

茄子科의 葉肉組織 原形質體의 分離 및 融合

權五星 · 金達雄

慶北大學校 農科大學 農學科

Isolation and Fusion of Solanaceous Species Mesophyll Protoplast

Kwon, Oh Sung · Kim, Dal Ung

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

Summary

This study was conducted to identify the enzyme treatment time, enzyme concentration and plant growth condition for isolation of potato mesophyll, it was also performed to determine the adequate sucrose molarity on purification of protoplasts and to investigate the incubation time, PEG concentration and DMSO effect for potato-petunia protoplast fusion.

The results were summarized as follows:

The optimal time of incubation in enzyme solution was 3-4 hours and high humidity and low light intensity made plants more effective to protoplast releasing enzymes. Our experimental results showed that the pectolyase Y-23 was an ideal agent for isolation from mesophyll cultured in vitro compared with macerozyme.

The enzyme solution with 0.5% macerozyme and 2% cellulase was very effective and the purity of healthy protoplast was better in 0.4 and 0.5 M sucrose than in others.

It was revealed that the rate of potato-petunia fusion according to the incubation time with PEG was effective at 30 min incubation and percentage of protoplast aggregation was increased by high molecular weight and concentration of PEG. Percentage of potato-petunia protoplast heteroplasmic aggregation was increased by 4 to 16% in PEG 6000 compared with PEG 4000 and PEG 1500. Addition of 5 to 10% DMSO to the PEG solution increased to the heteroplasmic aggregation of potato-petunia from 2 to 4%.

植物의 原形質體는 最近 20 餘年間 角光을 받으며 研究되고 있는데 이는 裸出된 原形質體는 細胞膜이 없기 때문에 遠緣關係가 먼 다른 植物의 原形質體와 쉽게 融合되기도 하고 原形質體가 植物體로 再生하는 過程 속에서 遺傳的 變異가 일어나며 外部物質 즉, DNA, Virus, 葉綠體, 核, Bacteria 등을 容易하게 攝入할 수 있기 때문이다.

原形質體의 分離 및 培養에서는 植物의 生育 環境이 매우 重要한 것으로 감자의 境遇 Shepard와 Totten¹⁴⁾은 15,000 lux의 照明下에서 生育된 葉肉組織으로부터 얻은 原形質體로 分化에 成功했고, Binding¹¹⁾ 등은 dihaploid로부터 그리고 Thomas¹⁵⁾는 器內培養된 葉, 줄기로부터 分離한 原形質體에서 植物體를 얻었다. 그리고 Grun과 Chu¹³⁾는 3~5日 暗狀態로 葉을 둔 것이 分化 및 分離에 有利하며 分化에서는 ammonium ions이 絶對的 影響을 미친다고 하였다.

細胞融合은 Power¹²⁾ 등이 커피와 옥수수의 根端에서 얻은 原形質體의 融合에 있어서 Sodium nitrate가 效果가 있으며 Keller와 Melchers⁶⁾, Mechers와 Labib⁹⁾은 높은 pH, 高溫, 高濃度의 calcium ion의 融合을 促進시킨다고 했다. Kao와 Michaylik⁷⁾은 polyethylene glycol을 融合處理液으로 使用하였고 PEG의 分子量, 濃度 등이 融合過程에서 重要한 役割을 한다고 했다. 最近 韓國에서는 崔²⁾ 등이 완두와 담배에 있어서 原形質體 融合을 調査하였고 黃⁵⁾이 벼와 綠藻로부터 얻은 原形質體로 融合을 試圖하였다.

이에 本 研究는 감자의 葉肉組織으로부터의 原形質體 分離에 있어서 最適生育環境, 適正酵素濃度, 適正酵素 處理時間 및 純粹分離를 위한 適正 sucrose의 濃度を 밝히며 감자 및 Petunia의 細胞融合에 있어서 PEG의 分子量, 濃度 및 處理時間 그리고 DMSO의 添加 效果를 밝히기 위해 遂行되었다.

本 實驗에 使用된 감자는 1984年 7月 園藝試驗場에서 分讓받은 大地·道園으로서 溫室, 培養室(5000 Lux, 12h light/12h night, 20~24 °C)에서 生育시켰고 器內培養된 葉을 얻기 위해 분열조직을 M-S 基本培地¹⁰⁾에 sucrose 30 g/l, BA 0.5 mg/l, Agar 10 g/l이 든 固體培地에서 키워 줄기가 10 cm 이상 자란 것을 材料로 하였다. Petunia는 'Red cascade' 品種으로 하였으며, 實驗을 위해서 使用된 材料는 葉中 잘 展開된 上位葉을 이용했다. 圃場, 溫室, 培養室에서 採取된 감자의 葉은 40日 程度 지난 成熟 植物體의 上位 7~8일째 葉中 잘 퍼진 것으로 48時間 동안 24 °C의 暗狀態에 두었다. 모든 酵素處理는 表皮를 벗긴 後 1 g의 生體重에 10 ml의 酵素를 處理했고 器內培養된 葉은 5 mm의 크기로 자른 後 表皮를 벗기지 않고 위와 同一하게 處理하였다. 處理된 모든 葉은 26 °C의 暗狀態에 두었고 時間마다 손으로 흔들어 주었으며 原形質體의 數는 hemocytometer로 測定하였다. 原形質體 融合을 위해서는 10 mM CaCl₂, 0.7 mM KH₂PO₄, 0.2 M Glucose의 基本液에 PEG를 W/L로 添加하였고 處理 方法은 30 °C, 2,500 Lux의 照度下에서 1.2 ml의 融合處理液을 Petri-dish(5 cm)의 中央部에 놓고 그 위에 10⁵/ml의 密度를 지닌 0.6 ml의 原形質體懸濁液을 놓은 後 靜置하여 一定時間 以後에 3回 反復, 3回의 sample을 取하여 aggregation率 및 heteroplasmic aggregation率을 調査하였다.

原形質體의 獲得과 純粹分離

生育環境이 감자의 原形質體 分離에 미치는 影響; 0.55 M mannitol의 基本液에 0.5%(W/V) Cellulase, 0.1%(W/V) Macerozyme을 添加한 酵素溶液(以上 E. I.이라 한다)과 2.0%(W/V) Cellulase, 0.5%(W/V) Macerozyme을 添加한

酵素溶液(以下 E.2라고 한다)과 1.5% (W/v) Meicelase, 0.1% (W/V) Pectolyase Y-23을添加한 酵素溶液(以下 E.3라 한다)을 pH5.6으로 맞추고 圃場(F), 溫室(G. H), 培養室(G. C), 器內培養된 葉(I. V)에서 採取한 葉에 各各 4 時間, 6 時間 處理하였다.

감자에 있어서 酵素濃度 別 原形質體分離程度 : 0.55 M mannitol 基本溶液에 0.5% (W/V), Macerozyme 을 固定시키고 0.5, 1, 2, 3, 5% (W/V)의 Cellulase 를 添加한 酵素溶液으로 溫室에서 採取한 葉에 위와 同一하게 處理하였다.

Sucrose 의 密度에 따른 遠心分離의 效果 : 酵素溶液 E. 2에 감자의 葉을 處理한 後 時間 別 分離된 原形質體에 0.01% (W/V) Fluolecein diacetate¹⁶⁾을 MS salt 로 稀釋한 溶液과 1:1로 混合하여 螢光顯微鏡에서 活性도를 調査하였다.

Sucrose 의 密度에 따른 遠心分離의 效果 : 分離된 原形質體를 50 × g로 遠心分離하여 原形質體를 가라 앉히고 0.55 M mannitol 洗滌溶液으로 稀釋시킨 後 다시 50 × g로 遠心分離하여 가라 앉힌다. 密度가 35 × 10⁴/ml인 1 ml의 原形質體 溶液을 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9M의 Sucrose 溶液에 넣어 100 × g로 遠心分離하여 떠 오른 原形質體를 취하여 hemocytometer 로 原形質體의 數 및 찌꺼기의 數를 調査하여 純粹分離率을 求하였다.

原形質體의 融合

PEG 處理時間이 融合에 미치는 影響 : 감자의 原形質體는 品種大地 및 道園의 葉에 E. 2을 Petunia 의 原形質體는 0.7 M mannitol 에 2% (W/V) Cellulase, 0.5% (W/V) Macerozyme 을 넣은 酵素溶液을 各各 4 時間 處理하여 넣었다. 融合處理液은 PEG를 基本液에 W/V로 넣은 後 pH를 5.8로 하였다. 融合時 區別키 위해 Karneya⁶⁾의 方法에 따라 감자의 品

種 大地에서 얻은 原形質體를 neutral red로 染色했다.

Polyethylene glycol 分子量 및 濃도가 融合에 미치는 影響 : 같은 方法으로 얻은 原形質體에 PEG 融合處理液으로 30分 處理한 後 調査하였다.

Dimethyl sulfoxide 의 添加가 감자와 petunia 의 原形質體融合에 미치는 影響 : 融合處理液에 5, 10, 15, 20, 25% (W/V)의 Dimethyl sulfoxide 를 添加하여 30分間 處理하였다.

結果 및 考察

原形質體의 獲得과 純粹分離

生育環境이 감자의 原形質體 分離에 미치는 影響 : 이미 Hughes⁴⁾ 등에 의해 指摘된 것으로 本試驗에서는 도표 1. 에서와 같이 相異한 生育環境을 지닌 감자의 葉肉組織에서 原形質體를 遊離시킨 結果 溫室(G. H)에서 얻은 감자의 葉肉組織에 비해 優秀하였는데 이는 溫室의 濕도가 60 ~ 70% 以上, 照도가 15,000 Lux 以下로 維持된 것에 起因하는 것으로 思料되며 Hughes⁴⁾의 高 濕도와 낮은 照度에서 生育된 葉肉組織이 分離에 有利하다는 것과 一致한다. 다만 培養室(G. C)에서 자란 葉이 分離에 低調한 것은 溫室에 비해 照도가 너무 낮아 從長이 甚했고 이로 因해 葉의 展開가 充分치 못했으며, 또, Shepard¹⁴⁾의 結果와는 달리 E. 1에서 分離가 低調한 것은 葉에 前處理를 하지 않았고 또, 生育環境에 差異가 있었기 때문으로 사료된다. 器內에서 培養된 葉은 無菌作業이 簡便하고 Thomas¹⁵⁾ 등의 報告와 같이 培養에 有利하므로 매우 좋은 材料로 思料되나 E.2에 依한 分離程度는 매우 低調했는데 이는 Pectolyase Y-23에 비해 Macerozyme 의 分解能力이 器內培養된 葉에서는 低調한 것으로 思料되며 특히 Nagata¹¹⁾는 담배의 器內培養된 葉에서 Pectolyase Y-23을 사용하여 빠른 時間 內 많은 原形質體를 얻었다.

Table 1. Effect of plant growth environment on isolation of protoplast from potato mesophyll

Enzyme sol. (%, W/V)	Growth environment			
	F.*	G.H.	G.C.	I.V.
E. 1 **	0.2 ***	4.6	3.2	0.1
E. 2	8.1	46.2	38.4	6.1
E. 3	10.4	44.0	37.8	30.5

* F.: Field, G.H.: Green house, G.C.: Growth chamber, I.V.: In vitro.

** E.1 Cellulase 0.5 Macerozyme 0.1 Mannitol 0.55 M

E.2 Cellulase 2.0 Macerozyme 0.5 Mannitol 0.55 M

E.3 Meicelase 1.5 Pectolyase 0.1 Mannitol 0.55 M

*** x 10⁵/g fresh weight.

酵素濃度別 原形質體 分離程度: 그림 1. 에서 보는 바와 같이 2% 이상에서는若干 떨어지는傾向이 있으며 이는 Scott¹³⁾에 의한 結果와 같다. 比較的 濃도가 높을수록 分離가 빨랐으며 2% 以上에서는 3~4時間에서 1%以下에서는 6~7時間에서 最高가 되었다. 감자에서 Cellulase의 最適濃도가 2%(W/V)로 思料되며 이는 Shepard¹⁴⁾에 비해 매우 높는데 前處理, 및 技術上의 問題로 여겨진다.

酵素處理 時間이 原形質體 分離 및 活性도에 미치는 影響: 原形質體의 分離는 4時間에서 最大가 되었으며 時間의 흐름에 따라 조금씩 떨어지는 傾向이 있으며 活性도는 4時間 處理까지는 90% 以上으로 維持되나 그 以後에는 急激히 떨어졌는데 CaCl₂를 1%(W/V) 넣을 時 分離에 걸리는 時間이 無處理에 비해 1~2時間 늦지만

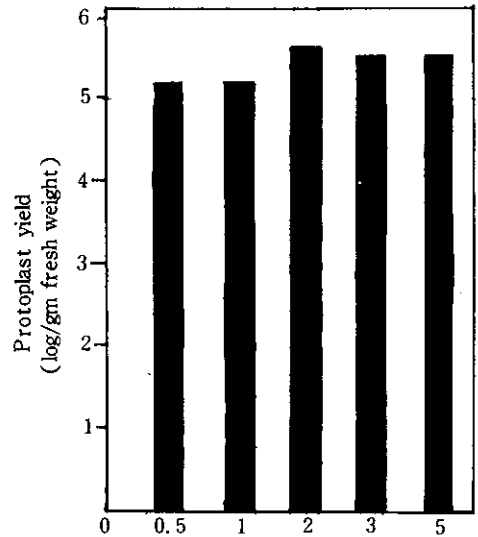


Fig1. Enzyme concentration versus protoplast yield.

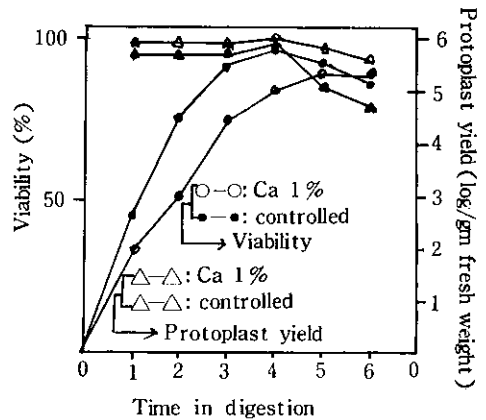


Fig2. Rate of production and viability of protoplast with various incubation time in potato.

Table 2. Relationship between various molarity and purification in potato

	Molarity							
	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
Recovery protoplast (%)	-	22.3	23.5	27.5	28.0	28.6	31.5	34.5
Purification (%)	-	94.0	92.2	90.4	90.0	89.1	83.0	82.2

活性도는 處理 6 時間 以後에도 90 % 以上 維持하고 있었다. 이는 Ca 이온이 膜의 安定性を 높여준 結果로 思料된다.

結果 表 2.에서 보는 바와 같이 Sucrose 의 密

도가 높을수록 回收率은 높았으나 不純物이 많았고 그 分布度는 回收率이 22 ~ 34 % 程度이며 分離의 純度는 82 ~ 94 %이다. 그러므로 감자의 境遇 0.4 ~ 0.5 M의 Sucrose 의 Molarity가 適

Table 3. Relationship between different incubation time with PEG and aggregation activity in potato and petunia

Source	PEG sol.*	Incubation time (min)				
		0	15	30	45	60
Potato	PEG 1500 (50%)**	16.7**	40.9	48.2	40.2	38.2
	PEG 4000 (50%)	28.7	45.3	68.2	73.9	68.1
	PEG 6000 (50%)	26.4	49.5	67.4	72.9	70.2
Petunia	PEG 6000 (50%)	26.4	42.9	58.2	57.7	50.2

* PEG sol. contained with CaCl₂ 10mM, KH₂PO₄ 0.7mM, and glucose 0.2M (pH 5.8)

** Weight/volume

*** Percentage of aggregation

Table 4. Influence of different incubation time PEG treatment on potato - potato (cv. Daeji x cv. Doweon), potato - petunia agglutination

Source	PEG sol.*	Incubation time (min)				
		0	15	30	45	60
Potato - Potato	PEG 6000 (50%)**	6.8***	10.2	14.2	14.2	13.0
Potato - Petunia	PEG 1500 (50%)	2.0	2.1	2.2	2.4	2.1
	PEG 6000 (50%)	6.9	11.2	16.2	16.0	15.0

* PEG sol. contained with CaCl₂ 10mM, KH₂PO₄ 0.7mM and glucose 0.2M (pH 5.8)

** Weight/volume

*** Percentage of heteroplasmic aggregates

Table 5. The effect of PEG 1500, 4000, 6000 concentration on the aggregation activity of potato mesophyll protoplast

PEG sol.*	Conc. (%) **	aggregation efficiency (%)
PEG 1500	25	30.8
	50	40.9
PEG 4000	25	42.5
	50	45.3
PEG 6000	25	45.7
	50	49.5

* PEG sol. contained with CaCl₂ 10mM, KH₂PO₄ 0.7mM and glucose 0.2 (pH 5.8)

** Weight/volume.

正이므로 이를 原形質體 分離 時 使用하면 좋을 것으로 思料된다.

原形質體의 融合

PEG 處理時間이 融合에 미치는 影響 : 감자의 경우 PEG 4,000, 6,000에서는 45分 處理에서 最大가 되었으나 PEG 6,000 petunia 에서는 30 분이 最大가 되었다(표 3). Petunia에서는

감자에 비해 aggregation 率이 낮았는데 이는 Petunia가 時間이 흐름에 따라 破壞되었기 때문이다. 그런데 감자의 두 品種間 融合 및 감자와 petunia 融合에서는 표 4에서 보는 바와 같이 heteroplasmic aggregation 率이 PEG 6,000 處理에서 공히 30分에서 最大가 되었으며 PEG 1,000은 매우 低調하였는데 이는 Kao⁷⁾ 등에 의해 PEG의 分子量에 따른 molarity의 變化로써 說明되었는데 molarity가 높을수록 融合率이 떨어진

Table 6. The effect of various concentration of PEG 1500, 4000, 6000 on potato-potato (cv. Daeji x cv. Doweon), potato-petunia protoplast agglutination

Source	PEG sol *	Conc.(%) **	Percentage of heteroplasmic aggregates
Potato - Potato	PEG 1500	25	2.8
		50	3.2
	PEG 4000	25	10.2
		50	12.4
Potato - Petunia	PEG 6000	25	12.0
		50	14.2
	PEG 1500	50	2.2
		PEG 4000	50
PEG 6000	50	16.2	

* PEG sol. contained with CaCl₂ 10mM, KH₂PO₄ 0.7 mM and glucose 0.2 M (pH 5.8).
** Weight / volume.

Table 7. Effect of molarity of PEG solution on potato-potato (cv. Daeji x cv. Doweon), potato-petunia protoplast agglutination

Source	PEG sol.	Conc.		Percentage of heteroplasmic aggregates
		PEG (%) **	Glucose (M)	
Potato - Potato	PEG 6000	50	0.2	14.2
		50	0.3	14.3
		50	0.4	13.0
		50	0.5	0.0
		40	0.0	4.0
Potato - Petunia	PEG 1500	50	0.03	3.8
		50	0.13	3.7
		50	0.2	16.2
	PEG 6000	50	0.3	15.5
		50	0.4	14.1
		50	0.5	14.1

* PEG sol. contained with CaCl₂ 10mM, 0.7 mM (pH 5.8)
** Weight / volume

다고 思料된다.

Polyethylene glycol 分子量 및 濃度가 融合에 미치는 影響: 감자에서 PEG의 分子量과 濃도를 달리함에 따른 aggregation 率은 表 5에서와 같이 PEG 6,000 50%(W/V)에서 제일 높았고 PEG 1,500 25%(W/V)에서는 30.8% 정도로 매우 낮았다.

그러므로 PEG의 分子量이 높을수록, 濃도가 높을수록 融合이 잘 일어나는 것으로 思料되며 이는 表 6에서와 같이 heteroplasmic aggregation에서도 同一했다.

그리고, 감자의 두 品種間 融合이 감자와 Petunia의 融合에 비해 2% 높았는데 그 原因을 究明할 必要가 있겠다.

融合 處理液의 molarity가 融合에 미치는 影響: 表 7에서와 같이 감자의 두 品種間 heteroplasmic aggregation 率은 0.2 M, 0.3 M glucose에서는 큰 差異가 없었고 0.5 M glucose에서는 4%까지 떨어졌다. 감자와 petunia의 融合에서는 PEG 6,000 일때 glucose의 mole 濃도가 높아질수록 떨어졌으며 PEG 1,500에서 glucose의 mole 濃도를 0, 0.03, 0.13 M로 낮추어 全體 molarity를 떨어뜨렸음에도 불구하고 融合率이 低調하였는데 本 試驗에서는 PEG 1,500이 有效하지 못한 것으로 思料된다.

Dimethyl sulfoxide의 添加가 감자와 petunia의 原形質體 融合에 미치는 影響: 감자의 petunia의 融合에 있어서 DMSO의 效果는 表 8에서와 같이 PEG 4,000에서는 5%의 添加가

各各- 4, 2.6%의 heteroplasmic aggregation 率을 增加시켰다. 또, PEG 4,000에서는 15% 이상의 添加는 오히려 heteroplasmic aggregation 率을 떨어뜨렸다. DMSO의 添加는 原形質體에 害가 되므로 適正濃度를 알기 위해서는 DMSO의 添加에 따른 原形質體의 活性化를 調査해야 한다.

摘 要

감자의 葉肉組織으로부터의 原形質體 分離에 있어서 最適生育環境, 適正酵素 濃度, 適正酵素 處理時間 및 純粹分離를 爲한 適正 sucrose의 濃도를 밝히고 감자 및 petunia의 細胞融合에 있어서 PEG의 分子量, 濃도 및 處理時間 그리고 DMSO의 添加 效果를 밝히기 爲해 遂行되었다.

原形質體 分離에 있어서 生育環境은 高濕度, 낮은 照度에서 生育된 葉肉組織이 有利하였으며 pectolyase Y-23 酵素가 器內培養된 葉에서 原形質體 分離時 좋은 效果를 나타내었다. Cellulase의 濃도는 2%(W/V)가 좋았으며 酵素處理 時間은 3~4 時間이 좋았고 原形質體의 純粹分離는 감자의 境遇 0.4~0.5 M sucrose가 效果가 좋다.

原形質體의 融合 時 處理時間은 公히 30 분이 適當했으며 PEG의 分子量, 濃도가 높을수록 融合率이 높았다.

감자의 두 品種間 融合이나 감자와 petunia의 融合에 있어서도 역시 PEG의 分子量, 濃도가

Table 8. Influence of DMSO and molecular weight of PEG on potato-petunia protoplast agglutination

Source	PEG sol.	DMSO (%) **				
		5	10	15	20	25
Potato-	PEG 4000	16.2 ***	14.2	10.2	9.2	6.2
Petunia	PEG 6000	18.2	20.1	16.2	10.1	5.3

* PEG sol. contained with CaCl₂ 10mM, KH₂PO₄ 0.7mM and glucose 0.2 M (pH 5.8)

** Weight/volume

*** Percentage of heteroplasmic aggregates

높을수록 높았다.

Dimethyl sulfoxide의 添加 效果는 DMSO를

5%에서 10%添加時, 감자와 petunia의 融合

에서 2~4% 融合率이 增加되었다.

引用 文 獻

1. Binding, H., R. Nehls, O. Schieder, S. K. Sopory, and G. Wenzel. 1978. Regeneration of mesophyll protoplasts isolated from dihaploid clones of *Solanum toberosum*. *physiol. Plant* 43; 52-54.
2. Choi, S. J., S. H. Son, and W. C. Chung. 1982. Studies on the isolation, culture and fusion of protoplasts from plant mesophyll cell cultured in vitro. *K. J. C. S.* 27; 147-154.
3. Grun, P., and Lin-Jen Chu. 1978. Development of plant from protoplasts of *Solanum* (Solanaceae). *Am. J. Bot.* 65; 538-543.
4. Huges, B. G., F. C. White, and M. A. Smith. 1978. Effect of plant growth, isolation and purification condition on barley protoplast yield. *Bioisol. Pflanzen* 172; 67-77.
5. Hwang, B., . 1983. Studies on the isolation and fusion of protoplasts from rice cultures cells and algae. *Korean J. Plant Tissue Cult.* 10; 55-59.
6. Kameya, T., . 1975. Induction of hybrids through somatic cell fusion with Dextran sulfate and gelatin. *Japan J. Genetics* 50; 235 - 246.
7. Kao, K. N. and M. R. Michaluk. 1974. A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta*, 115; 1355- 1387.
8. Keller, W. A. and G. Melchers. 1973. Effect of high PH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion. *Z. Naturforsch* 28; 737-741.
9. Melchers, G. and G. Labib. 1974. Somatic hybridisation of plants by fusion of protoplasts I: selection of high resistant hybrids of "haploid" light sensitive varieties of tobacco. *Mole. Gen Genet.* 135; 277-294.
10. Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaccotissue cultures. *Physiol. Plant* 15; 1473-1497.
11. Nagata, T. and S. Ishii. 1979. A rapid method for isolation of mesophyll protoplasts. *Can. J. Bot.* 57; 1820 - 1823.
12. Power, J. B., S. E. Cummins, and E. C. Cocking. 1970. Fusion of isolated plant protoplasts. *Nature* 225; 1016 - 1018.
13. Scott, K. J., J. C. Chin, and C. J. Wood. 1978. Isolation and culture of cereal protoplasts. In: *Proceeding of Symposium on Plant Tissue Culture, Peking, China.* pp. 293 - 315.
14. Shepard, J. F., and R. D. Totten. 1977. Mesophyll cell protoplasts of potato: Isolation, proliferation, and plant regeneration. *Plant Physiol.* 60; 313-316.
15. Thomes, E. 1981. Plant regeneration from shoot culture-derived protoplasts of tetraploid potato.
16. Widholm, J. M. 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cell. *Stian Technology* 47; 181-194.