

벼의 原形質體 融合에 關한 研究

韓 昶 烈·崔 璋 京
(原子力廳 放射線農學研究所)

Studies on the Fusion of Rice Protoplasts

Harn, Changyawl, and Chang Kyung Choi
(Radiation Research Institute in Agriculture, Office of Atomic Energy)

(1972. 12. 4 접수)

ABSTRACT

Rice callus was treated with 0.56 M sucrose solution mixed with 5% pectinase and 10% cellulase, and the protoplasts isolated were transferred to 0.25 M sodium nitrate to induce protoplasmic fusion.

Callus tissues were macerated well and degradation of cell walls also proceeded satisfactorily.

When the protoplasts were transferred to sodium nitrate solution, many giant roundish protoplasts and some multilobed complex protoplasmic bodies were observed. Most of the fusions took place immediately after the protoplasts were transferred to sodium nitrate. Some multilobed protoplasts which failed to fuse in the initial stage took longer time, about two hours, to get completely fused and rounded-off.

Multilobed protoplasmic bodies were invariably multinucleate, while giant round protoplasts had either several nuclei or had one nucleus of large size. Nuclear fusion, also, seemed to occur immediately after the protoplasts were transferred to sodium nitrate.

緒 論

植物中에는 異種屬間에 交雜이 잘 되는 것도 있지만, 大部分의 境遇 안되는 수가 많다. 交雜이 안되는 것도 그 程度가 區區하여 異種 柱頭上에서 花粉發芽가 안되는것, 花粉管 伸長이 阻害되는 것, 不受精, 受精卵의 卵割不能, 胚 形成不能, 幼胚의 死滅, 成熟 交雜種子의 不發芽, 雜種植物의 不稔等 여러 種類의 交雜不親和가 있다. 이 여러가지 交雜 不和合 中 그 一部는 異種植物間의 花期調節, 幼胚培養, intraovarian pollination (Kanta and Maheshwari, 1963), test-tube fertilization (Kanta and Mahesh-

wari, 1963) 등의 技術로 雜種種子를 얻을 수도 있지만 現在의 技術로는 花粉 不發芽, 花粉管의 不伸長, 不受精 等を 人爲的으로 可能하게 하지는 못한다.

萬一 異種屬間에 雜種을 마음대로 만들 수 있다면, 이는 植物學, 育種學 等の 研究 및 實地 利用에 큰 도움이 될 것이다. 植物學에서는 異種屬間의 類緣關係, 水平進化의 究明, 新種屬의 合成 等を 通해 新分類學, 進化學의 發展에 貢獻이 될 것이고, 育種學에서는 雜種植物의 利用, 近緣植物이 保有하고 있는 耐性遺傳子의 導入에 實用價値가 될 것이다 (韓, 1972; 韓, 1972).

動物에서는 遠緣動物의 細胞間에도 細胞融合이 잘 일어난다 (大山, 1972). 植物細胞는 動物

과 달라서 주로 cellulose로 된 細胞膜으로 싸여 있기 때문에 細胞間에 融合이 일어날 수가 없다. 이런 植物細胞에서도 細胞膜을 除去하여, 原形質體만을 裸出 시킨으로써 異種原形質體間에 融合을 시킬 수 있다면, 植物細胞는 動物과 달라서 全體形成能을 가지고 있기 때문에 이런 雜種細胞에서 雜種植物을 만들어 낼 수 있을 것이다.

Cocking (1960)이 cellulase를 써서 tomato의 根端에서 原形質體를 分離 시킨 以來 여러 高等植物에서 酵素에 의해 原形質體를 分離시킬 수 있게 되었다 (Ruesink and Thimann, 1966; Power and Cocking, 1969; Otsuki and Takebe, 1969). 또한 最近에는 이런 裸出된 原形質體를 다시 細胞膜을 形成하게 하여 (Takebe, 1971) 完全한 植物細胞로 還元 시킨 後, 이 細胞에서 植物體를 再分化시키기도 하였다 (Takebe *et al.*, 1971; Grambow *et al.*, 1972). 한편 Power *et al.* (1970)은 分離한 燕麥의 原形質體를 0.25 M NaNO₃로 處理 함으로써 原形質體融合을 시켰고 또 그眞否에 對해 論難은 있지만, Miller *et al.* (1971)은 大豆에서, Grambow *et al.* (1972)은 當근에서 各各 原形質體의 融合을 報告하였다.

以上과 같은 原形質體의 分離, 原形質體에서 다시 細胞膜의 形成 및 植物體의 再分化, 同種 原形質體의 融合 등의 研究가 今後 많은 高等植物에서 이루어지면, 異種屬植物間의 原形質體融合 即 細胞雜種에 의한 雜種植物의 獲得도 可能한 것이다 (Schenk and Hildebrandt, 1968; Nickell and Torrey, 1969; Takebe, 1971; 韓 1972).

本 研究는 벼에서 原形質體의 融合을 誘起시키기 爲해 實施 하였은 바 그 結果의 一部를 報告 하고자 한다.

材料 및 方法

材料로서는 벼品種 八達을 藥培養해서 얻은 半數性 callus를 使用하였다. 이 callus들은 出穗 數日前의 藥의 一核性小孢子에서 由來된 것이어서 當初 半數性이었지만, 二年餘 繼代培養을 하였기 때문에 現在의 ploidy는 確實하지 않다.

Callus組織을 解離시켜 遊離單細胞群을 만듦과 同時에 細胞膜을 除去키 爲해 callus塊들을 0.56 M sucrose에 5% pectinase와 10% cellulase를 混合한 液 (pH 5.6)에 넣고 28°C에서 매대로 振盪하면서 5時間 處理하였다. 이때 pectinase는 組織의 解離를, cellulase는 細胞膜 除去를 爲해, 또 sucrose는 plasmolyticum으로 各各 使用되었다. 이들은 모두 蒸溜水 또는 pH 6.0의 0.02 M phosphate buffer液에 溶解시켜 使用했지만 蒸溜水와 phosphate buffer 間에 差異는 없었다.

處理後 解離되지 않은 callus의 殘渣를 gauze 1枚로 걸터 除去하고, 原形質體의 懸濁液은 0.56 M sucrose로써 100G의 遠心分離를 數回 反復하면서 洗滌하였다. 酵素가 除去된 後 plasmolyse된 原形質體를 若干 deplasmolyse시킨과 同時에 融合을 시키기 爲하여 이를 0.25 M sodium nitrate에 옮겨 주었다 (Power *et al.*, 1970).

結果 및 考察

原形質體의 分離

Callus組織의 解離나 細胞膜의 分解 등은 極히 잘 된다 (Fig.1). 一部 原形質體中에 plasma-lemma가 破裂되어 液胞가 tonoplast에 싸여 原形質體의 本體에서 벗어난 것 (Fig.2)도 있으나 그 數가 그다지 많은 것은 아니다.

比較의 目的으로 同一品種의 根端組織을 같은 方法으로 處理하였는 바 解離는 極히 잘 되어 多數의 遊離單細胞群을 얻을 수 있었으나 細胞膜의 分解는 잘되지 않았다. 그 理由는 根端에서는 分裂組織 部位의 細胞들만 原形質體로 分離가 되고 餘他の 部位의 것은 cellulose 膜의 分化가 더 進行되었기 때문에 本 方法으로는 溶解가 잘 안되는 것 같다.

原形質體의 融合

原形質體를 sucrose에서 sodium nitrate로 옮겨 있을 때 顯著的 現象은 巨大圓形 原形質體가 많이 나타나고 (Fig.3) 그 밖에는 少數의 巨大하고 不規則한 複合原形質體가 생긴다 (Fig.4)는 것이다.

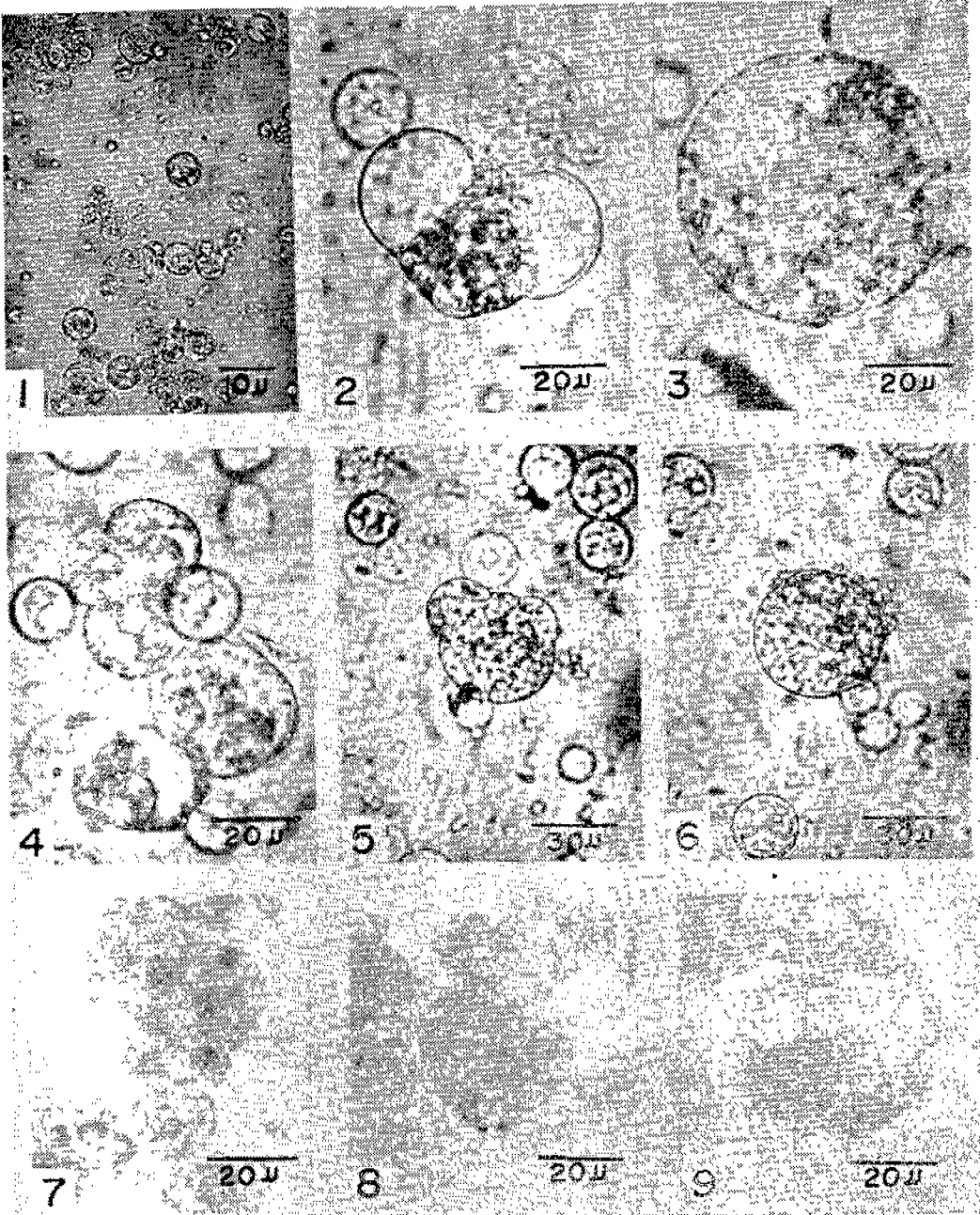


Fig. 1. Protoplasts isolated from callus tissues of rice.
 Fig. 2. Plasmalemmae were ruptured and vacuoles were surrounded by tonoplasts.
 Fig. 3. A giant protoplast formed by the fusion of several smaller protoplasts.
 Fig. 4. Multilobed protoplasmic structure.
 Figs. 5, 6. Protoplasts undergoing fusion (Fig. 5) and resulted protoplast (Fig.6).
 Figs. 7~9. Multilobed protoplast (Fig. 7) and giant round protoplast (Fig. 8) with their nuclei still unfused, and giant protoplast with fused single large nucleus (Fig. 9).

元來 原形質體를 0.56 M sucrose에서 0.25 M NaNO₃에 옮기면 原形質體에 deplasmolysis가 생겨多少 커지는 傾向은 있지만 그 程度는 極히 微小하다. 이런 巨大한 圓形原形質體들은 單細胞 由來의 原形質體들이 여러 個가 融合되어 생겼다고 생각되기에 巨大複合原形質體의 變化를 追跡해 보았다. Sodium nitrate에 옮긴지 15分 後에 發見된 複合原形質體의 變化를 보면 最初 여러개의 原形質體가 모여 複合體로 되어 있는 것이 (Fig. 5) 時間의 經過와 더불어 漸漸 融合이 進行되어 마침내 한 個의 巨大圓形原形質體로 되어 버린다 (Fig. 6). 融合 始作에서 끝날 때까지의 時間은 一定하지 않지만 大概 數十分에서 2~3 時間 걸리는 것 같다.

Sodium nitrate에 옮긴 直後에 벌써 多數의 巨大圓形原形質體가 나타나는 것으로 보아 融合은 sodium nitrate에 옮긴 後에 瞬間的으로 일어나는 것이라 推測된다. 그리고 時間이 經過된 後에 融合되는 境遇에는 完全히 融合되는데 많은 時間을 要하는 것 같다.

Sucrose 溶液에서도 間或 融合現象은 있는 것 같지만 sodium nitrate에 比하면 極히 적게 發見된다 (Table 1).

Power *et al.* (1970)은 sodium nitrate에서 原形質體가 融合되는 것은 原形質體의 deplasmolysis 現象과 plasmalemma의 電氣的 性質의 變化가 原因일 것이라고 하였지만, 原形質體를 融合시킨다는 것은 그리 簡單한 것이 아니기 때문에今後 여러 理化學的 方法이 研究되어야 할 것이다.

Table 1. Fusion of protoplasts in sucrose and sodium nitrate

	No. of intact protoplast	No. of round giant protoplast	No. of multilobed protoplasmic body
0.56 M sucrose	85	3	0
0.25 M sodium nitrate	142	11	6

核融合

前記의 原形質體融合이라는 것은 plasmalem-

ma나 原形質體의 外觀上의 融合을 말한 것이고 이런 融合이 반드시 核融合은 아닐 것이다. 實地로 重要的 것은 果然 核融合이 原形質體의 外觀上의 融合과 平行해서 圓滑히 進行되는가의 與否이다.

Sucrose에서 nitrate에 옮긴 30分 後의 原形質體를 aceto-carmine으로 染色하였더니 巨大複合原形質體는 全部 多核 (Fig. 7), 巨大圓形原形質體는 多核 (Fig. 8) 또는 單一 巨大核 (Fig. 9)으로 되어 있었다. 그 以外에 巨大原形質體는 아니지만 적어도 2個 以上の 原形質體가 融合해서 생긴 것이라고 推測되는 것들은 모두 單一核으로 되어 있었다. 이런 點으로 보아 原形質體 融合은 核融合까지도 同時에 隨伴하고 또 核融合 亦是 瞬間的으로 일어나는 것 같다.

摘 要

며 八達의 藥培養에 依해 얻은 1核性 小孢子 由來의 callus組織을 5% pectinase와 10% cellulase를 混合한 0.56 M sucrose로써 處理하여 原形質體를 分離시키고 이것을 다시 0.25 M sodium nitrate에 옮김으로써 原形質體融合을 시켰다.

Callus組織은 解離 및 原形質體의 分離가 모두 잘 된다. Sucrose에서 sodium nitrate로 옮기면 巨大圓形原形質體가 多數 생기고 그밖에 少數이지만 巨大複合原形質體가 나타난다. 原形質體의 融合은 nitrate로 옮긴 直後에 瞬間的으로 일어나고 時間이 經過後에 融合되는 것은 完全 融合에 많은 時間을 要한다. 巨大複合原形質體는 多核性이고 巨大圓形原形質體에는 多核으로 된 것, 單一 巨大核으로 된 것들이 있다. 原形質體 融合時 核融合도 同時에 瞬間的으로 일어나는 것 같다.

參 考 文 獻

Cocking, E. C., 1960. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*, 187: 962-963.
Grambow, H. J., K. N. Kao, R. A. Miller, and

- O. L. Gamborg, 1972. Cell division and plant development from protoplasts of carrot cell suspension cultures. *Planta (Berl.)*, 103: 348-355.
- 韓昶烈, 1972. 原形質培養과 體細胞雜種. 식회지, 15: 84-88.
- _____, 1972. 育種技術의 改良. 육종지, 4 (2): 144-151.
- Kanta, K. and P. Maheshwari, 1963. Intra-ovarian pollination in some *Papaveraceae*. *Phytomorphology*, 13 (3): 215-229.
- _____ and _____, 1963. Test-tube fertilization in some *Angiosperms*. *ibid*, 13 (3): 230-237.
- Miller, R. A., O. L. Gamborg, W. A. Keller, and K. N. Kao, 1971. Fusion and division of nuclei in multinucleated soybean protoplasts. *Can. J. Genet. Cytol.*, 13: 347-353.
- Nickell, L. G. and J. G. Torrey, 1969. Crop improvement through plant cell and tissue culture. *Science*, 166: 1068-1069.
- Otsuki, Y. and I. Takebe, 1969. Isolation of intact mesophyll cells and their protoplast from higher plants. *Plant and Cell Physiol.*, 10: 917-921.
- 大山勝夫, 1972. 高等植物의 組織培養. 蠶糸科學と技術, 11: 54-57.
- Power, J. B. and E.C. Cocking, 1969. A simple method for the isolation of very large numbers of leaf protoplasts by using mixtures of cellulase and pectinase. *Biochem. J.*, 111 (5), *Proc. Biochem. Soc.*, 33p.
- _____, S. E. Cummins, and E. C. Cocking, 1970. Fusion of isolated plant protoplasts. *Nature*, 225: 1016-1018.
- Ruesink, A. W. and K. V. Thimann, 1966. Protoplasts: Preparation from higher plants. *Science*, 154: 280-281.
- Schenk, R. V. and A. C. Hildebrandt, 1968. Somatic hybridization: A new approach to genetic change. *Amer. Jour. Bot.*, 55: 731.
- Takebe, I., 1971. Protoplasts from higher plants: A new experimental system for cell biology. *Symposia Cell. Biol.*, 22: 205-212.
- _____, G. Labib, and G. Melchers, 1971. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Naturwissenschaften*, 58: 318-320.