

植物細胞의 浮游密度를 利用한 融合原形質體의 選拔

金南源 · 朴芝昶 · 金甲植 · 崔光泰

韓國人蔘煙草研究所 遺傳生理部

The Selection of Heterokaryon by the Use of Different Buoyant Density of Protoplasts.

Kim Nam-Won, Jichang Park, Kab-Sig Kim, and Kwang-Tae Choi

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute

Div. of Genetics and Physiology

(Received Oct. 15, 1989)

Abstract

This experiment was carried out to select of heterokaryon based on the different buoyant densities of protoplasts. Protoplasts were isolated from cultured cells (calli) of *Nicotiana tabacum* (cv. BY4) and from mesophyll cells of *N. glauca*.

The two types of protoplasts were fractionated by centrifugation in an iso-osmotic (770 mOs/kg. H₂O) density gradients condition. Major difference in the buoyant density exists between two types of protoplasts isolated from different cells. The mesophyll protoplasts were fractionated in the higher gradient interphases than that of callus protoplasts.

The two types of fractionated protoplasts were fused with 40% polyethylene glycol (PEG), and the protoplasts treated with PEG were separated by centrifugation in the same density gradients condition. The heterokaryons were fractionated in the intermediate density gradients.

序 論

植物細胞에서 cell wall을 成功的으로 除去하여 原形質體를 裸出시킨 이래 이 裸出原形質體를 利用한 研究들이 各 方面에서 매우 活潑히 이루어져 왔다. 그 中에서 많은 研究者들은 人工交配가 不可能한 種, 屬 間에 原形質體融合에 依한 新品種 創成의 꿈을 實現시키고져 많은 努力을 기울여 왔다. 그러나 原形質體融合에는 많은 問題點이 發生하게 되는데 ① 原形質體의 融合 및 培養, ② 融合體의 選拔 및 檢定으로 크게 나눌 수 있겠다.

細胞融合은 또한 融合劑를 利用하는 方法^{1,6,12}과 電氣衝擊에 依한 方法^{10,11,16,17}으로 나눌 수 있겠으나 어떤 方法을 利用하든 融合體의 選拔은 必須의이며 特히 融合體의 選拔은 融合 初期 段階일수록 좋다. 따라서 albino⁸⁾, 藥劑耐性^{7,9)}, amino acid analogue 耐性¹³⁾ 등의 selection marker 들을 갖는 mutant를 fusion partner로 使用하여 왔는데 이 같은 方法은 먼저 mutant를 만드는 것이 어떤 面에서 더 큰 어려움이 될지도 모르며, 育種을 하는 根本的인 目的은 優良形質을 갖는 新品種을 얻기 위함인데 반해 mutant를 利用하는 것은 融合體를 選拔할 수 있는 方法을 提示한 것 뿐이지 새로운 優良新品種을 育成하는 目的과는 거리가 멀게 되는 것이다. 또한 그 밖의 方法들로서 X-ray에 依해 細胞核을 inactivation시키는 方法¹⁵⁾, micromanipulator를 利用하는 方法⁵⁾들을 摸索하게 되었으나 이러한 方法들도 特別한 器具들이 必要할 뿐 아니라 成功率도 높지 못하다. 그러나 植物細胞는 栽培條件 및 部位에 따라서 buoyant density가 다르며⁴⁾, 이를 利用하여 buoyant density가 差異가 나는 두 品種 間에 融合을 한 後, gradient centrifugation을 하게 되면, 가운데 density層에서 heterokaryon이 다른 層에서 보다 많이 分布하게 된다.³⁾

本 實驗에서는 *Nicotiana*屬에서 細胞融合에

依한 新品種育成的의 일환으로 栽培種 中에서 乾燥葉의 品種은 매우 優秀하나 耐病性이 弱한 BY4 品種과 耐病性이 강한 野生種(*N. glauca*) 間에 原形質體 融合을 爲하여 *N. glauca*의 mesophyll에서 裸出시킨 原形質體와 BY4의 callus 組織에서 裸出시킨 原形質體 間에 buoyant density가 顯著하게 差異가 나는 原形質體만을 골라 融合을 시킨 後 中間 density層에서 heterokaryon 形成을 誘導하여 selection marker가 없는, 즉 mutant가 아닌 一般 植物體에서, 細胞들이 갖는 比重을 selection marker로 삼아 融合初期에 heterokaryon을 選拔할 수 있는 方法을 摸索하여 보았다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

Nicotiana tabacum(cv. BY4)의 葉脈을 2mg/1 2,4-D와 0.1 mg/1 kinetin을 含有한 MS solid media (30 g/1 sucrose, 8 g/1 agar, pH 5.8)에서 誘起한 callus와 28°C 溫室에서 自然光으로 栽培한 *Nicotiana glauca*의 完全히 展開된 잎의 mesophyll 組織을 原形質體 裸出用 材料로 使用하였으며 그 外의 mesophyll 組織도 같은 條件에서 栽培하였다.

2. 原形質體의 裸出

Mesophyll 組織의 境遇에는 1% cellulase와 0.1% macerozyme을 混合한 酵素溶液에서, callus 組織의 境遇에는 cellulase, macerozyme, driselase를 各各 2%씩 混合한 酵素溶液에서 35 rpm으로 진탕하면서 overnight (約 18時間) incubation시켰다. 이때 酵素溶液에는 osmoticum으로 8~13%의 mannitol을, 裸出原形質體의 安定性を 維持시키기 爲하여 CPW salts를 添加시켰으며, 裸出原形質體

Table 1. Composition of the iso-osmotic (770 mOs/kg·H₂O) density gradients

Density (kg/ℓ)	Conc. of the gradient components (mM)			
	Sucrose	KCl	MgCl ₂	CaCl ₂
1.0207	0	150.67	93.68	99.00
1.0293	88.60	129.14	80.29	84.86
1.0376	177.20	107.62	66.90	70.71
1.0458	265.80	86.10	53.52	56.57
1.0539	354.40	64.57	40.14	40.43
1.0618	443.00	43.05	26.76	28.29
1.0699	531.60	21.52	13.38	14.14
1.0795	620.20	0	0	0

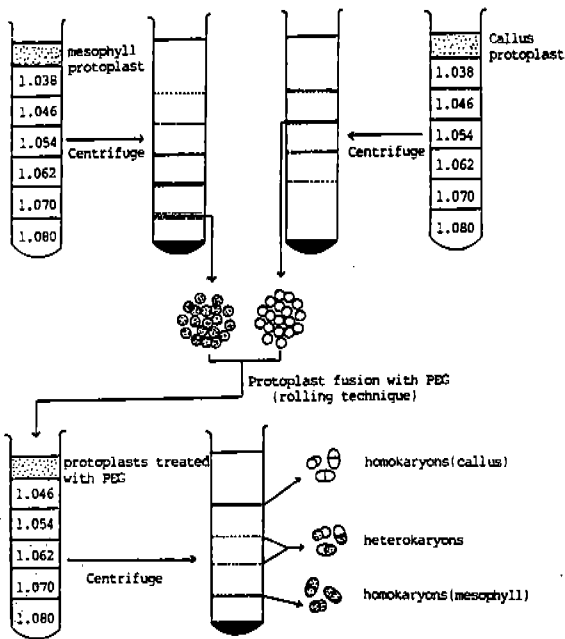


Fig. 1. The scheme of fusion method in iso-osmotic density gradient.

Osmolality가 770 mOs/kg·H₂O가 되는 iso-osmotic density gradient를 만들기 위하여 Table 1과 같은 sucrose, KCl, MgCl₂ 및 CaCl₂의 濃度組成을 만들어 使用하였다. 이 溶液의 組成은 Harms와 Potrykus의 方法⁴⁾과 Wolf 등이 調査한 data¹⁴⁾를 根據로 計算에 依해 만들었다.

4. 原形質體의 融合 및 融合細胞의 選拔

Mesophyll 組織의 境遇 原形質體의 buoyant density가 1.070 ~ 1.080 kg/ℓ되는 細胞를, callus 組織의 境遇 buoyant density가 1.046 ~ 1.054 kg/ℓ가 되는 細胞를 各各 採取하여 40% PEG 溶液으로 融合 處理한 後, Fig. 1과 같이 다시 specific density가 1.046 ~ 1.054 kg/ℓ 사이에서 5段階의 gradients를 나누어 遠心分離시켜 中間層에서 異型集合體(heterokaryon)들을 選拔하였다.

는 適當한 sucrose 溶液으로 purify시켰다.

3. 原形質體의 buoyant density別 分離를 爲한 density gradient의 組成

結果 및 考察

1. 裸出原形質體의 buoyant density別 細胞의 分布

Table 2. Density-dependent distribution profiles of two protoplasts types in iso-osmotic (770 mOs/kg·H₂O) density gradient condition

Density gradient (kg/ℓ)	No. of protoplasts (pplts/ml) from	
	Mesophyll	Callus
1.030 ~ 1.038	1.2 × 10 ⁶ (10.8)	9.5 × 10 ⁵ (18.1)
1.038 ~ 1.046	1.7 × 10 ⁶ (15.0)	2.5 × 10 ⁶ (47.9)
1.046 ~ 1.054	2.2 × 10 ⁶ (18.8)	1.4 × 10 ⁶ (25.8)
1.054 ~ 1.062	2.4 × 10 ⁶ (21.0)	4.8 × 10 ⁶ (9.2)
1.062 ~ 1.070	4.0 × 10 ⁶ (34.4)	0

() : percent

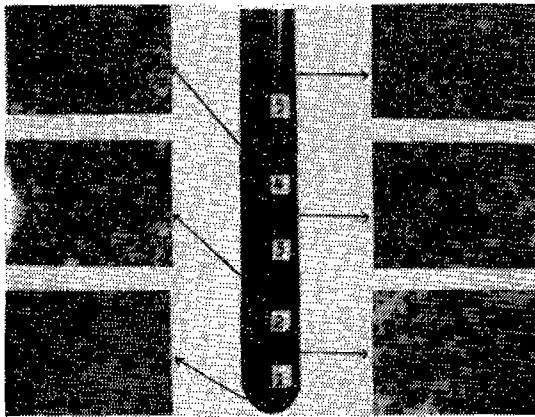


Fig. 2. Density-dependent fractionation profile in iso-osmotic (770 mOs/kg·H₂O) density gradient of *Nicotiana glauca* mesophyll protoplast. Density position 1:1.0699, 2:1.0618, 3:1.0539, 4:1.0458, 5:1.0376 kg/ℓ.

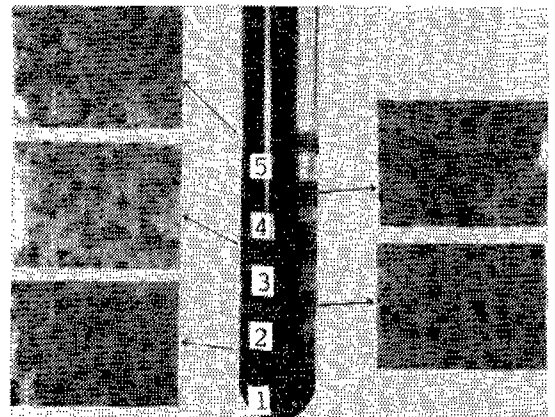


Fig. 3. Density-dependent fractionation profile in iso-osmotic (770 mOs/kg·H₂O) density gradient of *Nicotiana tabacum* (cv. BY4) callus protoplast. Density position 1:1.0699, 2:1.0618, 3:1.0539, 4:1.0458, 5:1.0376 kg/ℓ.

Sucrose, KCl, MgCl₂, CaCl₂ 를 各各 Table 1 과 같은 比率로 混合한 溶液의 境遇 specific density 가 1.0207 ~ 1.0795 kg/ℓ 가 되게 되며, 이때 各 溶液의 osmolality 는 770 mOs/kg·H₂O 로 一定하게 된다. 이와같은 density gradient 에서 mesophyll 組織과 callus 組織으로 부터 isolation 시킨 原形質體의 buoyant density 를 調査하여 본 結果, 그 분

布는 Table 2, Figs. 2, 3 과 같았다.

Mesophyll 組織에서 裸出し킨 原形質體의 境遇 specific density 가 큰 gradient position 에서 原形質體가 많이 分布되었으며, callus 組織에서 裸出し킨 原形質體의 境遇 specific density 가 1.0376 ~ 1.0458 kg/ℓ 에서 47.9 % 로 가장 많은 原形質體가 分布되어 全般的으로

Table 3. Density-dependent distribution profile of tobacco mesophyll protoplasts according to the stalk position in iso-osmotic (770 mOs/kg-H₂O) density gradient condition

Density (kg/ℓ)	Stalk Position of Leaves		
	16 th	11 th	6 th
1.0367 ~ 1.0458	3.75 × 10 ⁴ (0.91)	6.25 × 10 ⁴ (2.15)	3.90 × 10 ⁴ (1.14)
1.0458 ~ 1.0539	4.82 × 10 ⁵ (11.66)	6.61 × 10 ⁵ (22.74)	4.55 × 10 ⁵ (13.28)
1.0539 ~ 1.0618	1.02 × 10 ⁶ (24.78)	9.25 × 10 ⁵ (31.83)	8.66 × 10 ⁵ (25.28)
1.0618 ~ 1.0699	1.38 × 10 ⁶ (33.78)	7.24 × 10 ⁵ (24.92)	1.16 × 10 ⁶ (33.77)
1.0699 ~ 1.0795	1.21 × 10 ⁶ (29.28)	5.34 × 10 ⁵ (18.35)	9.09 × 10 ⁵ (26.52)

() : %

Table 4. Diameter of protoplasts isolated from the leaves of *N. tabacum* (BY4) according to different stalk position and buoyant density gradients

Leaf position	Buoyant density gradient (kg/ℓ)					Mean
	1.0376~ 1.0458	1.0458~ 1.0539	1.0539~ 1.0618	1.0618~ 1.0699	1.0699~ 1.0795	
16 th leaf	32.3	26.2	21.6	25.2	25.5	26.0
11 th leaf	-	32.8	22.1	24.1	25.5	26.1
6 th leaf	-	30.0	36.5	30.0	26.0	30.6
Mean	32.3	29.7	26.7	26.4	25.3	27.6

Unit ; μm

mesophyll 組織에서 裸出시킨 原形質體가 cal-
lus 組織에서 裸出시킨 原形質體보다 density가
큰 것으로 나타났다. 이러한 原形質體들의 buo-
yant density의 差異에 對한 原因을 알아보기
爲하여 담배잎의 差葉位置別, buoyant densi-
ty와 裸出原形質體의 크기를 調査하여 본 結果
Table 3, 4와 같았다.

즉, 葉肉組織에서 裸出시킨 原形質體의 境遇 着
葉位置가 높을수록 buoyant density가 크고
細胞의 크기가 작게 나타났다. 따라서 以上の 結

果를 綜合하여 보면 葉肉組織에서 裸出시킨 原形
質體의 buoyant density가 callus 組織에서
裸出시킨 原形質體보다 크게 나타났는데 이는 細
胞內 內容物의 充實度와 buoyant density와는
매우 密接한 關係가 있다고 할 수 있겠다. 즉 葉
肉組織의 細胞는 培養細胞보다 chloroplast의
量이 많고 vacuole이 차지하는 部分이 적을 뿐
만 아니라 細胞의 크기도 작아 相對적으로 比重
이 크게 나타났다. 이같은 結果는 葉肉組織의 原
形質體를 着葉位置別로 調査한 結果 着葉位置가

높을수록 細胞크기가 작고, 또한 buoyant density가 클수록 細胞크기가 작았으며, 着葉位置가 높을수록 buoyant density가 나타난 것으로 보아 알 수 있겠다.^{Table 3,4)} 또한 귀리, 옥수수, 담배 등 7種의 植物體에서 葉肉, 韌皮, 줄기 및 表皮 組織에서 裸出시킨 原形質體間에 buoyant density를 調査한 結果⁴⁾에서도 品種間에는 差異가 없고 原形質體의 origin에 依한 差異가 크게 나타난 것으로 보아 buoyant density 差異에 依한 heterokaryon의 選抜을 爲해서는 品種間의 差異보다는 어느 部位 어느 組織에서 由來한 原形質體인가가 더욱 重要한 것으로 思料된다.

2. Buoyant density 差異에 依한 heterokaryon 選抜

濃度勾配遠心分離에 依해 分離된 原形質體 中 mesophyll의 原形質體는 specific density가 1.062~1.070 kg/l 部位에서, callus의 原形質體는 1.038~1.046 kg/l 部位에서 各各 buoyant density가 다른 原形質體를 採取하여 40% PEG 溶液으로 遠心分離 tube 內에서 一般적인 混合處理와 rolling technique 方法으로 融合處理하여 이 融合處理된 原形質體를 Fig. 1과 같은 方法으로 specific density가 1.038~1.070 kg/l 까지 5段階가 되도록 density gradient를 두어 遠心分離한 結果, 一般적인 混合處理의 境遇에는 specific density가 가장 낮은 1.038 kg/l의 上部에도 callus의 原形質體가 存在하였으며 또한 1.070 kg/l의 下部에도 葉肉組織의 原形質體가 存在하였다. 더우기 1.046~1.062 kg/l 사이에는 融合原形質體가 거의 存在하지 않았다. 이는 mesophyll의 原形質體와 callus의 原形質體 사이에 buoyant density의 差異가 甚하였기 때문에 融合할 때 tube 內에서 두 種의 原形質體가 서로 接觸할 機會가 적고 같은 種類의 原形質體 사이에 aggregation이 많이 이루어질 確率이 크므로 바람직한 方法이 되지 못하였다. 그러나 遠心分離 tube를 옆으로 누

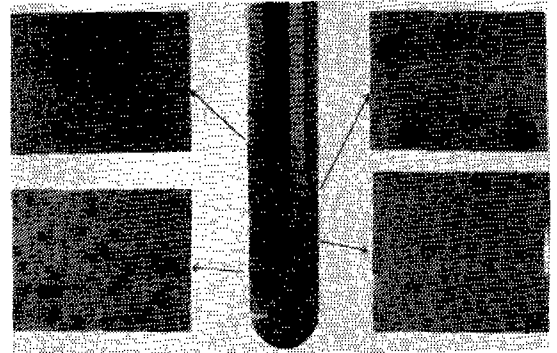


Fig. 4. Density-dependent fractionation profile in density gradients of protoplasts fused between mesophyll and callus protoplasts treated with 40% PEG.

우고 PEG溶液을 넣어 tube를 rolling시키면서 tube 內에 PEG溶液이 coating 되도록한 後 두 品種의 原形質體를 混合하여 tube에 넣고 roller drum에서 30分間 rolling하는 方法을 試圖함으로써 buoyant density가 다른 原形質體間에도 接觸이 頻繁하여 heterokaryon의 形成頻度を 크게 할 수가 있었다. 이와같이 rolling technique에 依한 方法으로 融合處理한 結果, Fig. 4에서 보는 바와 같이 specific density가 1.046 kg/l 上部에서는 그 部位에서 採取한 callus 由來 原形質體間의 homokaryon이 形成되었으며, 1.062 kg/l 下部에서는 mesophyll 由來 原形質體間의 homokaryon이 存在하였다. 그리고 1.046~1.054 kg/l 와 1.054~1.062 kg/l 사이에서는 callus의 原形質體와 mesophyll의 原形質體間에 融合된 heterokaryon들이 多數 存在하였다.

그러나 이때 形成된 heterokaryon의 量은 대단히 적은 數로서, 이와같은 理由는 最初 使用된 原形質體의 數가 많더라도 두 번의 density gradient에 依한 分離로 많은 量의 原形質體가 消失되었기 때문으로 생각된다. 이와같이 buoyant density의 差異를 利用하여 heterokar-

yon을 選拔하고자 하는 努力은 maize의 stem internode 原形質體와 wheat의 mesophyll 原形質體間에 試圖해 본적도 있으나³⁾ 本 實驗에서와 같이 完全히 buoyant density가 差異가 나는 原形質體를 使用한 것이 아니라 light resistant를 selection marker로 갖고 있으면서 全般的으로 buoyant density 分布에 差異가 나는 細胞間에 融合을 實施하여 中間層에서 homokaryon보다 heterokaryon이 多少 많이 分布하도록 하고 이 中間層에서 다시 light resistant를 selection marker로 하여 heterokaryon을 選拔하는 것이 方法으로써 아직 selection marker가 없는 一般 植物에는 適用할 수 없는 方法이라 할 수 있겠다.

그러나 本 實驗에서는 中間層에서 거의 100% heterokaryon을 얻을 수 있기 때문에 centrifuge 方法 (gradient centrifuge)이나 fusion 方法 (electrofusion) 改善 등으로 fusion 率을 大幅 增加시키므로써 centrifuge 段階에서 消失되는 量을 減少시킨다면 selection marker가 없는 一般植物에서도 適用할 수 있을 것이며 特히 融合 初期段階부터 heterokaryon을 選拔할 수 있을 것으로 생각된다.

結 論

植物細胞의 buoyant density 差異에 依해 特別한 selection marker가 없는 原形質體間에 融合 初期에 heterokaryon을 成功的으로 選拔하기 爲하여 *Nicotiana glauca*의 葉肉細胞와 *N. tabacum*의 培養細胞의 buoyant density gradient centrifugation에 依한 heterokaryon의 選拔에 依한 實驗을 한 結果, 다음과 같았다.

1. 裸出原形質體의 buoyant density는 *Nicotiana glauca*의 葉肉細胞가 *N. tabacum*의 培養細胞보다 크게 나타났다.
2. 葉肉組織에서 裸出し킨 原形質體의 境遇 着

葉位置가 높으면 buoyant density는 크고, 細胞의 크기는 작게 나타났다.

3. Buoyant density의 差異에 依해 mesophyll에서 裸出し킨 原形質體와 callus에서 裸出し킨 原形質體間에 PEG를 利用한 融合處理에서 rolling 方法에 依해 融合後 初期에 heterokaryon의 選拔이 可能하였다.

參 考 文 獻

1. Binding, H. 1976. Somatic hybridization experiments in Solanaceous species. *Mol. gen. Genet.* 144:171-175.
2. Gleba, Y.Y. 1978. Microdroplet culture. Tobacco plants from single mesophyll protoplasts. *Naturwiss.* 65:57-63.
3. Harms, C.T. and I. Potrykus. 1978. Enrichment for heterokaryocytes by use of iso-osmotic density gradients after plant protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* 53:49-55.
4. Harms, C.T. and I. Potrykus. 1978. Fractionation of plant protoplast types by iso-osmotic density gradient centrifugation. *Theor. Appl. Genet.* 53:57-63.
5. Kao, K.N. 1977. Chromosomal behaviour in somatic hybrids of Soybean-*Nicotiana tabacum*. *Molec. gen. Genet.* 150:225-230.
6. Kao, K.N., F.C. Constabel, M.R. Michayluk and O.L. Gamborg. 1974. Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells. *Planta*

- 130:215-227.
7. Maliga, P., G. Lazer, F. Joo, A. Nagy and L. Menczel. 1977. Restoration of morphogenetic potential in *Nicotiana* by somatic hybridization. *Molec. gen.* 157:291-296.
 8. Melchers, G. and G. Labib. 1974. Somatic hybridization of plants by fusion of protoplasts. I. Selection of light resistant hybrids of "haploid" light sensitive varieties of tobacco. *Mol. gen. Genet.* 135:277-294.
 9. Menczel, L., F. Nagy, Z. Kiss and P. Maliga. 1981. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum*+*N. knightiana*: Correlation of resistance to *N. tabacum* plastids. *Theor. Appl. Genet.* 59:191-195.
 10. Saunders, J.A., B.F. Matthews and P.D. Miller. 1989. Plant gene transfer using electrofusion and electroporation. In: *Electroporation and electrofusion in cell biology*. Eds: E. Newmann, A. Sower and C. Jordain. 1-31.
 11. Saunders, J.A., L.A. Roskos, S. Mischke, M.A.M. Aly and L.D. Owens. 1986. Behavior and viability of tobacco protoplasts in response to electrofusion parameters. *Plant Physiol.* 80:117-121.
 12. Shielder, O. 1977. Hybridization experiments with protoplasts from chlorophyll-deficient mutants of some solanaceous species. *Planta.* 137:253-258.
 13. White, D. and I.K. Vasil. 1979. Use of amino acid analogue-resistant cell lines for selection of *Nicotiana sylvestris* somatic hybrids. *Thero. Appl. Genet.* 55:107-112.
 14. Wolf, A.V., M.G. Brown and P.G. Prentiss. 1978. *Handbook of Chemistry and Physics*, 59th Edition. CRC Press. D265-D314.
 15. Zelcer, A., D. Aviv and E. Galun. 1978. Interspecific transfer of cytoplasmic male sterility by fusion between protoplasts of normal *Nicotiana sylvestris* and X-ray irradiated protoplasts of male-sterile *N. tabacum*. *Z. Pflanzenphysiol.* 90:397-407.
 16. Zimmermann, H. and P. Scheurich. 1981. High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. *Planta.* 151:26-32.
 17. Zimmermann, H. and J. Vienken. 1982. Electric field induced cell-to-cell fusion. *J. Memb. Biol.* 67:165-182.