

담배 CMS line의 원형질체로부터 cytoplasm의 유도 및 이와 타품종 원형질체와의 융합에 관한 연구

소 상 섭 · *여 읍 동
전북대학교 사범대학 생물교육과
*전북대학교 자연과학대학 생물학과

Studies on the Induction of Cytoplasts from the Protoplasts of CMS(Cytoplasmic Male Sterility) Line of *Nicotiana* and the Fusion of the Cytoplasm and the another Protoplasts

Sang-Sup So and *Up-Dong Yeo

Department of Biology Education, *Department of Biology,
Chonbuk National University, Chonju, 560-756, Korea

ABSTRACT

This study was investigated as a step for the purpose of successful introduction of cytoplasmic inherited characters between the different plants.

Cytoplasts were separated from the protoplasts of CMS(cytoplasmic male sterility) line such as MS Burley 21 which carried from *Nicotiana megalosiphon*. The cytoplasts were fused to protoplasts derived from *Nicotiana tabacum* Br 64 with PEG(polyethylene glycol).

The cytoplasts were separated by density gradient centrifugation. Efficient separation of cytoplasts depended on the difference of specific density of gradient solution. However, the iso-osmolality of gradient solution was not important to separate the cytoplasts.

The cells for a hybrid were fused with 50% concentration of PEG.

서 론

식물의 원형질체 연구는 효소처리 방법의 개발(1)에 의해 식물체로부터 원형질체의 분리가 용이하게 됨으로써 최근 세포학, 유전학 및 분자생물학 등 생물학의 발전은 물론 식물병리학 및 식물영양학 등의 농학분야의 발전까지 크게 기여하였으며, 특히 종래의 육종 방법으로는 불가능한 원연관계의 식물들 사이에서 원형질체 융합에 의한 체세포 잡종 형성(2)이나 핵(3), mitochondria(4) 및 엽록체(5) 등을

분리하여 원형질체에 삽입시키는 방법으로 새로운 식물체를 얻어내려는 노력이 매우 활발히 이루어지게 되었다. 이와 같은 방법들 중에서 가장 많은 연구가 이루어진 분야가 원형질체 융합이지만, 이 방법에 의해 체세포 잡종을 육성할 경우 두 개의 fusion partner로부터의 융합 세포에서 우량형질만이 모두 발현되리라고 기대하기란 사실 이론상으로도 불가능하다. 따라서 최근의 연구 방향은 vector system 개발(6)이나 electroporation 방법(7, 8) 등을 이용하여 현재 재배되고 있는 우수 품종이 갖는 단점 등을

보완할 수 있는 gene을 삽입시키는 방법들이 강구되고 있는 실정이다.

그러나 원형질체 융합이 두 세포의 핵과 세포질이 모두 하나로 합치는 것이지만, 만일 유전형질이 cytoplasmic inheritance 한 경우라면 하나의 세포에 유전형질의 세포질만 융합하게 되어 단순한 원형질체 융합에서 오는 단점들은 제거할 수 있는데, 이러한 방법의 하나가 Cytoplasm을 성공적으로 제조하는 것이다(9). Cytoplasm은 가지과의 어떤 종에서는 성숙과피에서 자연적으로 형성(10)되기도 하며, 비정상적인 경우이나 원형질체 배양시 budding에 의해 출현(11) 하기도 하며, elongated cell들이 원형질체 분리시 두 개 이상으로 분리되어 형성(12)되기도 하지만 현미경 하에서 관찰하는 것 이외에 이것을 분리, 획득하기란 결코 쉬운 일이 아니다. 그밖에 X-ray 처리(13)에 의해 핵을 불활성화시킴으로써 cytoplasm을 얻을 수도 있겠으나 이 같은 방법 역시 세포에 유해한 영향을 끼칠 것이란 생각을 완전히 배제할 수는 없다. 따라서 Lorz(9)는 식물 원형질체를 고속의 gradient centrifugation에 의해 핵과 세포질의 비중 차이를 이용하여 핵이 포함된 부분(miniprotoplast)과 핵이 포함되지 않은 부분(cytoplasm)으로 원형질체의 fragmentation의 유도가 가능하다는 보고를 한 이후 많은 연구자들(14, 15)이 여러 가지 방법의 density gradient centrifugation에 의해 cytoplasm 제조에 관한 실험을 한 바 있다.

현재 재배되고 있는 식물체들의 대부분은 품종개량이라는 육종 단계를 밟아 우량형질이 도입되어 있는 것들이다. 그러나 이 품종들은 야생종보다 병에 약한 경우가 대부분이며 이 같은 이유는 대부분의 야생종들이 병에는 강한 대신 품질이 나쁘기 때문에 재래의 품종 육성방법으로는 품질도 좋고 병에도 강한 품종을 육성하기가 매우 어려운 문제가 아닐 수 없다. 그러나 내병성 인자가 세포질 유전을 한다면 이 세포질만 포함하는 cytoplasm을 정상적인 식물 원형질체와 세포 융합에 의해 새로운 체세포 잡종을 육성할 수 있으리라 생각된다.

따라서 본 연구에서는 그와 같은 방법의 일환으로 cytoplasmic inheritance 한 *Nicotiana tabacum*의 CMS(cytoplasmic male sterility) line에서 원형질체를 유리시켜 density gradient centrifugation에 의해 cytoplasm의 형성과 이것과 정상 원형질체와의 융합을 시도하고 이후 융합세포로부터 잡종식물의 유도 가능성을 검토하여 보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험재료는 한국인삼연구소 전주 시험장에서 분양 받은 재배 품종인 *Nicotiana tabacum* Br 64와 CMS line으로는 *Nicotiana megalosiphon*에서 유래된 응성불임계통의 *Nicotiana tabacum* Br 21을 여(戾) 교배시킨 MS(male sterile) Burley 21을 사용하였다.

원형질체 분리용 재료로는 상기 실험 식물의 엽육 조직과 각각 조직 배양에 의해 형성된 callus를 이용하였으며, callus는 잎의 midrib을 Murashige & Skoog media(16) (MS basal salts & vitamins + 2mg/l 2.4D + 0.1mg/l kinetin + 8g/l agar + 30g/l sucrose, pH 5.8)에 접종하여 유도시켰다.

원형질체 분리

원형질체 분리는 mesophyll 조직과 callus 조직을 Table 1에서와 같이 서로 다른 효소용액에서 실시하였다. Mesophyll 조직의 경우 잎의 엽육 부위를 70% ethanol과 1% sodium hypochlorite 용액으로 표면 살균하고 멸균수로 수차 세척한 후 효소용액에서 3시간, 또한 callus 조직은 agar를 제거한 후 효소용액에서 5시간 incubation 시킨 후 유리된 원형질체를 CPW 13% mannitol 용액으로 2~3회 세척한 다음 적절한 농도의 sucrose 용액(20% 정도)으로 purify시켰다.

Cytoplasm 분리

원형질체로부터 핵이 포함된 부분과 세포질 부분이 분리된다면 핵과 세포질의 비중을 정확히 알 수가 없으므로 Table 2의 Lesney 등의 조성(17)과 Table 3의 Lorz 등의 방법(9, 18)에 따른 두 종류의 density gradient 용액에 원형질체를 혼합시켜 24,000xg로 3시간 원심분리하였으며, 여기에서 얻어진 각 band 층을 pipetting 하여 modified carbol fuchsin(19)으로 핵 염색을 하여 cytoplasm과 miniprotoplast를 확인하였다. 또 얻어진 cytoplasm은 2.5% Evan's blue + 0.4M Mannitol 용액으로 생체염색(20) 하여 그 생존력을 확인하였다.

Cytoplasm과 원형질체와의 융합

MS Burley 21의 배양 callus로부터 얻은 cytoplasm과 *N. tabacum* Br 64의 mesophyll cell에서 분리된 원형질체의 일정액을 혼합하여 PEG(polyethy-

Table 1. Composition of enzyme solution for isolation of protoplasts from *Nicotiana-mesophyll* and cultured callus.

Composition	Concentration(%)	
	Mesophyll	Callus
Cellulase(Onozuka R-10)	1.0	2.0
Macerozyme(Onozuka R-10)	0.1	2.0
Driselase		2.0
Mannitol(in CPW salts)	13.0	13.0
pH	5.8	

Table 2. Composition of density gradient with mannitol and sucrose.

Region	Composition	Remark
1	0.33M mannitol+0.5% DMSO	Initial protoplast layer
2	1.00M mannitol+0.5% DMSO	Cytoplasts
3	33% sucrose	Miniprotoplasts
4	Near saturated sucrose	Debris

Table 3. Composition of iso-osmotic(550mOs/Kg H₂O) density gradient.

Region	Composition	D(Kg/l)
1	0.21M CaCl ₂ :0.5M mannitol(1:1)	1.023
2	0.52M mannitol:percoll(19:1)	1.035
3	0.61M mannitol:percoll(4:1)	1.054
4	0.92M mannitol:percoll(1:1)	1.092

lene glycol) 처리에 의한 융합방법을 이용하였다(21).

세포융합을 위한 최근의 방법으로는 electrofusion(22) 등의 기술이 이용됨으로써 PEG 등의 chemical system의 경우보다 융합률을 크게 향상(23)시킨다거나 외부 DNA 및 organelles 등의 세포내 유입을 보다 용이(7, 8)하게 하는 등 기술적인 면에서 크게 개선되긴 하였으나, 때때로 electric field의 강도에 따라 세포가 직접 충격을 받거나 fusion medium 내의 NaOH 또는 NaCl 등의 전기적 분해로 인한 세포의 파괴가 유발(24)되기도 한다.

그러나 PEG 방법은 융합률에 있어서 상기한 방법에 비하여 낮다고 할지라도 세포에 대한 독성이 어떤 동물의 경우에 보고된 것(25)과는 달리 비교적 식물세포에서는 뚜렷한 독성을 보이지 않으며 더욱이 불완전한 세포인 원형질체 융합에 사용하기는 효

과적(26)이며 비교적 안전한 것으로 인식되어 있다.

본 실험에서는 PEG(MW:1540) 농도를 각각 30, 40, 50 및 60%로 달리하여 15~20분 정도로 처리한 후 micro-pipette으로 PEG를 제거하였으며 이어 세척액을 처리하였다. 세척액은 0.4M glucose, 66mM CaCl₂, 10% DMSO가 혼합된 stock A와 0.3M glycine-NaOH buffer(pH 10.5)의 stock B를 혼합한 액으로서 약 15분 정도 처리하였으며, 이 후 modified carbol fuchsin으로 염색하여 현미경하에서 융합을 확인하였다.

결과 및 고찰

원형질체 분리

Mesophyll 조직에서의 원형질체 분리는 Table 1에서와 같이 cellulase와 macerozyme이 각각 1.0 및 0.1%로 혼합된 효소용액에서, callus 조직의 경우는 cellulase, macerozyme 및 driselase가 2%씩 혼합된 효소용액에서 gyratory shaking(40rpm) 방법으로 digestion 시킨 결과 Fig. 1, 2 및 3과 같은 원형질체를 얻을 수 있었다.

Cytoplasm 제조에 사용된 callus 유래 원형질체는 가능한 많은 양이 필요하므로(15), So 등(27)의 방법에 의하여 최고치의 원형질체 분리를 위한 최적 배양온도와 시간을 조사한 결과는 Fig. 4와 같았다. 즉 염육 및 callus 모두 28℃의 온도에서 최고치의 분리를 나타냈으며, 배양시간은 mesophyll에서 3시간, callus에서 4.5~5시간 digestion 후 최고치의 원형질체 분리를 나타내었다.

Density gradient 조성

Table 2 및 Table 3은 각각 Lesney 등의 방법과 Lorz 등의 방법에 의한 density gradient의 조성을 나타낸 것으로서 각 조성의 density gradient에서 24,000xg로 고속 원심분리 후에도 각 gradient가 그대로 유지될 수 있는지 조사하여 보기 위하여 각 층별로 methylene blue로 착색시켜 3시간 원심분리하여 본 결과는 Fig. 5와 같았다. Table 3에서와 같이 Lorz 등의 방법은 Lesney 등의 방법에 비해 각 gradient 용액의 osmolality를 일정하게 유지시켜 줌으로써 3시간의 원심분리 도중 각 층별로 형성되는 생세포 내의 osmolality 변화를 최소화하여 그 damage를 줄일 수는 있었으나, Fig. 5에서 보는 바와 같이 3시간의 원심분리 후 각 gradient에 있는 용액이 섞이는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 비

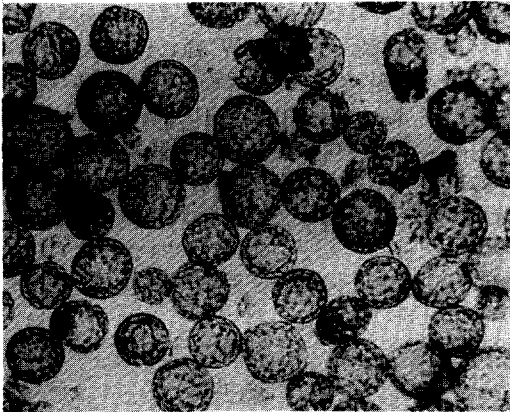


Fig. 1. Protoplasts isolated from *Nicotiana tabacum* Br 64-mesophyll tissue(200x).

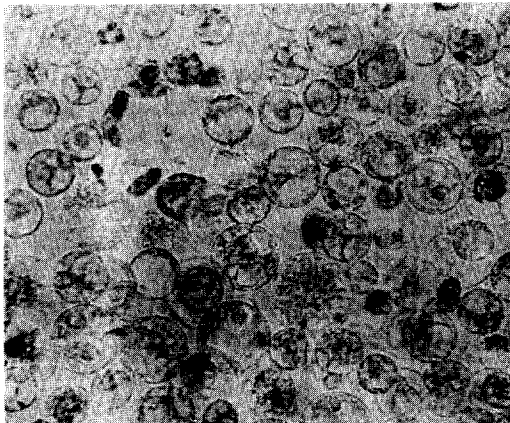


Fig. 2. Protoplasts isolated from *Nicotiana tabacum* Br 64-callus tissue(200x).

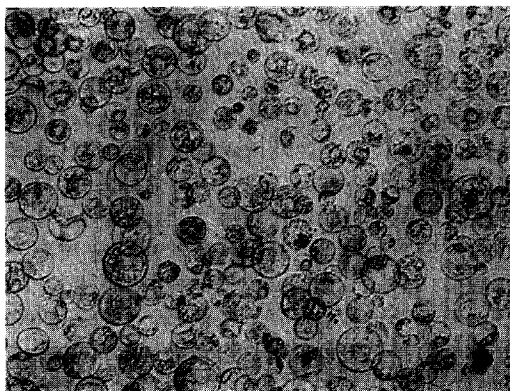


Fig. 3. Protoplasts isolated from MS Burley 21-callus tissue (200x).

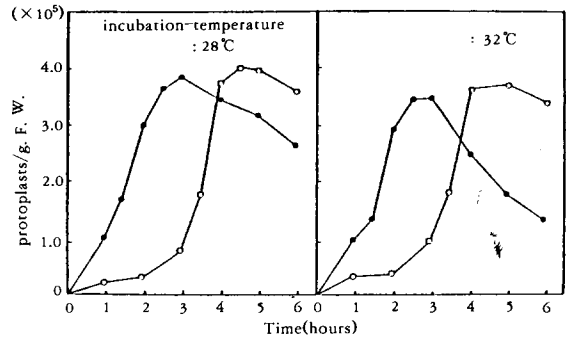


Fig. 4. Effects of incubation time and temperature on the yields of protoplasts isolated from mesophyll (●) and callus tissue(○) in the enzyme solution.

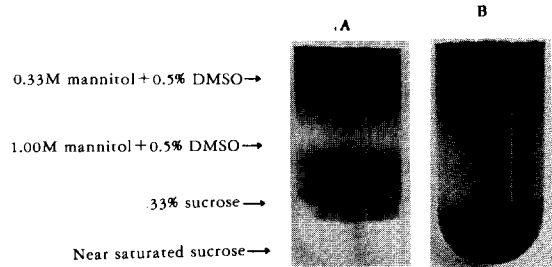


Fig. 5. The results of centrifugation in different density gradient condition.
A: Lesney's method(from table 2).
B: Lorz's method(from table 3).

중이 서로 다른 cytoplasm, miniprotoplast 또는 debris 등이 서로 혼합되어 순수한 cytoplasm의 분리란 용이할 수가 없다. 따라서 본 실험은 3시간 원심 분리 후에도 gradient를 유지할 수 있는 Lesney 방법(Fig. 5의 A)을 택하였으며, 차후 이 방법에 따른 osmolality의 변화가 세포에 치명적인 damage를 준다면 density gradient 조성의 변화도 고려해야 할 과제라고 사료된다.

Cytoplasm 형성

Cytoplasm 형성을 위한 재료로는 CMS line인 MS Burley 21의 mesophyll 조직과 callus 조직으로부터 분리된 원형질체를 사용하였다. Fig. 4의 결과에 따라 분리된 원형질체는 0.33M mannitol과 0.5% DMSO 혼합액에 넣어 약 1시간 incubation 시킨 후

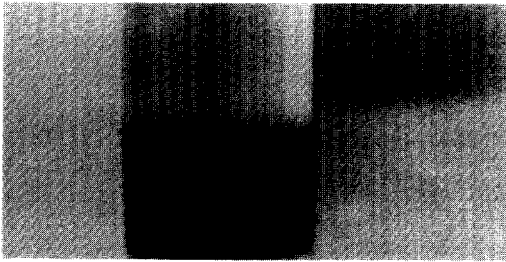


Fig. 6. The results from centrifugation of Lesney solution(Table 2) added with protoplast-mixture.

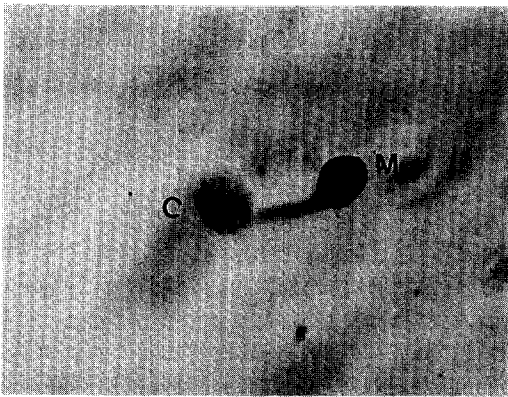


Fig. 7. The profile of subprotoplasts derived from protoplasts of MS Burley 21-callus tissue(200x). (C : cytoplasm M : miniprotoplast)

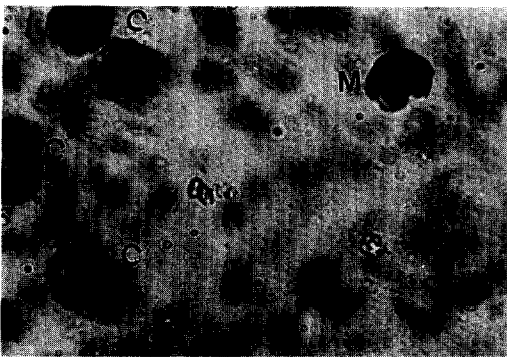


Fig. 8. The profile of the complete cytoplasts derived from protoplasts of MS Burley 21-callus tissue(200x). (C : cytoplasts M : a broken miniprotoplast)

Table 2의 Lesney 방법에 의한 density gradient 조성에서 고속 원심분리한 결과 Fig. 6과 같은 band 층을 얻을 수 있었다. 이어 각 band별로 pipetting 하여 modified carbol fuchsin으로 핵 염색하여 현미경 관찰을 하였다. Callus에서 분리된 원형질체는 원심분리 후 mannitol과 sucrose 층의 경계 부위에서 Fig. 7과 같은 세포가 관찰되어 cytoplasm과 miniprotoplast의 분리를 확인할 수 있었으며, 특히 3 region인 1.0M mannitol+0.5% DMSO 층에서는 Fig. 8과 같은 cytoplasm를 확인할 수 있었다. Figure에서는 또한 cytoplasts 이외에 density의 차이에 의해 파괴된 것으로 추정되는 miniprotoplast도 나타나고 있다.

그러나 mesophyll에서 분리된 원형질체를 재료로 한 경우에는 3시간 원심분리 후에 어느 region에서도 subprotoplast로 분리 가능한 세포를 발견할 수 없었는데, 이는 여러 요인이 존재하겠으나 mesophyll에서 분리한 원형질체가 callus에서 분리한 원형질체보다 원형질체마다 매우 약하기 때문(28, 29)으로 사료되었다.

또한 cytoplasm 형성을 위해 사용된 protoplast는 Fig. 4의 결과에서 최고의 분리를 나타낸 것(4.1×10^5 protoplasts/callus g. F. W)을 사용하였으나, 실제 형성된 cytoplasm는 $8 \times 10^4 - 1.2 \times 10^5$ 정도로서 사용된 원형질체의 20~30% 정도의 양을 나타냈는데, 이는 고속원심분리도중 파괴되거나 분리 후 osmolality의 불균형에 따라 파괴된 것으로 추정되었다.

Cytoplasm과 원형질체와의 융합

CMS line인 MS Burley 21에서 제조된 cytoplasm와 *N. tabacum* Br 64의 mesophyll로부터 분리된 원형질체의 융합 결과는 다음과 같다.

Fig. 6의 3 region에서 채취한 cytoplasts와 mesophyll에서 유도한 protoplasts를 1:2의 비율이 되게 하여 이를 13% mannitol(in CWP salts) 용액에서 resuspension 시킨 후 PEG 처리를 하였다.

PEG(M. W : 1540) 처리는 Menczel 등(21)의 방법에 따라 각각 30, 40, 50 및 60%로 조정하였으며 처리 시간은 20분으로 하였다. Table 4에서와 같이 30%의 농도에서는 전혀 융합을 확인할 수 없었으며, 40% PEG 처리구에서도 원형질체간의 융합만이 일어날 뿐 cytoplasm와 원형질체의 융합으로 확인할 수 있는 것은 4% 정도에 불과하였다. 반면 50 및 60% PEG 처리구에서는 각각 15 및 8% 정

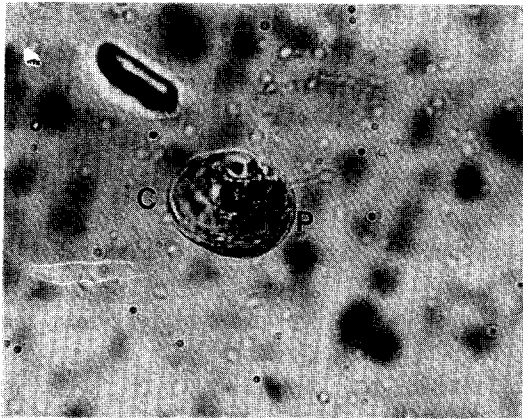


Fig. 9. A cytoplasm fusing with a protoplast (400 x) (C: cytoplasm P: protoplast).

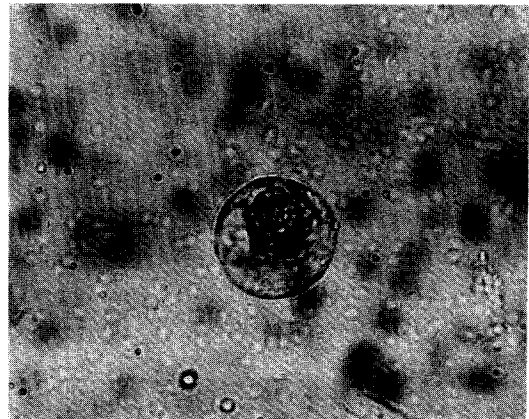


Fig. 10. A completely fused cytoplasm with a protoplast(400 x).

Table 4. Effects of PEG solution on fusion rates of cytoplasts derived from MS Burley 21 cultured callus and protoplasts isolated from mesophyll-tissue of *N. tabacum* Br 64.

Mixed sol. (ratio)		PEG(M. W. 1540) (%)	Fusion rate (%)
Cytoplast	Protoplast		
1	2	30	0
1	2	40	5
1	2	50	15
1	2	60	8

도의 융합률을 보였는데, 이 같은 결과는 원형질체 간의 융합을 재료로 한 결과(27, 30)에 비하여 비교적 낮은 것으로서, 이는 융합 재료로서 많은 양의 protoplasts(31)가 요구되는 것으로 볼 때, 재료로 이용된 cytoplasm의 양이 적었기 때문인 것으로 생각되었다.

세포융합률을 개선하기 위한 방법으로는 electrofusion(22) 등의 기술이 있겠으나, 이는 때때로 세포에 충격을 주거나 fusion medium 내의 전기적 분해로 인한 세포의 파괴(24)를 유발하기도 하기 때문에 불완전한 세포인 protoplast 또는 cytoplasm 등의 융합에는 아직 식물세포에는 세포질적 독성이 크지 않으며 비교적 효과적(26)인 PEG 방법이 안전할 것으로 사료된다. Fig. 9와 10은 protoplast와 cytoplasm의 융합진행과 완전히 융합된 세포체를 보이고 있다.

요 약

세포질 유전형질의 도입을 성공적으로 수행코자 세포질 웅성불임(CMS; cytoplasmic male sterility) 계통의 담배 MS(male sterility) Burley 21의 callus tissue에서 cytoplasm를 분리시키고 이와 *Nicotiana tabacum* Burley 64의 mesophyll protoplast를 PEG방법에 의한 세포융합으로 cybrid cell을 유도할 수 있었다.

cytoplasm의 분리는 density gradient solution의 osmolarity를 일정하게 하는 것보다 gradient간의 차이가 더 효과적이었으며 분리된 cytoplasm의 양은 재료로 이용된 protoplast의 20~30% 정도를 나타내었다. 또한 cytoplasm와 protoplast의 융합은 PEG농도 50%에서 효과적이었다.

감 사

본 연구는 1989년부터 1991년까지 한국과학재단의 연구비 지원으로 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. E. C. Cocking(1960), *Nature*, **187**, 927.
2. N. K. Kao(1977), *Mol. Gen. Genet.*, **150**, 225.
3. H. Lorz and I. Potrykus(1978), *Thero. Appl. Genet.*, **53**, 251.

4. G. Belliard, F. Vadel and G. Pelletier(1979), *Nature*, **281**, 401.
5. I. Potrykus(1973), *Z. pflanzenphysiol.*, **70**, 364.
6. G. An, B. D. Watson and C. C. Chiang (1986), *Plant Physiol.*, **81**, 301.
7. J. Fromm, J. Callis, L. P. Taylor and V. Walbot(1987), *Methods in Enzymol.*, **119**, 351, Academic Press, Orland, Florida.
8. M. Nishiguchi, W. H. R. Langridge, A. A. Szalay and M. Zaitlin(1986), *Plant Cell Reps.*, **5**, 57.
9. H. Lorz(1984), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, **1**, 448, Academic Press, Orland, Florida.
10. H. Binding(1976), *Mol. Gen. Genet.*, **155**, 171.
11. P. M. Bradley(1983), *Plant Mol. Report*, **1-3**, 117.
12. P. M. Bradley(1978), *Plant Sci. Lett.*, **13**, 287.
13. A. Zelcer, D. Ariv and E. Galum(1978), *Z. pflanzenphysiol.*, **90**, 397.
14. H. K. Fakhrai, N. Haq and P. K. Evans (1990), *Methods in Molecular Biology*, **6**, 261, Humana Press, Clifton, New Jersey.
15. M. S. Lesney, P. C. Callow and K. C. Sink (1986), *Plant Cell Reps.*, **5**, 115.
16. T. Murashige and F. Skoog(1962), *Physiol. Plant.*, **15**, 473.
17. M. S. Lesney, P. C. Callow and K. C. Sink (1983), *Protoplasts, Poster Proceedings of the 6th International Protoplast Symposium*, **116**, Birkhäuser Verlag, Basel.
18. H. Lorz, J. Paskowski, C. Dierks-Venthing and I. Potrykus(1981), *Physiol. Plant*, **53**, 385.
19. N. K. Kao(1975), *Plant Tissue Culture Method*, **60**, Saskatchewan Lab. Canada.
20. R. Kanai and G. E. Edwards(1973), *Plant Physiol.*, **51**, 1133.
21. L. Menczel, F. Nagy., Z. Kiss and P. Maliga (1981), *Theor. Appl. Genets.*, **59**, 191.
22. A. Donovan, S. Isaac and H. A. Collin(1990), *Methods in Molecular Biology*, **373**, Humana Press, Clifton, New Jersey.
23. U. Zimmermann and P. Scheurich(1981), *Planta*, **151**, 26.
24. T. Kameya(1984), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, **1,423**, Academic Press, Orland, Florida.
25. W. E. Mercer and R. A. Schlegel(1979), *Exp. Cell Res.*, **120**, 417.
26. F. Constabel(1984), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, **1,414**, Academic Press, Orland, Florida.
27. S. S. So, U. D. Yeo and W. Y. Soh(1986), *Korean J. Plant Tissue Culture*, **13(2)**, 137.
28. J. B. Power and M. R. Davey(1990), *Methods in Molecular Biology*, **6**, 237, Humana Press, Clifton, New Jersey.
29. H. Uchimiya and T. Murashige(1974), *Plant Physiol.*, **54**, 936.
30. I. K. Vasil, V. Vasil, W. D. Sutton and K. L. Giles(1975), *Proceedings IV International Symposium on Yeast and Other Protoplasts*, 82.
31. U. D. Yeo and W. Y. Soh(1983), *Basic Sci. Rev. Ins. Basic Sci., Jeonbug National Univ.*, **6**, 71.