, P. S., H. H. Smith and R. D. Dearing : 1973. Parasexual interspecific plant hybridization. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 69 : 2292~2294.
- Cassells, A. C. and M. Barlass : 1976. *Enviro-*

- nmentally induced changes in the cell walls of tomato leaves in relation to cell and protoplast release. *Physiol. Plant*, 37 : 239~246.
5. Cocking, E. C. : 1960 A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*, 187 : 962~963.
 6. 崔祚周, 孫世鎬, 鄭元 : 1982 植物原形質體의分離 및 融合에 관한 研究, 韓作誌, 27 : 147~154.
 7. Harn, C. : 1973. Fusion of protoplasts isolated from rice callus. *SABRAO Newsletter*, 5 : 107~110.
 8. Kameya, T. and N Takahashi : 1972. The effect of inorganic salt on fusion of protoplasts from roots and leaves of Brassica species. *Japan J. Genet.*, 47 ; 215~217.
 9. Kameya, T. : 1975. introduction of hybrids through somatic cell fusion with dextran sulfate and gelatin. *Japan J. Genet.*, 50 ; 235~246.
 10. Kameya, T. : 1983. Studies on plant cell fusion by dextran ; Effect of pH, inorganic salts and electrical stimulus. *Cytologia*, 48 : 873~878.
 11. Kao, K. N., W. A. Keller and R. A. Miller : 1970. Cell division in newly formed cells from protoplast of soybean. *Exp. Cell Res.*, 62 : 338~340.
 12. Kao, K. N. and M. R. Michayluk : 1974. A method for high-frequency intergenic fusion of plant protoplasts *Planta(Berl)*, 115 : 335~367.
 13. Kao, K. N., J. F. Constabel, M. R. Michayluk and O. L. Camborg : 1974. Plant protoplast fusion and growth of intergenic hybrid cell. *Planta(BERL)*, 120 : 215~227.
 14. Keller, W. A. and G. Melchers : 1973. The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion. *Z. Naturforsch*, 28 : 737~741.
 15. 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.
 16. Mechers, G., M. D. Sacristan and A. Holder : 1978. Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Res. Comm.*, 43 : 203~218.
 17. Midholm, J. M. : 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cell. *Stain Technology*, 47 : 181~194.
 18. Peberdy, J. F., A. H. Rose, H. J. Rogers and E. C. Cocking : 1976. *Microbial and plant protoplast*. Academic Press, pp : 189~200.
 19. Power, J. B., S. E. Cummins, and E. C. Cocking : 1970. Fusion of isolated protoplasts. *Nature*, 225 : 1016~1018.
 20. Reinert J. and M. M. Yeoman : 1982. *Plant cell and tissue culture*. Springer - Verlag Berlin Heidelberg.
 21. 裴藤明 : 1984. 木本植物におけるプロトプラウスの単離と細胞融合. *細胞工學*, 3 : 251~267.