

Viola속 식물의 원형질체 및 융합세포의 전자현미경 관찰

정용모[†] · 임현희 · 손병구* · 서정해** · 정정한*** · 권오창

동아대학교 원예학과
*밀양산업대학교 원예학과
**경남전문대학 조경과
***동아대학교 농화학과

Electron Microscopic Observations of Protoplast and Fusion Cell of Viola Species

Yong-Mo Chung[†], Hyun-Hee Im, Beung-Gu Son*, Jung-Hae Suh**,
Chung-Han Chung***, Oh-Chang Kwon

Dept. of Horticulture, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea

**Dept. of Horticulture, Miryang National University, Miryang 627-130, Korea*

***Dept. of Landscape Architecture, Kyung-Nam Junior College, Pusan, 616-701, Korea*

****Dept. of Agricultural chemistry, Dong-A University Pusan, 604-714, Korea*

Abstract

To obtain a basic information on the development of Genus *Viola*, ultrastructure and electrofusion process between the two protoplasts from wild *Viola* callus cells and pansy mesophyll cells were observed with a scanning electron microscopy(SEM) and transmission electron microscopy(TEM). In the ultrastructural observation of wild *Viola* callus protoplasts and pansy mesophyll protoplasts using SEM, their cell walls were removed completely. A knob-like formation was observed on the enlarged surface of *Viola* callus protoplasts. On the surface of pansy mesophyll protoplasts net-like chloroplasts were observed. In SEM observation of pansy mesophyll protoplasts, chloroplasts devoid of membrane were observed on the surface the protoplasts. Pearl chain was formed by applying AC field of 200 V/cm at 1.0 MHz for 43 sec. The lysis of plasma membranes and fusion process occurred by applying a 1,600 V/cm DC pulse twice for 1 sec. After 1-2 hours of a DC pulse application, it was observed that the two protoplasts were fused completely into one cell. In TEM observation of the fused cell, many small vacuoles were located in the fusion area of the two protoplasts. Indeed, two distinct regions were observed during fusing process ; in one region, a nucleus was found, while in the other region, both nucleus and nucleolus were found.

Key words : Genus Viola, SEM, TEM, Ultrastructure, Electrofusion, Protoplasts, Chloroplasts

[†] Corresponding author

서 론

원예작물에 대한 세포 및 조직배양에 대한 기술은 식물의 무병주 육성, 대량증식 및 원예작물의 개량을 위한 육종 등에 광범위하게 응용되어 지고 있으며, 근년에는 세포공학 및 유전자공학을 이용하여 새로운 세포육종에 관한 연구도 시도되고 있다.

식물의 세포벽이 없는 세포를 원형질체라 하며 세포벽이 없어 타 원형질체와 융합을 유도하여 융합세포를 만들어 새로운 잡종식물, 즉 체세포 잡종식물을 창출 할 수가 있고 더 나아가서 DNA의 도입에 의한 유전적으로 변형된 식물체가 생산될 수 있는 기본적인 연구수단으로 이용할 수가 있다. 그래서 최근에는 고등식물의 내한성, 내서성, 내염성, 약제의 내성, 유용물질 생산, 품종 개량 등을 위하여 여러 분야에 응용되고 있다. 원형질체 분리는 화학적 방법인 효소처리로서 분리 할 수 있고 작물에 따라 적합한 효소의 선정, 조합 및 농도 등 분리조건이 있으며, 원형질체 융합에는 화학적 융합과 전기적 융합이 이용되고 있다. 화학적 융합 방법에는 高 pH - 高 Ca법, PEG법 등이 있으며 최근에는 전기융합이 실용화 되고 있다. 이 방법은 화학적 융합방법보다 조작의 간편성, 잡종세포의 고수득율, 융합과정을 인위적으로 조작할 수 있는 이점이 있어 유망시 되고 있다¹⁾. Morikawa 등²⁾은 담배의 엽육 원형질체를 전기융합하여 잡종세포를 선발 배양해서 shoot와 root를 분화시켜 완전한 중간 잡종식물을 얻었다. 이의 방법은 종래의 PEG법에 비하여 중간잡종의 식물체 창출율이 10배 이상이었다고 보고하였다.

한편, 제비꽃속은 숙근초로서 내음성, 내서성 및 내동성이 강하고 화색이 다양하고 아름다운 꽃이 많아 원예종으로의 이용가능성이 높은 식물이다³⁾. 현재 원예종으로 관상되고 있는 대륜성 Pansy(*Viola tricolor* L.)는 유럽의 야생 제비꽃을 개량한 것으로서 pansy의 결점은 화기가 봄에 한하고 내서성이 약하여 여름을 넘길 수 없고 또 내한성이 약하여 우리나라 남부지방에서만 재배가 가능하고 추운 북부지방에서는 겨울에 동해를 피할 수 있을 정도의 보온을 필요로 하는 결점이 있다.

이와 같은 pansy의 결점을 야생 제비꽃에서 보완시키기 위하여 야생 제비꽃의 엽병조직에서 얻은 callus를 계대현탁배양한 배양세포와 pansy의 엽육조직에서 원형질체를 분

리하여 전기융합한 융합세포로부터 체세포잡종을 얻을 목적으로 여러 가지 실험이 수행된 바 있다⁴⁻¹⁴⁾.

본 연구는 야생 흰제비꽃과 pansy 간의 체세포 잡종식물을 얻기 위한 기초실험으로 두 식물의 원형질체와 융합과정의 세포 표면 미세구조를 주사 및 투과전자현미경으로 관찰하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 원형질체 유리

야생 흰제비꽃(*Viola patrinii* DC.)의 엽병조직으로부터 얻은 callus를 6주간격으로 현탁배양하였다. 배양배지는 Murashige & Skoog 기본(1962) 액체배지에 callus의 덩어리를 1mm mesh에 처서 진탕배양한 배양세포를 1주간격으로 2회 계대하였으며, 계대배양 3일후 원형질체를 분리하였다.

효소처리에는 야생 흰제비꽃의 배양세포는 1% pectolyse Y-23+2% cellulase YC를 5시간, pansy는 가능한 어린 잎을 뒷면의 표피를 벗긴 후 0.5% Macerozyme R-10+1% Cellulase YC 용액을 5시간 동안 40 rpm의 진탕기에서 처리하여 원형질체를 분리하였다. 분리된 원형질체는 200 mesh nylon 망으로 거른 후 100 xg에 4분간 3 회 수세(2.5mM CaCl₂·2H₂O+0.5M mannitol, pH 5.8)하여 정선하였다.^{11,12)}.

2. 원형질체 융합과정의 전자현미경적 관찰

1) 원형질체 융합

전기융합장치로는 Shimadzu somatic hybridizer SSH-1 융합기와 Fusion chamber SSH-CO3를 사용하였다.^{11,12)}.

야생 흰제비꽃의 callus protoplast(백색)와 Pansy의 엽육 protoplast(녹색)를 같은 비율로 10⁶/ml되도록 혼합한 후 Fusion chamber에 주입하여 주파수 1.0MHz의 교류전압(200 volt/cm)을 가하여 pearl-chain이 형성되기까지는 43초가 경과 된 후 직류전압(1600 volt/cm)을 1초 간격으로 2회 pulse 시켰으며, 이때 pulse폭은 50 μ s 이었다.

2) 주사 및 투과전자현미경 시료의 조제

주사전자현미경 시료 조제에 있어서 2% Glutaraldehyde (0.2M sodium cacodylate buffer, pH 7.2)로 2시간 고정 후 1% OsO₄에서 1 시간 재고정 하였다. 그 후 중류수로

수세한 후 ethanol series에 탈수하여 Isoamyl acetate에 치환하였으며, 건조는 cover glass에 부착한 원형질체를 stubs위에 mount한 시료를 critical-point (Hitachi HCP-1)에서 45°C로 10분간 건조하였다. 금이온의 도금은 Ion-Coater(Eiko IB-3)에서 7mA로 10분간 금이온을 증착한 시료를 주사 전자현미경(Hitachi S-4000, 가속전압 15 KV)으로 융합과정을 관찰 하였다¹⁰⁾.

투과전자현미경 시료 조제는 전기융합한 융합세포를 1.2 % sea plaque agarose(FMC Bioproduct, USA)에 매몰하여 1-2 mm³ 크기로 절단해서 3% Glutaraldehyde(0.1M sodium cacodylate buffer, pH 7.2)에 4시간 1차 고정된 다음 같은 buffer solution으로 수세한 후에 1% OsO₄에 3시간(4°C) 후고정 하였다. 그 후 증류수에 수세한 후에 alcohol series (20% - 100%)에 탈수하여 propylene oxide에 치환하였으며 Epon 812 Resin에 포매하였다. 조직의 절편은 diamond knife로 ultracut-N microtome (Reichert - Nissei)을 사용하여 70nm의 두께로 절편하였다. 절편의 염색은 2% uranyl acetate에 20분간 그리고 lead citrate에 5분간 염색한 후에 투과전자현미경(Hitachi H-600)으로 가속전압 100KV로 관찰하였다.

결과 및 고찰

1. 원형질체 표면 및 융합세포의 미세구조

야생 흰제비꽃 callus 배양세포와 pansy의 엽육세포에서 얻은 원형질체의 미세구조의 관찰에서 그림 1-A는 야생 흰제비꽃 callus 배양세포에서 분리한 원형질체로서 세포막이 완전히 용해되어 원형질막(plasmalemma or plasma membrane)이 뚜렷히 보이며 구형의 형태이고, 이 원형질체의 표면확대에는 미립의 요철이 관찰되었다(그림 1-B). Pansy의 엽육유래의 원형질체도 세포막이 잘 용해되어 그물모양의 엽록체가 관찰되었고(그림 1-C), 그림 1-D는 그물모양의 엽록체를 확대한 것으로 불규칙적인 형태의 엽록체가 세포표면에 배열되어 있다.

Pansy의 엽육세포에서 세포막과 원형질막이 용해된 나출 원형질체의 미세구조는 구형의 엽록체가 세포전체를 둘러싸고 있으며 (그림 1-E), 이 나출 엽록체를 확대하였을 때 (그림 1-F,G), 엽록체표면에는 미토콘드리아도 관찰되었다 (그림 1-H).

원형질체는 세포막이 용해되어 원형질막만 존재하는데, 원형질막의 구조는 지질 이중층의 각 외측에 단백질이 덮여 있으나, 요즈음에는 유동성 모자이크모델이 널리 인정되고 있으며, 이 모델에 의하면 원형질막 양쪽에는 인지질층이 있고 일부 단백질은 지질 이중층의 양쪽에 있거나 인지질층을 관통하고 있다고 하였는데¹⁵⁾, 본 실험에서 callus 및 엽육 유래의 원형질체 표면 고배율 확대에서 표면의 작은 융기는 인지질층이 금이온 코팅에 의한 것이라 추정되는 구조가 관찰되었으나 횡단면을 관찰하지 못했기 때문에 원형질막구조를 밝혀 내지는 못하였으므로 타 식물과 동일한지의 여부가 금 후 검토되어야 할 것으로 여겨진다.

융합과정과 융합세포의 미세구조 관찰에는 10⁶/ml 정도 두 원형질체를 혼합한 후 교류전류를 가했을 때 두 원형질체는 원형질막이 상호접촉하여 pearl-chain이 형성하기 시작하였고(그림 1-I), pearl-chain이 완전히 형성된 43초 후 2회 직류전압으로 pulse시켰을 때 원형질막이 파괴되어 두 원형질체가 융합되었으며(그림 1-J), 시간이 경과함에 따라 융합세포는 수복과정을 거쳐 점차 융합되었다(그림 1-K). 융합 약 1시간이 경과되었을 때 융합세포는 완전히 1개의 세포로 되었다(그림 1-L).

그림 2는 융합세포의 주사 및 투과전자현미경으로 관찰한 미세구조이다. 그림 2-A는 융합세포로서 두 세포의 융합부위(실인)가 명확히 관찰되었다. 이 융합세포를 절편하여 그 미세구조를 투과전자현미경으로 관찰한 결과 두세포의 융합부위(실인)에는 다수의 작은 액포가 나열되어 있고 한편의 세포는 핵이 그리고 다른 한편의 세포에서는 핵과 인이 관찰되었다(그림 2-B).

세포 융합은 기본적으로 양 세포막의 접근 및 막 융합으로 이루어지는 것으로서 PEG법의 경우는 PEG의 첨가에 의한 표면전위의 감소에 의해 세포간에 긴밀한 접촉이 일어나고 그 후 고 농도의 칼슘이온 및 알칼리 때문에 막 유동성이 증가하고 인지질층에 의해서 막융합이 일어난다고 생각되며, 전기융합법은 전기자극에 의한 막구조변화를 이용한 것으로 처음은 전기영동에 의한 세포간의 막이 접촉하고 그 다음은 고전압 pulse에 의해 세포막의 일시적 파괴 및 수복과정에 의하여 융합한다¹⁶⁾.

주사 전자현미경의 시료 조제의 과정은 여러 가지 방법들이 있으나^{1,2,12)}, Sato 등¹⁰⁾에 의하면 벼 및 페추니아 원형질체의 고정 용액 및 방법으로 Glutaraldehyde(0.2M

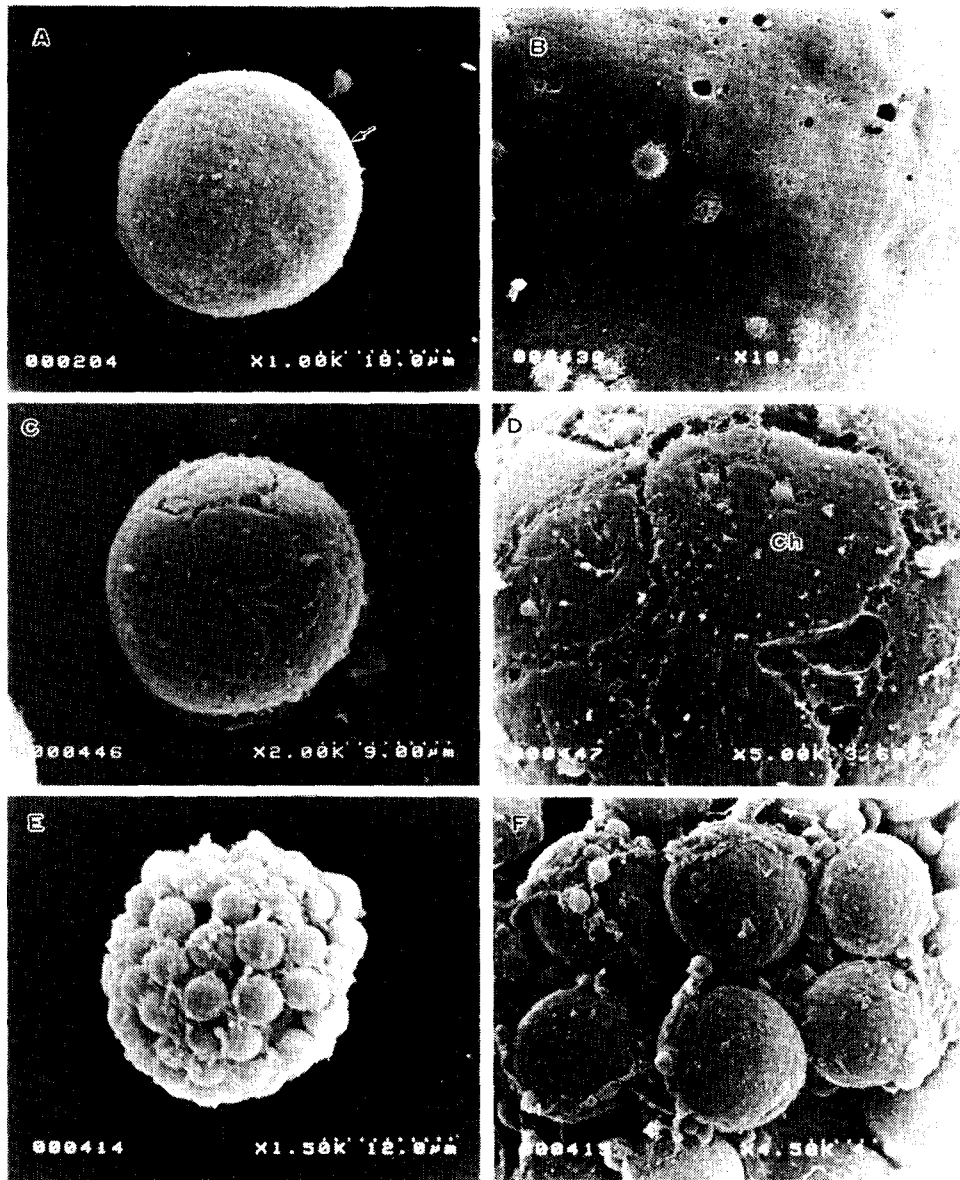
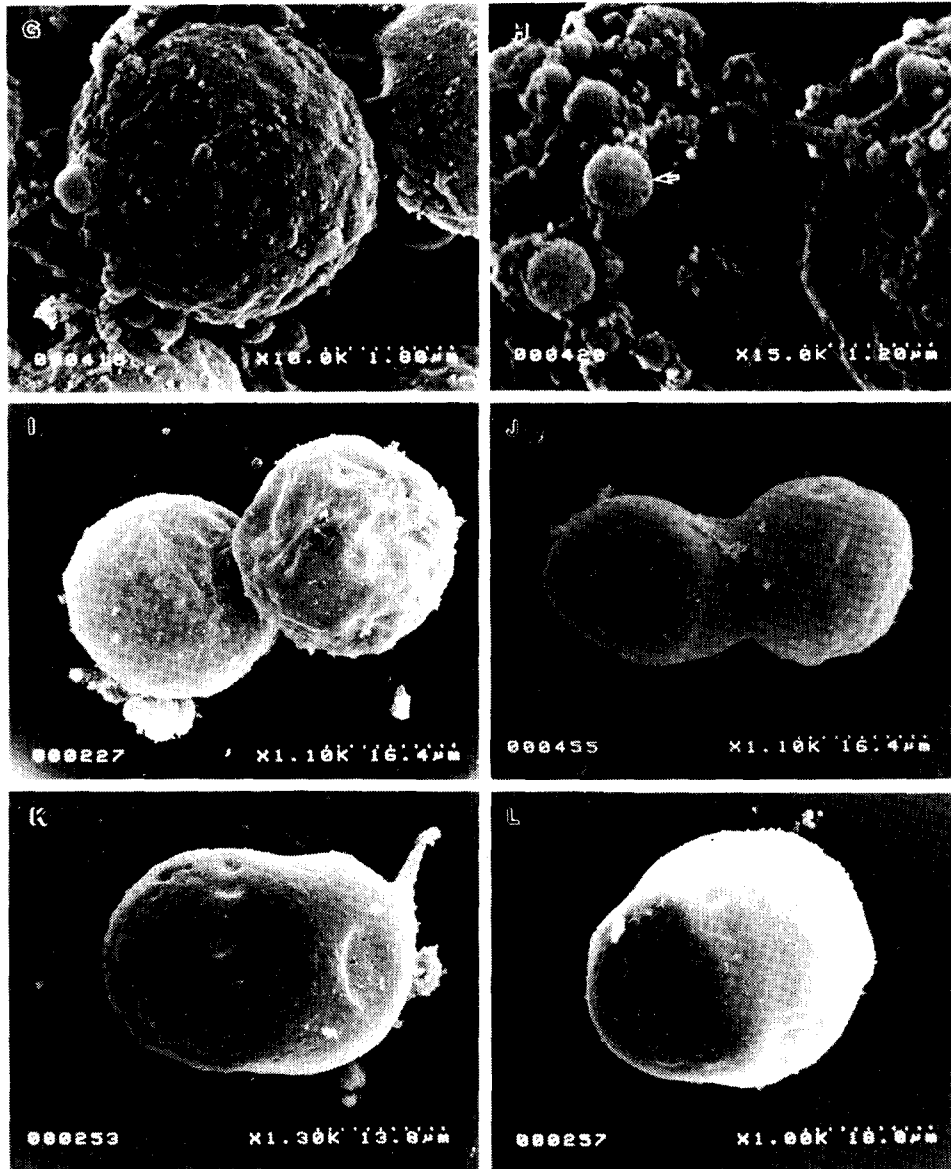


Fig. 1. Scanning electron microscopic observation of surface structure and the fusion process of two protoplasts from wild Viola (*V. patrinii* DC.) and Pansy (*V. tricolor*).
 A : Protoplast of wild Viola ($\times 1,000$).
 B : Surfaces of plasma membrane of viola ($\times 10,000$)
 C : Protoplast of pansy mesophyll ($\times 2,000$)
 D : Surface of pansy mesophyll protoplasts with net-like shapes ($\times 5,000$)
 E : Shape of pansy mesophyll protoplast ($\times 1,500$)
 F : The enlarged structure of pansy mesophyll protoplast ($\times 4,500$)



- G : The enlarged structure of surface of pansy mesophyll protoplast observed after removing of plasma membrane ($\times 10,000$).
- H : The enlarged structure of wild viola protoplast.
(The arrow indicates a mitochondrial structure) ($\times 15,000$)
- I : A pearl-chain formed by applying AC field of 200 V/cm ($\times 1,100$)
- J : Lysing process of plasma membranes occurring after applying a 1,600 V/cm DC pulse twice for 1 sec ($\times 1,100$)
- K : Changes of fusion process caused after 30 min of a DC pulse application ($\times 1,300$)
- L : Formation of a complete fusion product obtained after 1 hour of a DC pulse application ($\times 1,000$)

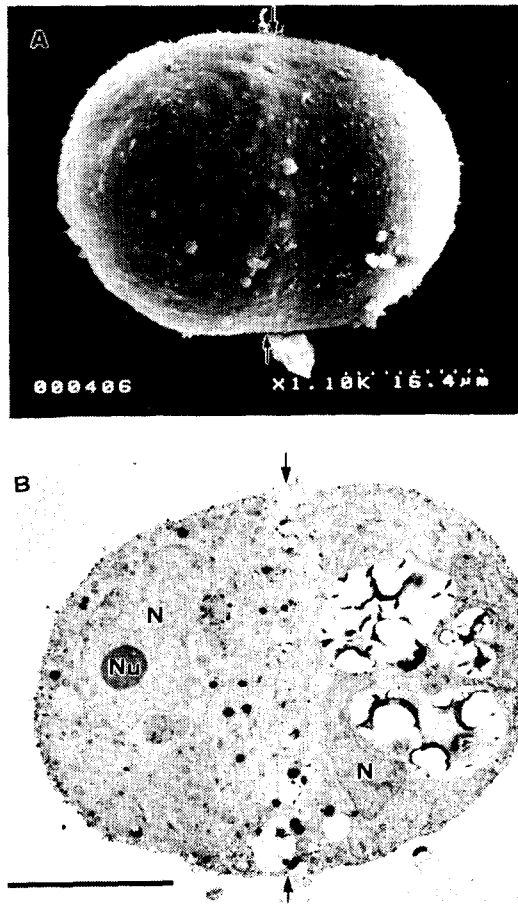


Fig. 2. Scanning electron microscopic and transmission electron microscopic observation of the electro-fusion product obtained between the two protoplasts from wild *Viola* (*V. patrinii* DC.) and *Pansy* (*V. tricolor*).

A : The fusion process showing a distinct fusion region (Arrows) between the two protoplasts.
 B : Small vacuoles located in the center of the fusing cell (Arrows).

Indeed, different structures are found in the two regions.

N : Nucleus, Nu : Nucleous. (Bar is 10 μ m)

Sodium Cacodylate Buffer, pH 7.4)의 2시간 전고정과 1% OsO₄의 1시간 후고정 방법이 원형질체 형태가 변형되

지 않았다고 보고하였으며, 본 실험에서 *viola*속 식물에서도 같은 경향으로 건전하고 깨끗한 주사 전자현미경의 관찰시료를 얻을 수 있었다.

전자현미경에 의한 원형질체의 미세구조와 융합세포의 미세구조에 대하여, Phansiri 등¹⁷⁾은 대두의 원형질체로 융합 5단계, 즉 1) pearl chain의 형성, 2) 원형질막의 파괴 및 수복에 의한 막의 재생, 3) 일부분의 융합, 4) 두 원형질체간의 융합 진행, 5) 구형의 원형질체 형성의 과정을 보고하였다. *Viola*속에 대해서는 Kwon 등¹¹⁾은 야생 *viola*의 배양세포와 *pansy*의 엽육 원형질체의 융합조건 및 환경과 융합세포의 핵 및 세포질 소기관의 변화에 관하여 보고하였으며, 박¹⁸⁾은 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 뇌두 *callus*로부터 분리한 원형질체와 배양된 원형질체의 미세구조변화의 관찰에서 원형질체 분리 직후 *callus*세포에서는 세포내 작은 액포가 많이 형성되어 있었고 배양 원형질체에서는 조면 소포체, 리보솜, mitochondria, proplastid의 수가 현저히 증가함을 보고하였다.

이상의 결과로 건전하고 깨끗한 주사전자현미경의 관찰시료를 얻을 수 있었으며 주사전자현미경에 의한 표면의 미세구조관찰에서 세포막이 완전히 제거된 뚜렷한 구형의 원형질체를 관찰할 수 있었다. 또한 투과전자현미경에 의해 융합부위의 미세구조와 세포내의 소기관들을 관찰할 수 있었다.

요 약

야생 흰제비꽃 *callus*의 세포와 *pansy*의 엽육세포간의 융합과정과 융합 세포의 미세구조를 주사전자현미경으로 관찰한 결과, 야생 흰제비꽃 *callus* 세포와 *pansy*의 엽육세포에서 얻은 원형질체의 미세구조의 관찰에서 야생 흰제비꽃 *callus* 원형질체는 세포막이 완전히 용해된 구형의 형태로서, 표면 확대에서는 요철의 형태와 작은 움기들이 나열되어 있었다. *Pansy* 엽육 유래의 원형질체도 세포막이 용해되어 net모양의 엽록체가 잘 관찰되었고, 엽록체 표면 확대에서도, 원형질체 표면에 작은 움기들이 관찰되었다.

*Pansy*의 엽육 원형질체의 원형질막이 파괴된 나출 엽록체는 구형으로 세포 전체를 둘러 싸고 있으며, 이 나출 엽록체의 확대에서는 나출 미토콘드리아도 확인되었다.

야생 흰제비꽃 *callus* 원형질체와 *pansy* 엽육 원형질체를

fusion chamber 에서 교류 전압을 가한 후 pearl-chain이 형성된 43초 후 1초 간격으로 2회 pulse시켰을 때 두 원형질체의 접촉면의 원형질막이 파괴되어 그 후 수복과정에서 하나의 세포로 융합되었다. 융합 약 1시간이 경과되었을 때 두 세포는 1개의 구형의 세포로 되었다.

투과전자현미경의 관찰에서 두세포의 융합부위가 명확하였고, 두 세포의 융합부위에는 다수의 작은 액포가 나열되어 있었으며 융합세포내의 핵과 인도 관찰되었다.

사 사

이 논문은 1993년도 동아대학교 학술연구조성비(공모과제)에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

1. Togawa, Y., Toda, K., Takayama, S., Miura, Y., Mochizuki, T. and Iwazaki, I.: Cell fusion by electric field. *Shmadzu Rev* **44**, 17-28(1987).
2. Morikawa, H., Sugino, K., Hayashi, Y., Takeda, J., Senda, M., Hirai, A. and Yamada, Y.: Interspecific plant hybridization by electrofusion in *Nicotiana*. *Bio/Technology* **4**, 57-60(1986).
3. 이창복: 대한식물도감. 546-557. 향문사 (1985).
4. 한성호, 이정숙, 권오창: 야생 흰제비꽃(*Viola patrinii* DC.)의 엽병조직으로부터 callus 유기에 관하여. 동아대. *한농기연보* **11**(1), 13-19(1990).
5. 金貞吉: 野生 *Viola*의 栽培에 관한 研究. *群山女大 論文集*(1), 257-263(1979).
6. 金貞吉: *Viola*의 生態에 관한 研究(I): 採集移植后 秋期の 生態調査. *群山大 論文集* **1**, 265-274(1980).
7. 金貞吉: 제비꽃의 繁殖과 開花에 관한 研究. *圓光大. 學位論叢* **6**, 261-273(1981).
8. Kim, K. S., Sun, B. Y., Whang, S. S. and Chung, G. H.: Biosystematic study on the Genus *Viola* in Korea - Comparative Morphology of the *Viola albida* Complex-. *Kor J Bot* **34**, 229-238(1991).
9. Sato, T., Kwon, O.C., Miyake, H., Taniguchi, T. and Maeda, E.: Regeneration of plantlets from petiole callus of wild *Viola patrinii* DC.). *Plant Cell Rep.*, **14**, 768-772(1995).
10. Sato, T., Kwon, O.C., Miyake, H., Taniguchi, T. and Maeda, E.: Evaluation of preparation methods for scanning electron microscopic observation of plant protoplast. *Jpn J Crop Sci* **64**, 288-293(1995).
11. Kwon, O.C., Chung, C.H., Park, J.K., Sato, T., Taniguchi, T. and Maeda, E.: Electrofusion of protoplasts from wild *Viola* and Pansy and the ultrastructure of the fusion products. *Kor J Plant Tissue Culture* **19**, 125-132(1992).
12. Kwon, O. C., Chung, C. H., Sato, T., Taniguchi, T. and Maeda, E.: Ultrastructure of electrofused products from Pansy(*Viola tricolor*) mesophyll and wild *Viola patrinii* petiole callus protoplasts. *Jpn J Crop Sci* **61**, 469-475(1992).
13. 權五昌, 韓成昊, 蔡潤錫, 鄭容謨: 培養組織에 의한 야생 제비꽃의 多量增殖. *東亞大. 韓農技研報* **9**, 17-24(1988).
14. Kwon, O. K., Kim, K. S., Hong, Y. P. and Han, I. S.: Effect of daylength and GA₃ on the conversion from Cleistogamy to Chasmogamy in *Viola mandshurica* W. Becker. *J Kor Soc Hort Sci* **31**, 305-310(1990).
15. Bowes, B. G.: A colour atlas of plant structure. Manson publishing Ltd. pp. 30-56(1996).
16. 長田敏行: 프로토플라스트의 遺傳工學, 講談社, pp. 24-67(1986).
17. Phansiri, S., Taniguchi, T. and Maeda, E.: Morphological study of soybean protoplasts in early electrofusion process. *Jpn J Crop Sci* **60**, 550-557(1991).
18. 朴種範: 人蔘 켈러스로부터 分離 및 培養된 原形質體의 電子顯微鏡的 研究. *植物學會誌* **37**, 183-193(1994).