
碩士學位論文

電氣刺戟에 의한 제라늄 (*Pelargonium zonale*
hybrids) Protoplast의 융합과 Callus 生成

濟州大學校 大學院

農化學科



1992年 6月 日

電氣刺戟에 의한 제라늄 (*Pelargonium zonale*
hybrids) Protoplast의 융합과 Callus 生成

指導教授 柳 長 杰

金 良 錄

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함

1992年 6月

제주대학교 중앙도서관
金良錄의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 柳 基 中 (인)
委 員 蘇 寅 燮 (인)
委 員 柳 長 杰 (인)

濟州大學校 大學院

1992年 6月 日

ELECTROFUSION OF GERANIUM (*Pelargonium zonale*
hybrids) PROTOPLASTS AND CALLUS FORMATION

Kim, Yang-Lok

(Supervised by Professor Zang-Kual U.)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL
FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF AGRICULTURE

DEPARTMENT OF AGRICULTURAL CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1992. 6. .

목 차

Summary	3
I. 서 론	5
II. 재 료 및 방 법	7
1. 종자의 발아 및 배양	7
2. Callus 유기 와 배양 및 식물체 재생	7
1) NAA 와 BA 농도에 따른 Callus 유기 및 성장	8
2) Callus 성장곡선	8
3) Growth regulators 에 의한 식물체 재생 조건	8
3. Protoplast 분리	10
1) 공시 재료	10
2) 효소 농도 조건	10
3) 효소 처리시간	11
4) 분리 방법	12
4. Protoplast 융합	13
1) 전압 및 주파수 조건	13
2) 융합	14
5. 융합된 protoplasts 배양	14
1) 배양에 관련되는 요인	14
2) 배양 과정	16

III. 결과 및 고찰	17
1. Callus 유기 와 배양 및 식물체 재생	17
1) NAA 와 BA 영향	17
2) Callus 성장 곡선	18
3) 식물체 재생에 미치는 growth regulators 의 영향	20
(1) NAA 와 BA 농도	20
(2) IAA 와 kinetin 농도	21
(3) Thidiazuron 과 Fulmet 농도	23
2. Protoplast 분리	24
1) 효소 농도의 영향	24
2) 효소 처리 시간의 영향	26
3. Protoplast 융합을 위한 전압 및 주파수 조건	27
4. 융합된 protoplasts 배양에 있어서 세포 분열 및 colony 형성 조건	31
1) 기본 배지	31
2) 당 종류 및 농도	33
3) 삼투압 조절제로서의 sorbitol 농도	34
4) 배양 밀도	36
5) Growth regulators 의 농도	37
V. 적 요	41
VI. 참고 문헌	43

Summary

The conditions of protoplast isolation from leaf callus, electrofusion, and fused protoplasts culture were examined in order to establish a somatic hybrid using *Pelargonium zonale* hybrids "Ringo red" and "Ringo white". The concentration of growth regulators and the nutrient media affecting callus formation and plant regeneration were investigated.

Callus induction and growth was most efficient at the NAA 3 ppm and BA 0.5 ppm combination and the growth rate was highest at 16 to 20 days after culture initiation.

Although shooting from the callus was infrequently found at the combinations of NAA(1, 2 and 3 ppm) + BA(0.1 and 0.25 ppm), IAA(2 and 3 ppm) + kinetin(0.1 and 0.25 ppm), and IAA(0.1 and 0.25 ppm) + kinetin(2 and 3 ppm), much higher shooting capability(60 %) was shown at the combination of Thidiazuron(5 ppb) + Fulmet(5 ppb).

12 hour-treatment of 4 % Cellulase Onozuka R-10, 0.5 % Macerozyme R-10, 0.3 % Hemicellulase, 0.3 % Pectolyase and 0.6 M sorbitol (pH 5.8) was most efficient for the protoplast isolation with the yield of of 3.2×10^5 protoplasts/ml.

The optimum condition of protoplast fusion was 1 MHz of AC frequency with 40 V/cm of amplitude for 15 sec followed by 0.5 kV/cm of DC amplitude for 60 μ sec.

The cell division in protoplast culture was most active in the KM-8P media and the colony formation in the IAA liquid media.

The 0.2 M glucose + 0.2 M fructose medium containing 0.2 M sorbitol as an osmoticum and 2 ppm NAA + 0.5 ppm BA with 1×10^5 protoplasts/ml of culture density seemed to be most suitable for cell division and colony formation.

Under the above conditions, the cell wall regeneration of the fused protoplasts was found 2 days after the protoplast cultivation, the first cell division 4 days, the 2nd cell division 7 days, the 3rd or the 4th 10 days, and the colony formation 15 days. After 8 weeks the divided cells were transferred to the MS solid medium and the callus formation was observed at the 12th weeks from the protoplast culture.

I. 서론

새로운 품종을 창출하기 위해서 그 동안 많이 사용되어 왔던 돌연변이 육종법과 교잡 육종법은 유용 형질의 획득 빈도가 희박하거나 동원되는 인력, 장비 및 시간이 대규모로 소요되는 단점이 있다. 한편, 세포 융합 방법은 동종은 물론 다른 종속간의 체세포 잡종 식물을 만들 수 있기 때문에 단순한 방법에 의한 유용 형질의 도입 혹은 조합이라는 차원에서 첨단 기술로 각광 받아왔다

그동안 개발된 세포 융합 방법으로는 높은 pH 와 PEG 등의 화학물질을 사용하는 화학적인 방법(Korth et al., 1974; Menczel and Wolfe, 1984; Kim et al., 1986)과 전기적인 충격법(Koop, 1985; Bates 1985; Bates and Hassenkamp, 1985; Tempelaar and Jones, 1985) 등이 있다. PEG 법과 같은 화학적인 방법은 촉진 물질이 비교적 높은 농도로 사용되기 때문에 그 화합물 자체가 세포에 독성을 주어 융합 효율이 낮다고 알려져 있으나(Senda et al., 1979), Zimmermann(1981)에 의해 개발된 전기융합 방법은 단순한 조작으로 짧은 시간에 높은 융합율을 얻을 수 있고 융합된 heterokaryon 의 분리가 쉬우며, 단일 세포쌍 만의 융합도 가능하여 선택적인 세포 융합을 유도 할 수 있다(Bates et al., 1983; Morikawa et al., 1988). 또한 전기융합에 의한 protoplast 융합 방법은 PEG 나 다른 융합 방법에 비해 융합율과 융합된 protoplasts 의 생존율을 높일 수 있으며(Zimmermann and Vienken, 1982), 생리적 조건도 매우 효과적인 상태에서 진행될 수 있다고 하였다(Scheurich and Zimmermann, 1981).

본 실험에 사용된 Geranium 은 *Pelargonium* 속의 사계성 화훼식물로서, 유럽과 歐美 등지에서 베란다나 화단용으로 가장 많이 재배되고 있으나, 우리나라에서는 널리 보급되어 있지 않은 실정이다. 최근에 Geranium 의 야생종에 대한 많은 연구가 이루어 지고 있는데, 그 이유는 야생종 Geranium 이 갖고 있는 병충해에 대한 저항성과 다양한 꽃색깔등의 유용 형질을 도입한 hybrida 창출에 관심이 모아지고 있기 때문이다.

이러한 Geranium 의 품종개량을 위한 protoplast 융합에 관한 연구는 외국에서 많이 이루어지고 있고(Koop et al., 1988), 또한 융합된 protoplasts 를 배양하여 식물체가 재생됨을 보고하고 있다(Yarrow et al., 1987). 반면 우리나라에서는 다른 식물의 protoplast 배양을 통한 식물체 재생에 관한 연구는 몇가지(Chung et al., 1985; Kim et al., 1988; Chung and Kim, 1988; Jee and Chung, 1989) 가 있으나 Geranium 을 이용한 연구는 소수(유, 1988)에 그치고 있는 실정이며, 이 연구 또한 많은 품종을 다루다 보니 자세한 protoplast 분리 조건이나 전기 융합 조건, 생존율 및 protoplast 배양 조건 등의 조사가 미흡하였다.

따라서 본 연구는 Geranium 의 체세포 잡종을 이용한 품종 개량의 기본 연구로서, *Pelargonium zonale* hybrids "ringo red" 와 "ringo white" 을 재료로 사용하여 callus 유기 와 배양 및 식물체 재생, protoplast 의 분리와 융합, 융합된 protoplasts 배양 등에 관여하는 인자 들을 검토하여 우수 체세포 잡종창출의 가능성을 찾고자 본 실험을 수행하였다.

II. 재료 및 방법

본 실험에 사용한 *Pelargonium zonale* hybrids “Ringo red” 와 “Ringo white” 종자는 서울 중앙 종묘 주식회사에서 구입하여 사용하였다.

1. 종자의 발아 및 배양

종자는 70 % 의 ethanol 에 30 초간 담근 후, Tween-20 을 몇방울 첨가한 2 % NaOCl 용액에 20 분간 침적하여 표면 살균한 다음, cleanbench (Model C-CB2, 제일과학 산업 주식회사)로 옮겨 멸균수로 5 회 세척한 후, MS 기본배지(Murashige and Skoog, 1962)가 들어 있는 test tube(2.5 x 19 cm)에 종자를 파종하여 aluminium foil 로 막은 다음 조직 배양실로 옮겨, 상대습도 70 ~ 80 %, 온도 25 ± 2 °C, 1,100 ~ 1,500 lux 의 광을 16 시간의 일장으로 조사하면서 20 일간 배양하였다.



2. Callus 유기 와 배양 및 식물체 재생

1) Callus 의 성장에 대한 growth regulators 의 최적농도 조건을 조사하기 위하여, MS 배지에 auxin 류로서 NAA(α -Naphthaleneacetic acid) 농도 1, 2, 3 ppm 과 cytokinin 류로서 BA(6-Benzylaminopurine) 농도 0.5, 1, 2, 3 ppm 을 혼

용 처리하였다. 조직 절편은 배양 20 일 후에 전개된 잎을 0.5 cm x 0.5 cm 되게 절단하여 사용하였으며, 배지의 양은 100 ml Erlenmeyer flask 에 20 ml 되게 주입하였고, 모든 배양실 조건은 종자 발아시와 동일하였다.

2) 배양 기간 동안의 생장 곡선을 조사하기 위하여 위의 실험 처리에서 우수한 결과를 보인 growth regulators 가 조합된(NAA 3 ppm + BA 0.5 ppm) MS 고체 배지에 0.5 g 의 callus 를 치상하고, 배양 3 일 간격으로 callus 무게를 달았다.

3) 식물체 재생 조건

Callus 로 부터 식물체 재생에 관여하는 growth regulators 의 종류와 최적농도를 조사하기 위하여 NAA 농도(0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3 ppm) 와 BA 농도(0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3 ppm) 의 혼용과 IAA(Indole-3-acetic acid) 농도(0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3 ppm) 와 kinetin(6-Furfurylaminopurine) 농도(0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3 ppm) 의 혼용 및 Thidiazuron(N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea)의 농도(1, 5, 10 ppb) 와 Fulmet(1-(2-chloro-4-pyridyl)3-phenylurea)의 농도(1, 5, 10, 100, 500 ppb) 를 단용 혹은 혼용 처리하여 식물체 재생 조건을 조사하였다.

또 재생된 식물체는 호르몬이 없는 MS 고체배지에 옮겨 발근시켰고, 두달 후 발근된 식물체는 화분에 옮겨 심었다.

Table 1. Composition of MS, B5, KM-8P and AA medium for callus formation and protoplast culture of Geranium.

Component	Concentration (mg/l)			
	MS ^a	B5 ^b	KM-8P ^c	AA ^d
NH ₄ NO ₃	1650	-	600	1650
KNO ₃	1900	3000	1900	1900
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	150	600	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	500	300	370
KH ₂ PO ₄	170	-	170	170
KCl			300	
(NH ₄) ₂ SO ₄		134		
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O		150		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	27.8	27.8	27.8
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	37.3	37.3
H ₃ BO ₃	6.2	3	3	6.2
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	0.025	0.25	0.025
CuSO ₄ · 6H ₂ O	0.025	-	0.25	0.025
CuSO ₄	-	0.025	-	-
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3	-	13.2	22.3
MnSO ₄ · H ₂ O	-	10	-	-
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.25
KI	0.83	0.75	0.75	0.83
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6	2	3	8.6
myo-inositol	100	100	100	100
Thiamine-HCl	0.1	10	1	1
Nicotinic acid	0.5	1	-	-
Pyridoxine-HCl	0.5	1	1	1
Glycine	2	-	-	-
p-Aminobenzenic acid			0.02	0.02
L-Ascorbic acid			2	2
Biotin			0.01	0.01
D-Calcium pantothenate			1	1
Folic acid			0.4	0.4
Choline chloride			1	1
Nicotinamide			1	1
Riboflavin			0.2	0.2
Retinol			0.01	0.01
Cyanocobalamine			0.02	0.02
Pyruvic acid			20	
Citric acid			40	
L-Malic acid			40	
Fumaric acid			40	
Glucose			68400	125
Sucrose	30000	20000	125	30000
Fructose			125	125
Xylose			125	125
Sorbitol			125	125
Mannitol			125	125
Amino acids ^e				
Glycine				7.5
Glutamine				876
Aspartic acid				266
Arginine				174
Agar	0.8 *	0.8 *		
pH	5.8	5.8	5.8	5.8
NAA	3	3	3	3
BA	0.5	0.5	0.5	0.5

a : Murashige and Skoog, 1962

b : Gamborg et al., 1968

c : Kao and Michayluk, 1975 d : MS minerals + KM-8P vitamins + amino acids

e : Kinya et al., 1987

3. Protoplast 분리

1) 공시 재료

계대배양한 후 callus 의 생장율이 가장 빠른 것으로 나타난 시기 즉, 계대배양 후 14 ~ 18 일 된 callus 를 사용하였다.

2) 효소 농도

Protoplast 분리에 적합한 효소 농도 조건을 확립하기 위하여 cellulase 와 macerozyme 의 농도를 달리 사용하여 수율과 생존율을 조사하였다.

Cellulase Onozuka R-10(Yacult Honsha Co. Ltd. Japan) 의 5 수준(1, 2, 3, 4, 5 %) 과 Macerozyme R-10 (Yacult Pharmaceutical Industry Co. Ltd. Japan) 의 2 수준(0.5, 1 %)을 조합한 10 종류의 효소 용액을 12 시간 처리하여 protoplast 를 분리시킨 후, haemocytometer(L: 1 mm x W: 1 mm x D: 0.1mm, American Optical U.S.A.) 로 protoplast 의 수를 세어 ml 당 protoplast 수로 환산하였다 ($n \times 10^4$ protoplasts/ml). 또 생존율을 조사하기 위하여 Fluorescein diacetate (FDA, Sigma Chemical Co. U.S.A.) 를 acetone 에 녹여 0.5 % 용액을 만들고, 그 용액을 protoplast 혼합액에 가하여 최종 농도가 0.01 % 되도록 하여 상온에서 5분간 incubation 한후(Larkin, 1976), 형광 장치가 부착된 도립 현미경 (Nikon, Diaphot-TMD) 하 에서 초록색의 진한 형광을 내는 살아있는 protoplast 를 계수 하였고, protoplast 생존율은 전체 protoplast 수에 대한 백분율로 나타내었다.

$$\text{생존율} = \frac{\text{형광을 내는 protoplasts 수}}{\text{전체 protoplasts 수}} \times 100 \%$$

3) 효소 처리시간

위에서 조사한 최적 효소 농도의 효소용액(table 2) 10 ml 당 callus 1 g 을 넣어 각각 4, 6, 8, 10, 12, 14 시간을 처리하여 protoplast 를 분리시킨 후, protoplast 수율과 생존율을 조사하여 처리 시간에 따른 최적 조건을 조사 하였다.

Table 2. Composition of the enzyme solution for isolating protoplasts of Geranium callus.

Constituent	Concentration
Cellulase Onozuka R - 10 ^a	4 %
Macerozyme R - 10 ^b	0.5 %
Pectolyase Y - 23 ^c	0.3 %
Hemicellulase ^d	0.3 %
Calcium chloride	10 mM
MES ^e	10 mM
Sorbitol	0.6 M
pH	5.8

a : Yakult Honsha Co., Ltd. Japan

b : Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd. Japan

c : Seishin Pharmaceutical, Tokyo, Japan

d : Sigma London Chemical Co., Poole, Dorset, UK.

e : 2[N-Morpholino]-ethanesulphonic acid

4) 분리 방법

Protoplast 분리는 효소용액(table 2)을 membrane filter(pore size 0.2 μm) 로 거른 다음, 10 ml 효소 용액에 callus 1 g 을 넣어 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 암조건에서 12 시간 60 rpm 으로 진탕하면서 방치한 후, 2 겹의 가아제를 사용해서 잔여물을 걸러낸 용액을 80 x g 에서 5 분간 원심분리하여 효소액을 버린 후, 0.6 M sorbitol CPW 용액(table 3)으로 다시 원심분리하여 남아있는 효소액을 제거한 다음, 0.6 M sorbitol CPW 용액 2 ml 를 넣어 재현탁하고, 이어 0.6 M sucrose CPW 용액을 바닥으로 부터 서서히 넣어 100 x g 에서 10 분간 원심분리하여 sorbitol 과 sucrose 중간에 층을 이루고 있는 protoplast 를 취하고, 다시 0.6 M sorbitol CPW 용액으로 원심분리하여 protoplasts density 가 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 되게 조절하였다.

Table 3. Composition of the cell and protoplast washing solution(CPW) for protoplasts isolation from Geranium callus.

Salts used	Concentration(mM)
KH_2PO_4	200
KNO_3	1000
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	11000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1000
KI	1
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.2
MES	10

0.6 M sorbitol CPW : 0.6 M sorbitol + CPW solution

0.6 M sucrose CPW : 0.6 M sucrose + CPW solution

4. Protoplast 융합

Electro cell manipulator 사용시 필요한 절차로서 protoplast 융합전에 전해질 물질을 제거해야 하므로 이를 위해 비 전해질 물질로 구성되어 있는 융합용액 (table 4) 으로 80 x g 에서 5 분간 2 회 원심분리하여 세척 전환 후 protoplast 밀도를 1×10^5 protoplasts/ml 되게 조절한 뒤 사용하였다(Koop, 1985).

Table 4. Composition of the fusion solution.

Constituent	Concentration
CaCl ₂ · 2H ₂ O	600 μ M
HEPES*	140 μ M
Sorbitol	0.6 M
pH	7.0

* HEPES : N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethane-sulfonic acid

1) 전압 및 주파수 조건

Protoplast 융합에 알맞는 전압 및 주파수 조건을 확립하기 위하여 융합용액에 1×10^5 protoplasts/ml 의 밀도로 조절된 protoplasts 20 μ l 용액을 electrode slide 에 넣고 cover glass 를 덮어 형광 장치가 부착된 도립 현미경에 올려 놓은후, Electro cell manipulator 401 A(BTX Inc. San Diego. California

USA) 를 이용하여 protoplast 융합을 실시하였다.

이때 dielectrophoresis 를 위한 교류 주파수(10 k, 100 k, 1 M, 10 MHz), 교류전압(20, 40, 60, 80 V/cm) 과 처리시간(5, 10, 15, 20 sec), 그리고 electroporation 을 위한 직류전압(0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 kV/cm) 과 처리시간(20, 40, 60, 80 μ sec)을 적정화하기 위해서 세포 융합율 [융합율 (%) = (융합된 protoplasts 수 / 융합전 protoplasts 수) x 100 %] 과 생존율 [생존율(%) = (전기 자극 후 살아있는 protoplasts 수 / 융합전 살아있는 protoplast 수) x 100 %] 을 조사하였다. 이때 protoplast 의 생존 여부는 FDA 법으로 관찰하였다.

2) 융합

1×10^5 /ml 의 protoplast 를 50 ml chamber 에 넣고, 교류 주파수, 교류 전압과 처리시간, 직류전압과 처리시간이 적절하게 맞추어진 Electro Cell Manipulator 401 A 를 이용하여 융합을 시켰다.

5. 융합된 protoplasts 배양



1) 배양에 관련되는 요인

융합된 protoplasts 를 배양하는데 필요한 요인을 조사하기 위하여 위에서 융합된 protoplasts 를 cleanbench 에 옮겨, 멸균된 피펫으로 protoplast 용액 2 ml 를 취하여 petri dish(ϕ 6 cm)에 넣고, 이어 배지 2 ml 를 가하여 다음의 배양 조건에 관해서 조사하였다.

- (1) 기본배양배지 : MS solid, MS liquid, B5 solid, B5 liquid, KM-8P liquid, AA liquid (table 1)
- (2) 당종류 및 농도 : glucose 0.4 M, fructose 0.4 M, sucrose 0.4 M, glucose 0.2 M + fructose 0.2 M, glucose 0.2 M + sucrose 0.2M, fructose 0.2 M + sucrose 0.2 M)
- (3) 삼투압 조절제로서의 sorbitol 농도 : 0.1 osm, 0.2 osm, 0.3 osm, 0.4 osm, 0.5 osm, 0.6 osm.
- (4) 배양 밀도 : $0.5 \times 10^4 / \text{ml}$, $1 \times 10^4 / \text{ml}$, $2.5 \times 10^4 / \text{ml}$, $5 \times 10^4 / \text{ml}$, $10 \times 10^4 / \text{ml}$
- (5) Growth regulators 농도 : NAA 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 과 BA 0.1 ppm, 0.25 ppm, 0.5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm 의 조합 위와 같은 조건으로 배양하여 7 일째에 세포 분열을, 15 일째에 colony 형성을 조사하였다.

$$\text{세포 분열 (\%)} = \frac{\text{배양 7 일째 분열하는 protoplasts 수}}{\text{배양된 protoplasts 수}} \times 100 (\%)$$

$$\text{Colony 형성 (\%)} = \frac{\text{배양 15 일째 형성된 colony 수}}{\text{배양된 protoplasts 수}} \times 100 (\%)$$

2) 배양 과정

위에서 조사한 조건을 기초로 하여 융합된 protoplasts 배양은 1×10^5 protoplasts/ml 의 밀도로 조절된 2 ml 의 protoplast 용액을 살균된 피펫으로 petri dish 에 분주하고, 이어 KM-8P 액체 배지(sorbitol 0.2 M) 2 ml 를 첨가하여 protoplast 밀도가 5×10^4 /ml 되게하였다. Petri dish 는 파라필름으로 봉하여 조직 배양실($25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$)에서 처음 2 일간은 암조건으로 3 일째 부터는 광조건(1,100 ~ 1,500 lux) 에서 배양하였다. 배양 5 일 후에 0.2 M sorbitol 을 함유하는 배지 1 ml 를 첨가하였고, 배양 10 일 후에는 sorbitol 의 농도를 0.1 M 로 낮춘 AA 액체배지 2 ml 를 첨가하였고, 배양 15 일 후에는 sorbitol 이 없는 배지 2 ml 를 첨가하였다(Sung et al., 1991; 유, 1988). 이후 일주일 간격으로 기존배지 : 첨가배지의 비율을 4 : 1 비율로 하여 첨가 하였다. 배양 8 주 후에는 MS 고체배지(NAA 3 ppm + BA 0.5 ppm, Agar 0.8 %)에 옮겨 배양하여 callus 를 유도하였으며, 배양 12 주 후 새로운 MS 고체 배지에 옮겨 callus 상태를 관찰하였다.



Ⅲ. 결 과 및 고 찰

1. Callus 유기 와 배양 및 식물체 재생

1) NAA 와 BA 의 영향

Auxin 류로 NAA 를, cytokinin 류로 BA 를 사용한 각각 4 가지 수준의 농도 처리에 의한 callus 유기 결과는 table 5 와 같다. NAA 와 BA 를 처리하지 않았을때는 callus 가 유기되지 않을 뿐만 아니라 죽거나 변색되었고, NAA 3 ppm + BA 0.5 ppm 일때 와 NAA 3 ppm + BA 1 ppm 일때 가장 양호하게 callus 가 유기되었다.

또한 callus 성장에 대한 NAA 와 BA 농도의 영향을 조사하기 위해 배양 30 일 후 무게를 측정 한 결과, fig. 1 에서와 같이 NAA 3 ppm + BA 0.5 ppm 일때 (4.25g) 와 NAA 3 ppm + BA 1 ppm 일때(4.24 g) callus 가 가장 양호하게 성장하였다.

이 결과는 *Pelargonium zonale* hybrids 에서 NAA 2 ppm + BA 1 ppm 을 처리하여 callus 를 유기했다는(유, 1988) 보고와 매우 유사하며, *Brassica species* 에서 2,4-D 1 ppm 을 처리하여(Kinya et al., 1987) callus 를 유기하였다는 보고가 있는데 이는 식물종의 상이에 따른 차이라고 사료된다.



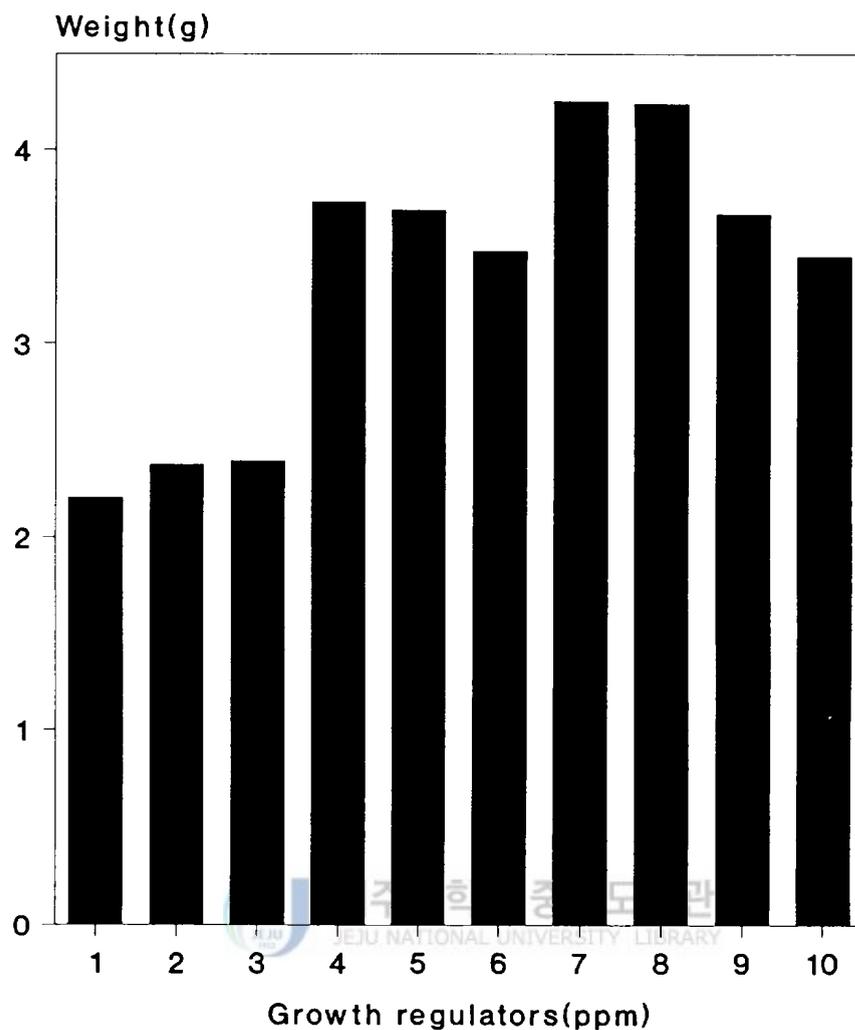
Table 5. Effects of NAA and BA on callus growth of Geranium

Growth regulators(ppm)		Degree of callus formation*
NAA	BA	
0	0	0
1	0.5	1
1	1.0	1
1	2.0	1
2	0.5	2
2	1.0	2
2	2.0	2
3	0.5	3
3	1.0	3
3	2.0	2
3	3.0	2

* 0 : blighted 1 : poor 2 : good 3 : very good

2) Callus 생장 곡선

Callus 계대 배양 조건을 확립하기 위해 NAA 와 BA 를 사용하여 32 일간 callus 생장을 조사한 결과 fig. 2 에서 보는 바와 같이 배양 시작 후 18 일 전 후 2 일간 callus 생장 속도가 제일 높았으며, 20 일 이후에는 생장 속도가 둔화 되었다. 따라서 계대 배양은 20 일 간격으로 수행하였다.



1. NAA1 + BA0.5 2. NAA1 + BA1 3. NAA1 + BA2 4. NAA2 + BA0.5
 5. NAA2 + BA1 6. NAA2 + BA2 7. NAA3 + BA0.5 8. NAA3 + BA1
 9. NAA3 + BA2 10. NAA3 + BA3
 Fig. 1 Effects of the combined concentration of NAA and BA on callus growth.

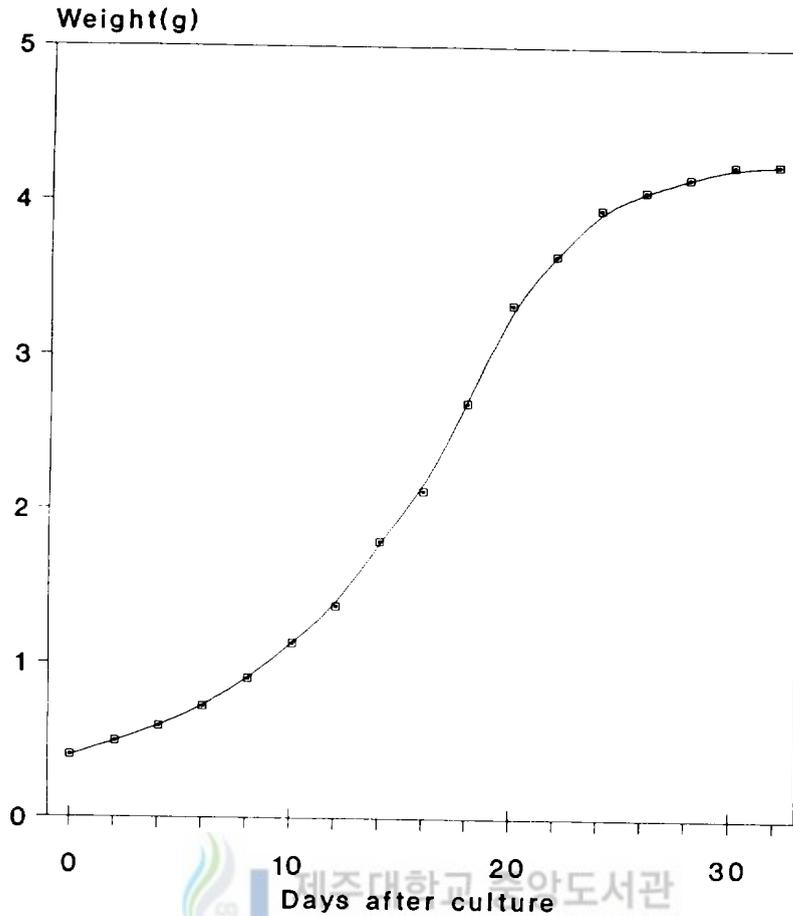


Fig. 2 Growth curve of Geranium callus.

3) 식물체 재생에 미치는 growth regulators 의 영향

(1) NAA 와 BA 농도

식물체 재생에 미치는 NAA 농도 와 BA 농도를 조합하여 검토한 결과는 table 6 에 나타내었다. NAA 농도가 1 ~ 3 ppm 수준이고 BA 농도가 0.1 ppm, 0.25 ppm 일때 각각 shoot 가 형성되었다(photo. 1).

Table 6. Effects of the concentration of NAA and BA on shoot formation from Geranium callus.

BA(ppm) NAA(ppm)	0.1	0.25	0.5	1	2	3
0.1	-	-	-	-	-	-
0.25	-	-	-	-	-	-
0.5	-	1	-	-	-	-
1	1	1	-	-	-	-
2	1	1	-	-	-	-
3	1	1	1	1	-	-

* 10 Replications 1 : one shoot - : no shoot

2) IAA 와 kinetin 농도

IAA 와 kinetin 을 여러가지 농도로 조합하여 식물체 재생에 미치는 영향을 검토한 결과는 table 7 에 나타내었다. 저농도 IAA(0.1 ppm, 0.25 ppm) + 고농도 kinetin(1, 2, 3ppm)의 조합과 고농도 IAA (1, 2, 3 ppm) + 저농도 kinetin (0.1 ppm, 0.25 ppm) 에서 shoot가 형성되었고(photo. 2), IAA 3 ppm + kinetin 1 ppm 에서도 shoot가 형성되었다. 그러나 이같은 shoot 발생율은 1/10 로서 높지않았다.

Table 7. Effects of the concentration of IAA and kinetin on shoot formation from *Geranium* callus.

Kinetin(ppm) IAA(ppm)	0.1	0.25	0.5	1	2	3
0.1	-	-	-	1	1	2
0.25	-	-	-	-	1	1
0.5	-	-	-	-	-	-
1	1	-	-	-	-	-
2	1	1	-	-	-	-
3	1	1	1	1	-	-

10 Replications 1 : shoot 2 : two shoot - : no shoot

이 결과는 *Brassica carinata* Braum cv. 에서 BA 5 ppm + NAA 0.5 ppm 일때 (Chung et al., 1987), *Pinus strobus* L. 에서 BA 2 ppm + NAA 0.2 ppm 일때 (Kaul, 1987), cabbage (*Brassica oleracea*) 에서 kinetin 3 ppm + GA 0.1 ppm 일때(Fu et al., 1985) 와 같이 cytokinin 이 auxin 류의 농도보다 높을때 shoot 발생이 좋다는 보고 와는 차이를 나타낸 반면, rice(*Oryza sativa* L.) 에서 NAA 5 ppm + BA 2 ppm 일때 (Lee and Kim, 1991) 또 *Stylosanthes guianensis* 에서 NAA 0.1 ppm 일때(Szabados and Roca, 1986) 와 같이 저농도의 cytokinin 과 고농도의 auxin 이 조합된 경우에도 shoot 가 발생하였다는 보고 와는 일치하였다.

이는 동일 식물에서 auxin 과 cytokinin 비율이 상대적 적용 비율에 의하여 기관 분화의 반응이 상반될 수 있음을 뜻하는 것으로 특기할 만한 결과라 사료된다. 아울러 이와같은 현상에 대하여는 추후 각종식물에 대한 심도있는 적용시험이 요망된다.

3) Thidiazuron 과 Fulmet 농도

Thidiazuron 과 Fulmet 농도를 단용 혹은 혼용하여 식물체 재생에 미치는 결과를 검토한 결과는 table 8 에 나타내었다. 거의 모든 농도에서 shoot 가 형성되었으며, 단용 처리보다는 혼용 처리에서 양호한 shoot 형성을 보였다. 특히 Thidiazuron 5 ppb 조합에서 양호하게 shoot 가 형성되었고, Thidiazuron 5 ppb 단용일때는 root 형성도 볼 수 있었다. 또 Thidiazuron 5 ppb 와 Fulmet 5 ppb 에서 가장 양호한 shoot 형성을 관찰하였다(photo. 3). 그러나 Thidiazuron 10 ppb + Fulmet 500 ppb 와 Thidiazuron 5 ppb + Fulmet 500 ppb 및 무처리구 에서는 callus 가 갈변 또는 고사되었다.

Table 8. Effects of the concentrations of Thidiazuron and Fulmet on shoot and root formation from Geranium callus.

Fulmet(ppb) Thidiazuron(ppb)	0	1	5	10	100	500
0	-	2	2	1	1	1
1	2	3	2	3	2	1
5	3slr	4	6	5	2	d
10	4	2	2	3	5	d

* 10 Replications 1 : one shoot 2 : two shoot 3 : three shoot
 4 : four shoot 5 : five shoot 6 : six shoot
 3slr : three shoot and one root - : no shoot d : dead

이 결과는 red maple(*Acer tubrum* L.) 에서 Thidiazuron 10 ppb + BA 0.3 ppm 일 때 53 % 의 shoot 가 형성됐다는 보고(Kern et al., 1986; Capelle et al., 1983) 와 pumpkin 에서 Thidiazuron 1 ppb + BA 0.1 ppm 에서 좋다는 보고(Burkhanova et al., 1984) 와 유사한 경향을 나타냈다. 또한 Thidiazuron 은 일반 cytokinin 류 보다 활성이 아주 강하여 저농도에서 효과를 볼 수 있는데(George and Sherrington, 1984), 본 실험의 결과에서도 5 ppb 농도에서 Fulmet 와 혼용될때 지금까지 어려웠던 shoot 유기에 효과적이었음은 앞으로 많은 연구에 적용될 수 있는 가능성을 보인다.

이상에서와 같이 shoot 형성에 가장 좋은 조건으로 나타난 Thidiazuron 5 ppb + Fulmet 5 ppb 에서 shoot 가 형성된 식물체는 호르몬을 첨가하지 않은 MS 고체 배지에 옮겨 발근을 시켰고(photo. 4), 발근된 식물체는 두달 후 화분에 옮겨 생육시켰다(photo. 5).

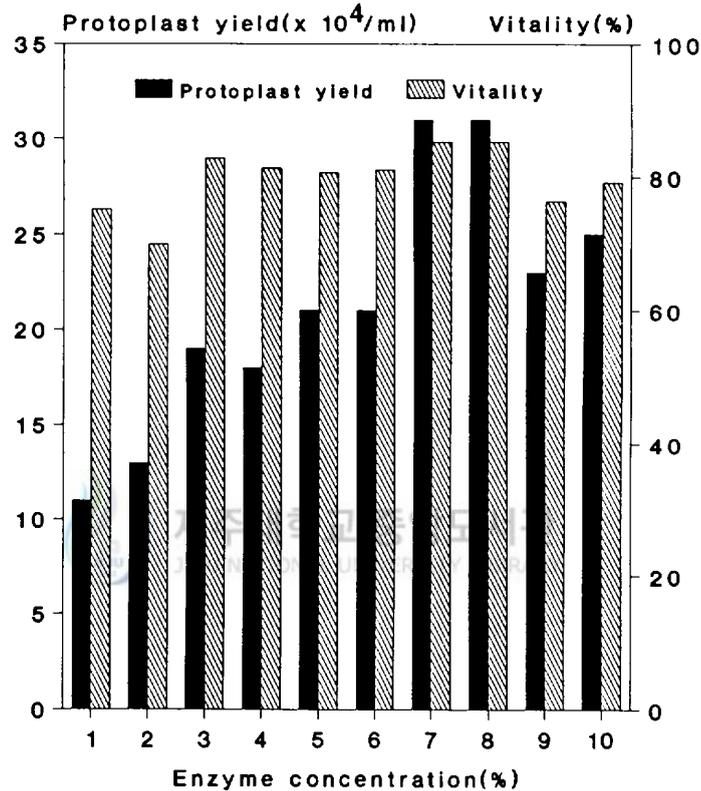
2. Protoplast 분리

1) 효소 농도의 영향

Protoplast 분리에 미치는 Cellulase Onozuka R-10 과 Macerozyme R-10 을 혼용하여 수율과 생존율을 조사한 결과는 fig. 3 에서 보는 바와 같이 4 % Cellulase Onozuka R-10 + 0.5 % Macerozyme R-10 를 처리 하였을때 3.2×10^5 protoplasts/ml 로 가장 높은 protoplast 수율을 얻을 수 있었다(photo. 6). 생존율 또한 4 % Cellulase Onozuka R-10 + 0.5 % Macerozyme R-10 에서(85.5 %) 가장 높았다.

이는 *Pinus oocarupa* 와 *Pinus patula* 의 callus 에서 1 % Cellulase Onozuka R-10 + 0.5 % Macerozyme R-10 일때(Laine et al., 1988), *Ginkgo biloba* 에서 1 % Cellulase Onozuka R-10 + 0.5 % Macerozyme R-10 일때(Kim et al., 1984),

Cichorium intybus 에서 1 % Cellulase Onozuka R-10 + 0.2 % Macerozyme R-10 일때(Lue et al., 1982), *Pinus cotyledon* 에서 1 % Cellulase Onozuka R-10 + 0.5 % Pectinase 일때(David et al., 1979) 및 *Acacia* 와 *Bush colver* 에서 3 % Cellulase Onozuka R-10 + 1 % Macerozyme R-10 일때(So et al., 1986) 가장 좋다는 보고 와는 차이가 나타났는데 이는 식물체의 종류가 달랐기 때문이라고 사료된다.



C : Cellulase Onozuka R-10 M : Macerozyme R-10
 1. C1 + M0.5 2. C1 + M1 3. C2 + M0.5 4. C2 + M1
 5. C3 + M0.5 6. C3 + M1 7. C4 + M0.5 8. C4 + M1
 9. C5 + M0.5 10. C5 + M1

Fig. 3 Effects of the enzyme concentration on yield and vitality of protoplasts.

2) 효소 처리 시간의 영향

효소 처리시간이 protoplast 수율 및 생존율에 미치는 영향을 보면, fig. 4에서 보는 바와 같이 수율은 처리 4 시간 부터 8 시간까지는 서서히 증가하다가 8 시간 후 부터 급격히 증가하여 12 시간에서 최고치인 1 ml 당 3×10^5 개의 protoplasts 를 얻었고, 그 이후에는 급격히 감소 하였다.

생존율은 12 시간까지는 처리 시간이 경과함에 따라 서서히 감소하다가 12 시간(89.9 %) 이후에는 급격히 감소 하였다.

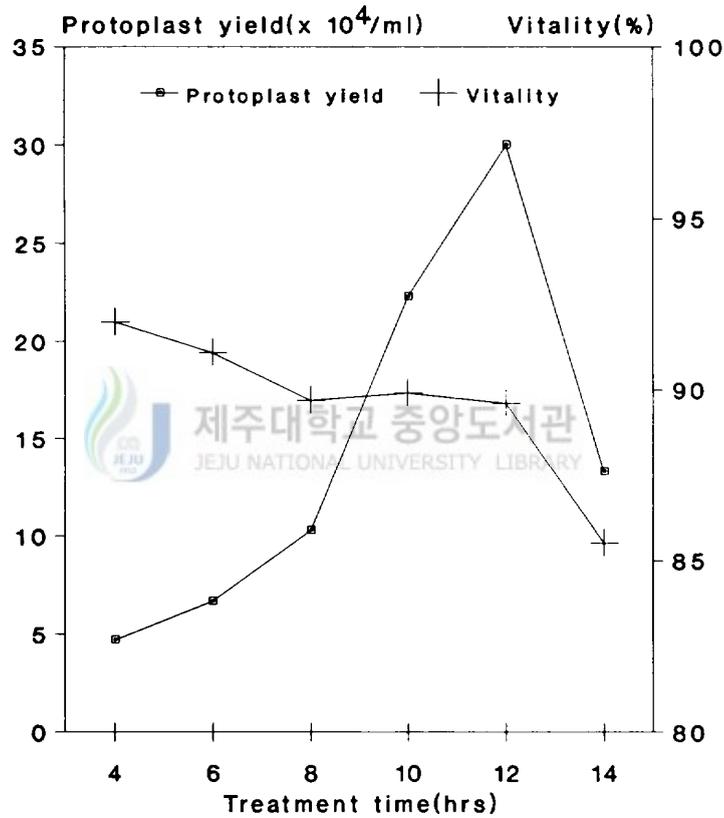


Fig. 4 Effects of enzyme treatment time on yield and vitality of protoplasts.

이는 Nagy 와 Malige(1976) 가 *Nicotiana sylvestris* 엽육세포에서 4 시간, Kao 와 Michayluk(1980) 가 Alfalfa 엽육 세포에서 6 시간, Yorrow 등(1987)이 *Pelargonium aridum* callus 에서 16 시간 처리하여 protoplasts 를 분리한 보고와 차이를 나타내었다. 이것 또한 대상 식물체의 연령, 채취 부위 및 배양환경 등의 차이에 따라 나타날 수 있는 결과(Monye et al., 1988)이기는 하지만, 같은 종의 식물에서도 유(1988) 의 경우보다 2 시간이 단축되었던 바 효소의 조합과 분리 조건의 개선에 관해서는 시료의 종류에 따라 다양하게 검토되어야 할 것이다.

3. Protoplast 융합을 위한 전압 및 주파수 조건

Callus 에서 분리한 protoplasts 를 전장하에서 융합 시키는 조건을 확립하기 위한 교류 주파수와 전압 그리고 처리시간에 따른 pearl chain 형성을 조사한 결과는 table 9 에서 보는 바와 같이 1 MHz, 40 V/cm, 15 sec 에서 2 ~ 3개의 pearl chain 형성율이 27.5 % 로 가장 양호하였다. 그러나 10 kHz 와 100 kHz 에서는 전장을 걸어 주었을 때 protoplasts 가 회전함으로 인하여 pearl chain 이 형성되지 않았고, 10 MHz 에서는 전장을 걸어도 protoplasts 가 움직이지 않아 pearl chain 이 형성되지 않았다

이상에서 확립된 pearl chain 형성이 양호한 두조건(1 MHz, 40 V/cm, 10 sec 와 1 MHz, 40 V/cm, 15 sec) 에서 직류 전압과 처리시간을 달리하여 융합율과 생존율을 조사한 결과는 table 10 에 나타내었다. 교류 1 MHz, 40 V/cm, 15 sec 의 전장과 직류 0.5 kV/cm, 60 μ sec 에서 12.7 % 의 융합율과 81.2 % 의 생존율을 나타내어 가장 양호하였으며, 다음으로 직류 1 kV/cm, 60 μ sec 에서 12.4 % 의 융합율과 81.1 % 의 생존율을 나타내었다. 그러나 직류 1.5 kV/cm, 60 μ sec 이상에서는 protoplasts 가 80 % 이상 파괴 되었다.

Table 9. Effects of AC pulse on the formation of protoplast pearl chain.

Frequency (Hz)	Amplitude (V/cm)	Time (sec)	No. of protoplast tested	Percentage of pearl chain formation		
				protoplasts number per chain		
				2 - 3	4 - 6	> 7
10 k	20	5	50	NRT*	NRT	NRT
		10	47	NRT	NRT	NRT
		15	46	NRT	NRT	NRT
		20	50	NRT	NRT	NRT
	40	5	49	NRT	NRT	NRT
		10	50	NRT	NRT	NRT
		15	48	NRT	NRT	NRT
		20	50	NRT	NRT	NRT
	60	5	48	NRT	NRT	NRT
		10	50	NRT	NRT	NRT
		15	50	NRT	NRT	NRT
		20	49	NRT	NRT	NRT
80	5	49	NRT	NRT	NRT	
	10	49	NRT	NRT	NRT	
	15	50	NRT	NRT	NRT	
	20	49	NRT	NRT	NRT	
100 k	20	5	52	NRT	NRT	NRT
		10	50	NRT	NRT	NRT
		15	49	NRT	NRT	NRT
		20	48	NRT	NRT	NRT
	40	5	48	NRT	NRT	NRT
		10	46	NRT	NRT	NRT
		15	50	NRT	NRT	NRT
		20	50	NRT	NRT	NRT
	60	5	50	NRT	NRT	NRT
		10	48	NRT	NRT	NRT
		15	47	NRT	NRT	NRT
		20	49	NRT	NRT	NRT
	80	5	50	NRT	NRT	NRT
		10	51	NRT	NRT	NRT
		15	46	NRT	NRT	NRT
		20	48	NRT	NRT	NRT

* NRT : Pearl chain was not formed because of the protoplast rotation.

Table 9. (to be continued)

Frequency (Hz)	Amplitude (V/cm)	Time (sec)	No. of protoplast tested	Percentage of pearl chain formation		
				protoplast number per chain		
				2 - 3	4 - 6	> 7
1 M	20	5	63	17.5	3.3	NOB*
		10	62	18.3	10.0	4.7
		15	62	18.3	10.0	4.7
		20	62	17.5	13.3	4.7
	40	5	62	19.2	13.3	9.3
		10	60	24.2	16.7	11.7
		15	61	27.5	16.7	9.3
		20	60	24.2	15.0	9.3
	60	5	63	20.8	10.0	4.7
		10	63	20.8	16.7	9.3
		15	61	21.7	16.7	9.3
		20	62	20.8	13.3	11.7
	80	5	63	18.3	11.7	16.3
		10	62	19.2	11.7	14.0
		15	63	23.3	15.0	14.0
		20	61	24.2	13.3	12.6
10 M	20	5	52	NMV**	NMV	NMV
		10	52	NMV	NMV	NMV
		15	53	NMV	NMV	NMV
		20	49	NMV	NMV	NMV
	40	5	51	NMV	NMV	NMV
		10	50	NMV	NMV	NMV
		15	51	NMV	NMV	NMV
		20	49	NMV	NMV	NMV
	60	5	50	NMV	NMV	NMV
		10	49	NMV	NMV	NMV
		15	50	NMV	NMV	NMV
		20	48	NMV	NMV	NMV
	80	5	48	NMV	NMV	NMV
		10	49	NMV	NMV	NMV
		15	49	NMV	NMV	NMV
		20	48	NMV	NMV	NMV

* NOB : Pearl chain formation was not observed.

** NMV : Pearl chain was not formed because the protoplasts were not moved.

Table 10. Effects of the DC pulse under the selected AC conditions on the fusion and vitality of the pearl-chained protoplasts.

DC Amplitude (kV/cm)	Time (μ sec)	No. of protoplasts tested	AC pulse			
			1 MHz. 40 V/cm. 10 sec		1 MHz. 40 V/cm. 15 sec	
			Fusion(%)	Vitality(%)	Fusion(%)	Vitality(%)
0.5	20	54	7.40	85.2	7.97	84.8
	40	55	5.43	80.6	9.09	81.2
	60	55	4.44	83.0	12.72	81.2
	80	54	4.44	84.4	9.25	81.4
1.0	20	53	9.85	84.1	9.43	83.0
	40	53	10.37	80.0	9.43	83.0
	60	53	10.08	86.0	12.37	81.1
	80	53	8.15	81.5	5.66	81.1
1.5	20	54	4.95	86.5	5.56	81.5
	40	53	7.71	82.0	5.56	81.5
	60	55	Burst	Burst	Burst	Burst
	80	55	Burst	Burst	Burst	Burst
2.0	20	54	Burst	Burst	Burst	Burst
	40	55	Burst	Burst	Burst	Burst
	60	54	Burst	Burst	Burst	Burst
	80	53	Burst	Burst	Burst	Burst
2.5	20	55	Burst	Burst	Burst	Burst
	40	55	Burst	Burst	Burst	Burst
	60	54	Burst	Burst	Burst	Burst
	80	54	Burst	Burst	Burst	Burst

$$\text{Fusion (\%)} = \frac{\text{No. of the fused protoplasts}}{\text{Total no. of protoplasts tested}} \times 100$$

$$\text{Vitality (\%)} = \frac{\text{No. of the fluorescing protoplasts after electrofusion}}{\text{Total no. of the protoplasts}} \times 100$$

이상의 결과에서 융합을 위한 알맞은 전장조건은 교류는 1 MHz, 40 V/cm, 15 sec 였고, 직류는 0.5 kV/cm, 60 μ sec 이었다(photo. 7).

이 결과는 *Solanum brevidens* Phil. 융합에서 교류 1 MHz, 8 V 와 직류 0.2 kV, 50 μ sec 일때(Tempelaar and Jones, 1985), *Nicotiana tabacum* 에서 교류 1 MHz, 66 V/cm 와 직류 0.9 kV, 50 μ sec 일때(Koop, 1985), rice 에서 교류 2 MHz, 100 V/cm, 10 μ sec 와 직류 1 kV/cm, 50 μ sec 일때(Toriyama and Hinata, 1989) 및 *Petunia* 에서 교류 1 MHz, 60 V/cm, 15 sec 와 직류 2.5 kV/cm, 40 μ sec 일때(Han, 1988) 좋았다는 보고 와는 차이를 나타냈는데 이는 식물이 다름과 또 protoplast 크기의 차이 때문인 것으로 사료된다.

또한 교류 주파수가 낮은 범위(10 k ~ 100 kHz)에서는 protoplasts 의 회전 현상이 관찰되었는데, 이는 공명 현상이 충분히 일어나지 못해서 이들의 중성 입자화가 이루어지지 않았기 때문이었다(Zimmerann et al., 1981b). 또 교류 전장하에서 protoplasts 가 pearl chain 을 형성하고 있을때, 과전압(1.5 kV/cm, 60 μ sec 이상)이 걸리면 세포막이 깨어져 내용물이 나오는 현상이 관찰되었는데, 이는 Zimmermann 등 (1982)의 보고와 동일하였다.

4. Protoplast 배양에 있어서 세포 분열 및 colony 형성 조건

1) 기본배지

기본배지(table 1)가 세포 분열 및 colony 형성에 미치는 영향을 MS 고체, MS 액체, B₅ 고체, B₅ 액체, AA 액체, KM-8P 액체배지 에서 검토한 결과 fig. 4 에서와 같이 세포 분열은 KM-8P 에서 37 % 로 가장 양호 하였고, 다음으로 AA 액체배지가 36 % 로 양호 하였다.

Colony 형성은 AA 액체배지가 8.1 % 로 가장 양호하였으며, 다음으로 KM-8P 액체배지가 7.7 % 로 양호하였다. 그러나 MS, B₅ 고체 배지에서는 colony 형성이 매우 저조하였다.

이는 Kouider 등(1984)이 *Malus x demestica* cv. 'Jonathan' callus 에서 분리한 protoplasts 를 KM-8P 배지에, Gatenby 와 Cocking(1977) 이 kale protoplast

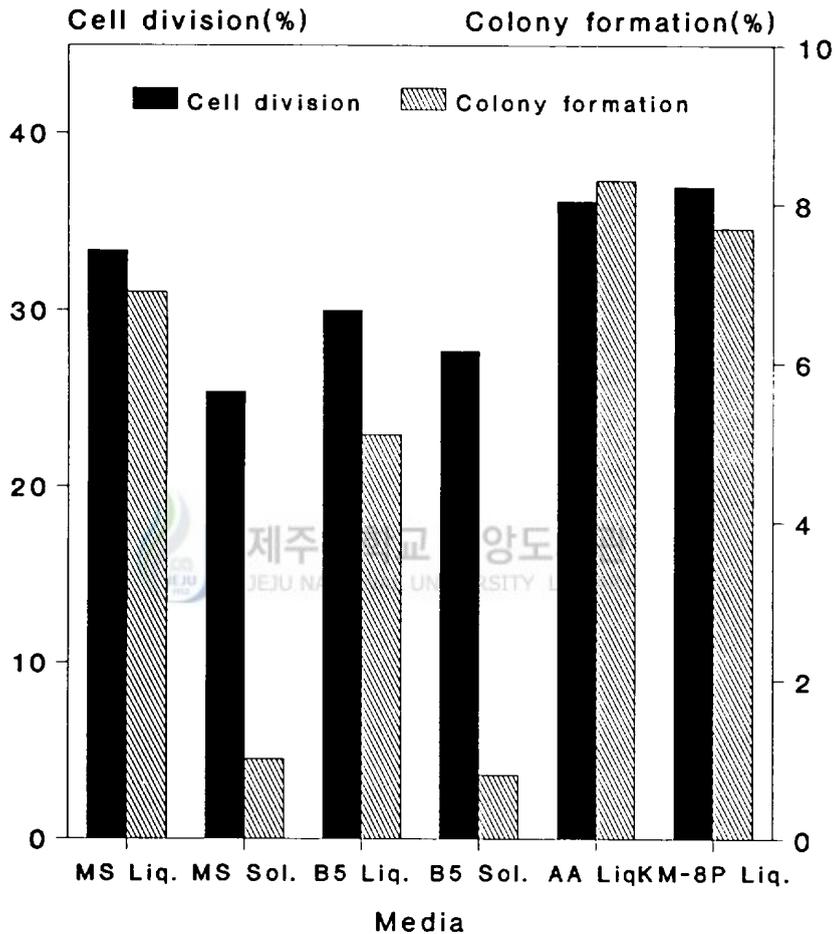


Fig. 5 Effects of various culture media on cell division and colony formation in protoplast culture.

를 B5 배지에, Ni 와 Hazel(1988) 이 *Vitis rotundifolia* cv. protoplast 를 B5 배지에, Bidney 등(1983) 이 *Brassica oleracea* 의 mesophyll protoplast 를 MS 배지에 배양하였을때 가장 효과적이라는 보고 와는 차이를 나타내었지만, Toriyama 와 Hinata (1988) 그리고 Lee 와 Kim(1991) 이 rice protoplasts 를 AA 배지에 배양하였을때 가장 효과적이라는 보고 와는 일치하였다. 이는 AA 액체 배지에 있는 아미노산 혼합물의 영향이라 사료된다.

2) 당 종류 및 농도

당 종류 및 농도가 세포 분열 및 colony 형성에 미치는 영향을 보면 fig.6 과 같다. 세포 분열 및 colony 형성 모두 0.2 M glucose + 0.2 M fructose 가 함유된 배지에서 각각 38 %, 8.5 % 를 나타내어 가장 양호하였고, 0.4 M glucose (35 %, 7.7 %), 0.4 M fructose(34 %, 7.4 %) 순으로 좋았다.

이 결과는 glucose 나 fructose 단독 처리한 곳에서 좋은 결과를 얻었다는 보고 (Park et al., 1990) 와는 다소 차이가 있으나, sucrose 나 fructose 만을 단독으로 사용하는 것보다는 glucose 를 첨가할때 세포 분열을 촉진시킨다는 보고 (Oka et al., 1985) 와 일치하였다.

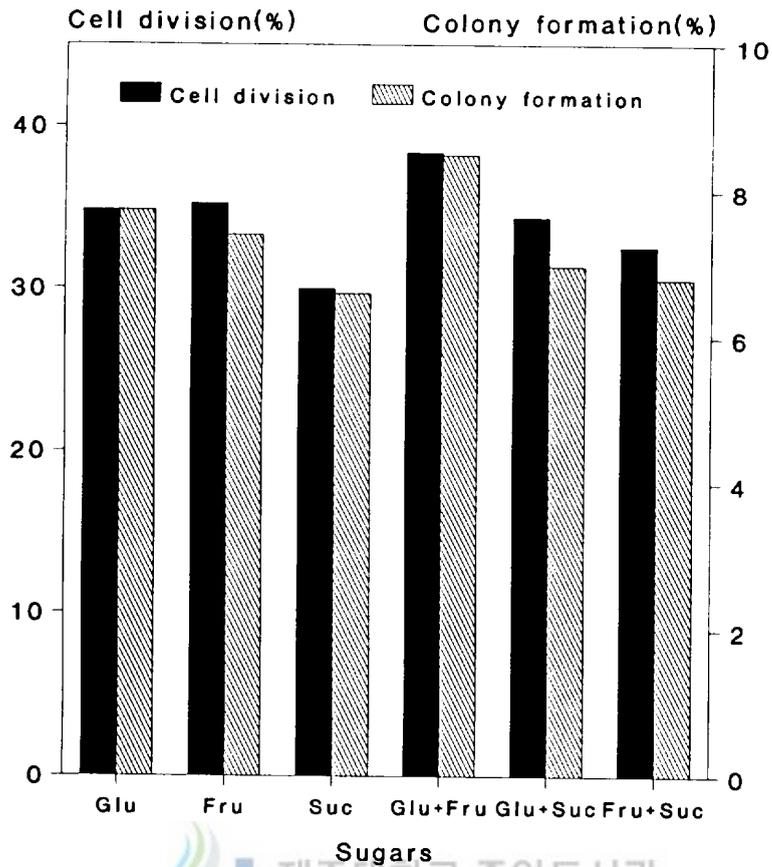


Fig. 6 Effects of various sugars on cell division and colony formation in protoplast culture.

3) 삼투압 조절제로서의 sorbitol 농도

Sorbitol 의 농도가 세포 분열 및 colony 형성에 미치는 영향을 검토한 결과는 fig. 7 에 나타내었다. Sorbitol 의 농도가 0.2 M 일때 세포 분열(39 %) 및 colony 형성(8.4 %)에 가장 양호한 결과를 보였고, 다음으로 0.3 M(35 %, 7.8 %), 0.4 M(31 %, 7.2 %)순으로 나타났으며, 0.1 M, 0.5 M, 0.6 M 에서는 저조하였다.

이 결과는 0.2 M glucose 와 0.3 M mannitol 에서 가장 이상적이라는 보고(Jee and Chung, 1989) 와 0.1 ~ 0.3 M sorbitol 이 벼의 재분화에 최적 조건이라는 보고(Min et al., 1991) 와 일치하였다.

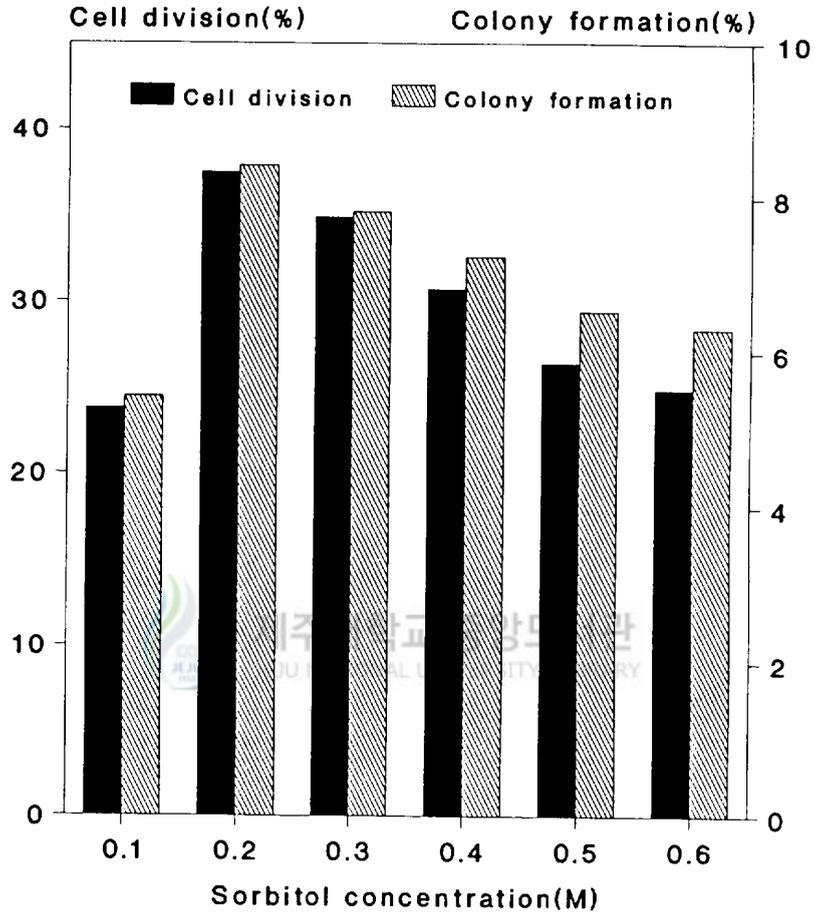


Fig. 7 Effects of sorbitol concentrations on cell division and colony formation in protoplast culture.

4) 배양밀도

배양밀도가 세포 분열 및 colony 형성에 미치는 영향을 검토한 결과는 fig. 8 에 나타내었다. 밀도가 높을수록 세포 분열 및 colony 형성이 좋았으며, 1×10^5 protoplasts/ml 일때 41 % 와 8.8 % 로 가장 좋았다. 그러나 5×10^4 protoplasts/ml 의 경우와 별다른 차이를 보이지 않아 배양 적정 밀도를 5×10^4 protoplasts/ml 로 하였다.

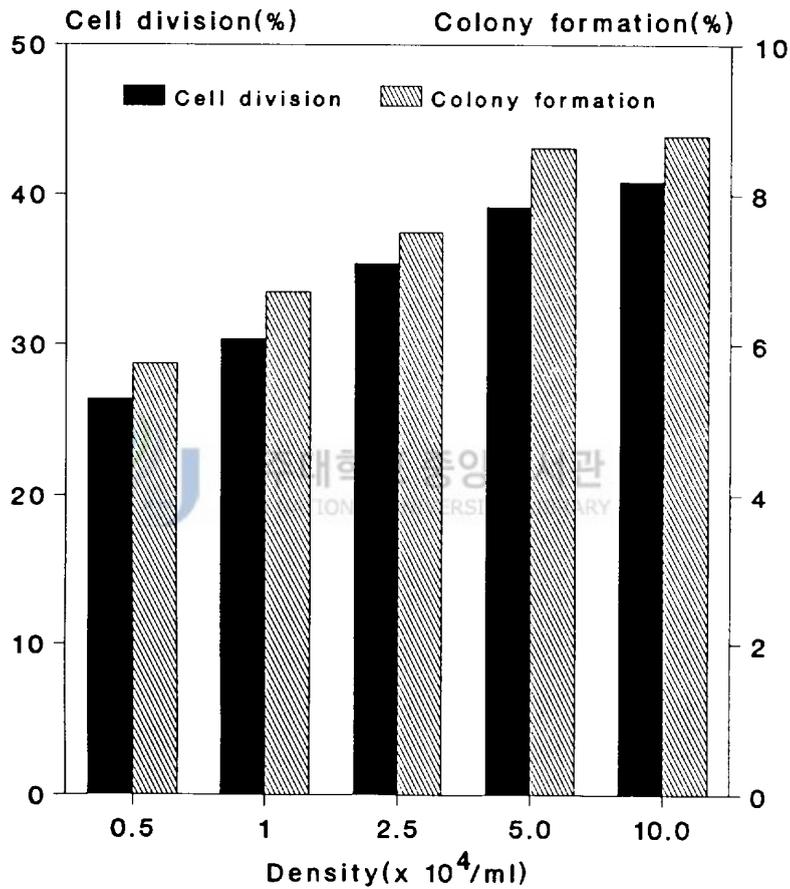


Fig. 8 Effects of culture densities on cell division and colony formation in protoplast culture.

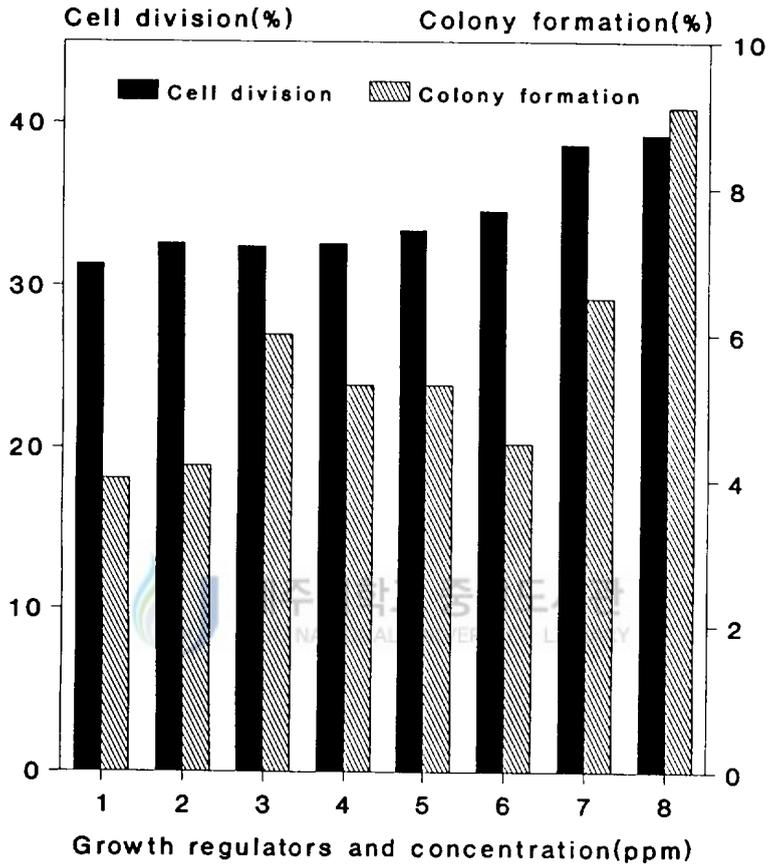
이 결과는 *Vitis rotundifolia* cv.) 에서 2.5×10^5 protoplasts/ml 가(Ni and Hazel, 1988), *rice*(*Oryza sativa* L. cv) 에서 4×10^5 protoplasts/ml 가 (Toriyama and Hinata, 1988) 그리고 *rape*(*Brassica napus* L. cv zephyr) 에서 2.5×10^5 protoplasts/ml 밀도가(Kartha et al., 1974) 좋다는 보고 와는 약간의 차이가 있으나, *bean*(*Vigna aconitifolia*) 에서 5×10^4 protoplasts/ml 가 (Krishnamurthy et al., 1984), *eggplant* (*Solanum melongena* L.) 에서 1×10^5 protoplasts/ml 가(Asaf Guri and Shamay, 1984), *sunflower*(*Helianthus annuus*) 에서 $5 \times 10^4 \sim 7 \times 10^4$ protoplasts/ml 가(Moyne et al., 1988) 그리고 *Pelargonium* 에서 8×10^4 protoplasts/ml 가(유, 1988) 가장 좋다는 보고 와는 매우 유사하였다.

5) Growth regulators 농도

배양매지에 첨가해 준 NAA 와 BA 가 세포 분열 및 colony 형성에 미치는 영향을 검토한 결과는 fig. 9-1 과 9-2 에 나타내었다. NAA 2 ppm + BA 0.5 ppm 의 조합에서 세포 분열(39%) 및 colony 형성(9.1%)이 가장 양호하였으며, 다음으로 NAA 2 ppm + BA 1 ppm, NAA 3 ppm + BA 1 ppm 조합순으로 양호하였다. 그러나 고농도인 NAA 3 ppm + BA 3 ppm 에서는 저조한 결과(34%, 4.5%)를 나타냈다.

이 결과는 *Vitis labruscana* 에서 NAA 2 ppm + BA 1 ppm 일때(Kim et al., 1990), *Pelargonium aridum* protoplasts 에서 NAA 2 ppm + BA 0.5 ppm 일때 (Yorrow et

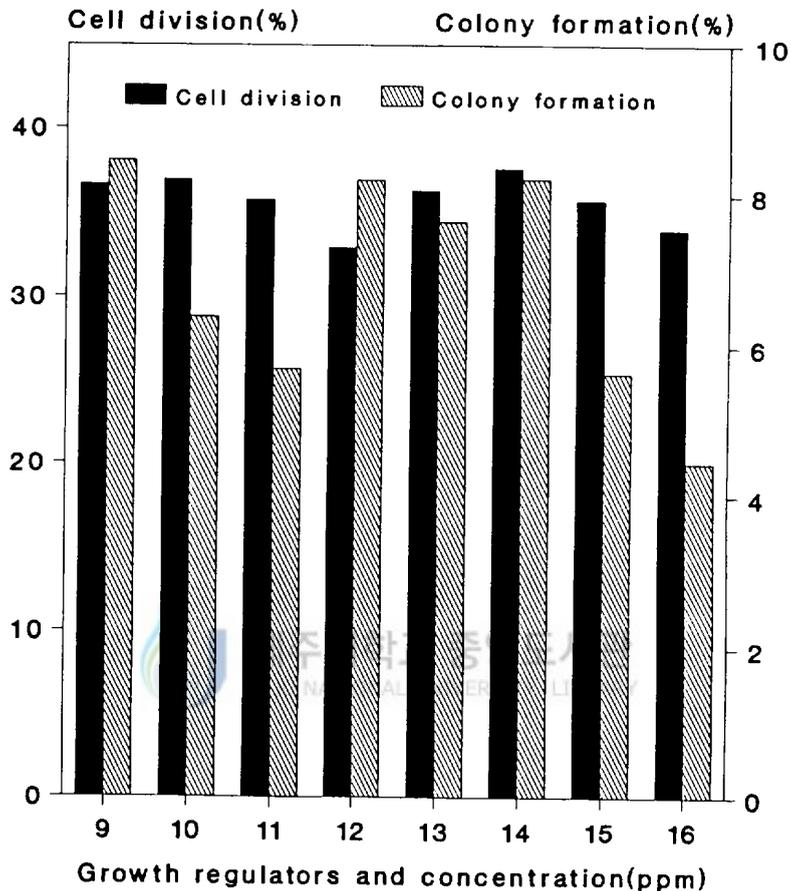
al., 1987) 좋다는 보고 와는 비슷한 경향을 나타내었으나, *Nicotiana callus* protoplasts 배양에서 NAA 3 ppm + BA 1 ppm 일때(Luc et al., 1982), pea (*Pisum sativum*) protoplast 배양에서 kinetin 2 ppm + 2,4-D 1 ppm 일때 (Constabel et al., 1973) 좋다는 보고 와는 차이를 나타냈다. 이와 같이 growth



1. NAA 1 + BA 0.1 2. NAA 1 + BA 0.25 3. NAA 1 + BA 0.5
 4. NAA 1 + BA 1 5. NAA 1 + BA 2 6. NAA 2 + BA 0.1
 7. NAA 2 + BA 0.25 8. NAA 2 + BA 0.5

Fig. 9-1 Effects of NAA and BA concentration on cell division and colony formation in protoplast culture.

regulators 의 종류와 적정 농도가 다른 것은 식물체의 종류와 protoplast 배양 조건 및 배양방법에 따라 이들 growth regulators 의 요구도가 다르기 때문인 것으로 사료된다.



9. NAA 2 + BA 1 10. NAA 2 + BA 2 11. NAA 3 + BA 0.1
 12. NAA 3 + BA 0.25 13. NAA 3 + BA 0.5 14. NAA 3 + BA 1
 15. NAA 3 + BA 2 16. NAA 3 + BA 3

Fig. 9-2 Effects of NAA and BA concentration on cell division and colony formation in protoplast culture.

이상의 실험에서 얻은 최적 조건 (KM-8P, AA 액체배지 + 0.2 M glucose + 0.2 M fructose + 0.2 M sorbitol + NAA 2 ppm + BA 0.5 ppm) 으로 *Pelargonium zonale* hybrids “ringo red” 와 “ringo white” 의 protoplasts 를 전기융합한 후 배양시켰을 때, 배양 2 일 후 세포벽이 재생되었고(photo. 8), 배양 4 일 후 제 1 분열이 일어났으며(photo. 9), 배양 7 일 후 제 2 분열이(photo. 10), 배양 10 일 후에는 제 3 또는 4 분열이 일어났으며(photo. 11), 배양 15일 후에는 colony 형성을 볼 수 있었다(photo. 12). 배양 30 일 후(photo. 13) 와 40 일후(photo. 14) 에는 micro callus 를 관찰하였고, 배양 8 주후에 1 mm 정도의 callus 를 MS 고체배지(NAA 3 ppm + BA 0.5 ppm) 에 옮겨(photo. 15), 배양 12 주에 1 cm 정도의 callus 가 형성됨을 관찰할 수 있었다(photo. 16).

V. 적 요

형질이 다른 protoplasts 를 전기융합시켜 그 융합체를 배양하기 위한 기초 연구로서, *Pelargonium zonale* hybrids “Ringo red” 와 “Ringo white” 의 잎에서 callus 유기와 배양 및 식물체 재생 조건, Protoplasts 분리 조건, protoplast 전기 융합 조건, 융합된 protoplast 배양에 관여하는 조건을 검토하였다.

1. Callus 유기와 배양을 위한 최적 NAA 와 BA 농도는 각각 3 ppm + 0.5 ppm 이었다. 또한 식물체 재생에 관여하는 growth regulators 의 농도는 NAA 와 BA 의 조합에서는 고농도 NAA(1, 2, 3 ppm) + 저농도 BA(0.1, 0.25 ppm)에서, IAA 와 kinetin 의 조합에서는 고농도 IAA(1, 2, 3 ppm) + 저농도 kinetin(0.1, 0.25 ppm), 저농도 IAA(0.1, 0.25 ppm) + 고농도 kinetin(1, 2, 3 ppm) 에서 낮은 빈도로 식물체가 재생되었으나, 또 Thidiazuron 과 Fulmet 조합에서는 거의 모든 조합에서 더 높은 빈도로 식물체가 재생되었다. 특히 Thidiazuron 5 ppb + Fulmet 5 ppb 에서는 60 % 의 재생율을 나타내었다.

2. Protoplast 분리를 위한 효소 용액의 최적 농도는 4 % Cellulase Onozuka R-10 + 0.5 % Macerozyme R-10 이었고, 이때 수율은 3.2×10^5 protoplasts/ml 이었으며, 효소처리 시간은 12 시간이 적당하였다.

3. Protoplast 융합에 미치는 전압 및 주파수 조건은 교류 주파수 1 MHz 를 40 V/cm 에서 15 sec 동안 가한 후, 직류전압 0.5 kV/cm 를 60 μ sec 동안 걸어 주었을 때, 13 % 의 융합율과 81 % 의 생존율을 나타내어 융합 효과가 가장 좋았다.

4. Protoplast 배양에 있어서 세포 분열은 KM-8P 액체배지(37 %)에서, colony 형성은 AA 액체배지(MS 무기물 + KM-8P 비타민 + 아미노산 혼합물)에서 가장 양호하였고(8.3 %), 당 종류 및 농도에 따른 결과는 0.2 M glucose 와 fructose 혼합배지에서(세포 분열 38 %, colony 형성 8.5 %), 삼투압 조절제로서 sorbitol 의 농도는 0.2 M(total 0.6 M) 에서(38 %, 8.4 %), 배양 밀도는 1×10^5 protoplasts/ml 에서(41 %, 8.8 %), Growth regulators 는 NAA 2 ppm + BA 0.5 ppm 에서(39 %, 9.1 %) 가장 양호한 결과를 얻었다.

5. 이상의 결과에서 얻은 최적 조건으로 protoplast 를 배양 했을 때, 배양 2 일 후 세포벽이 재생되었고, 4 일 후 제 1 분열이 일어났고, 7 일 후 제 2 분열이, 10 일 후 3 또는 4 분열이 일어났으며, 15 일 후에는 colony 가 형성되었다. 배양 8 주후에는 0.5 mm 정도 형성된 세포를 MS 고체배지(NAA 3 ppm + BA 0.5 ppm)에 옮겨 callus 를 배양하였고, 배양 12 주 후에는 1 cm 정도의 callus 가 형성됨을 볼수 있었다.

VI. 참 고 문 헌

- Arnold, W. M. and U. Zimmermann. 1982. Rotation of an isolated cell in a rotating electric field. *Naturwissenschaften* 69: 297-298.
- Asaf Guri and Shamay Izhar. 1984. Improved efficiency of plant regeneration from protoplasts of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Cell Reports*. 3: 247-249.
- Bates, G. W. and C. A. Hasenkampf. 1985. Culture of plant somatic hybrids following electrical fusion. *Theor Appl Genet.* 70: 227-233.
- Bates, G. W., 1985. Electrical fusion for optimal formation of protoplast heterokaryons in *Nicotiana*. *Planta.* 165: 217-224.
- Bates, G. W., J. J. Gahnor and N. S. Shekhawat. 1983. Fusion of plant protoplast by electric fields. *Plant physiol.* 72: 1110 ~ 1113.
- Bidney, D. L., J. F. Shepard and E. Kaleikau. 1983. Regeneration of plants from mesophyll protoplasts of *Brassica oleracea*. *Protoplasma.* 117, 89-92.
- Burkhanova, E. A., A. B. Fedine, Yu. A. Baskakov and O. N. Kulaeva. 1984. Comparative study of the action of 6-benzylaminopurine, Thidiazuron and cartolin on growth of intact pumpkin seedlings. *Plant Physiology.* Vol. 31, 1: 13-19.

- Capelle, S. C., W. S. M. David, C. K. Sandra and C. M. Machteld. 1983. Effect of Thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of N⁶-(Δ^2 -Isopen-tenyl)[8-¹⁴C]Adenosine in callus tissue of *Phaseolus lunatus* L. Plant Physiol. 73: 796-802.
- Chung, J. D. and B. J. Park, 1985. Culture and organogenesis of fusion products from *Petunia hybrida* and *Solanum nigrum* protoplasts. Korean J. Plant Tissue Culture. Vol. 13, No 1: 1-13.
- Chung, J. D. and G. H. Kim. 1988. Callus formation from fusion product culture between cotyledon protoplasts of *Amaranthus tricolor* and mesophyll protoplasts of *Solanum tuberosum*. Korean J. Plant Tissue Culture Vol. 15. No 1: 45-59.
- Chung, P. V., K. P. Pauls and W. D. Beversdoff. 1987. Protoplasts culture and plant regeneration from *Brassica carinata* Btaun. Plant Cell Reports. 6: 67-69.
- Constable, F., J. W. Kirkpatrick and O. L. Gamborg. 1973. Callus formation from mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*. Can. J. Bot. 51: 2105 -2106.
- David and H. David. 1979. Isolation and callus formation from cotyledon protoplasts of Pine(*Pinus pinaster*). Z. Pflanzenphysiol. Bd. 94. S. 173-177.
- Fu, Y. Y., S. R. Jia and Y. Lin. 1985. Plant regeneration from mesophyll protoplasts culture of cabbage(*Brassica oleracea* var "capitata"). Theor Appl Genet. 71: 495-499.

- Gamborg, O. L., Miller, R.A. and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- Gatenby, A. A. and E. C. Cocking. 1977. Callus formation from protoplasts of marrow stem kale. *Plant Sci. Lett.* 8: 275-280.
- George, E. F. and P. D. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Limited. p. 300.
- 한 성규. 1988. 전기 자극법에 의한 *Petunia hybrida* 의 원형질체 융합. 한국 농화학 회지.
- Jee, S. O. and J. D. Chung. 1989. Protoplasts culture of flower Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC. forma *tricolor* Hort.). *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 30, 2: 96-107.
- Kao, K. N. and Michayluk, M. R. 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta(Berl.)*. 126: 105-110.
- Kao, K. N. and Michayluk, M. R. 1980. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of Alfalfa. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 96. S. 135 - 141.
- Kartha, K. K., M. R. Michayluk, K. N. Kao, O. L. Gamborg and F. Constabel. 1974. Callus formation and plant regeneration from mesophyll protoplasts of Rape plants(*Brassica napus* L. CV. Zephyr). *Plant Science Letters.* 3: 265-271.
- Kartha, K. K., O. L. Gamborg, F. Constabel and K. N. Kao. 1974. Fusion of rapeseed and soybean protoplasts and subsequent division of heterokaryocytes. *Can J. Bot.* 52: 2435-2436.

- Kaul, K., 1987. Plant regeneration from cotyledon-hypocotyl explants of *Pinus Strobus* L. Plant Cell Reports, 6: 5-7.
- Kerns, H. R. and Martin M. Meyer, Jr., 1986. Tissue culture propagation of *Acer x freemanii* using Thidiazuron to stimulate shoot tip proliferation. Hortscience, vol. 21, 5: 1209-1210.
- Kim, C. K., Y. B. Syn, J. D. Chung and J. H. Suh. 1990. Factors affecting protoplasts isolation and its culture from callus tissue of *Vitis labruscana* "Kyoho". Korean J. Plant Tissue Culture, Vol. 17, No. 4: 267-275.
- Kim, H. I., Y. H. Kim, T. Y. Chung and I. S. Ryn. 1986. Studies on protoplast fusion of *Allium sativum* with *Allium mananthum*. I. Effect of polyethylene glycol, high pH/Ca⁺⁺ solution and temperature treatments. Korean J. Plant Tissue culture, Vol.13, No. 1:37-44.
- Kim, J. C., K. W. Lee and D. H. Cho. 1988. Somatic Hybrids and its Genetic Behavior by Electro-protoplasts fusion. Korean J. Plant Tissue Culture, Vol. 16, 3: 187-193.
- Kim, M. R., U. D. Yeo and W. Y. Soh 1984. Studies on the isolation of viable protoplasts from callus induced from Embryonic cotyledones of the *Ginkgo biloba*. Korean J. Plant Tissue Culture, Vol. 11, No. 2: 129-136.
- Kinya Toriyama, Toshiak Kameya and Kokichi Hinata , 1987. Selection of a universal hybridizer in *Sinapis turgida Del.* and regeneration of plants from somatic hybrids with *Brassica Species*. Planta, 170: 308- 313.

- Kinya Toriyama, Toshiaki Kameya and Kokichi Hinata. 1987. Ability of callus growth and shoot regeneration in the wild species of *Brassicaceae*. *Plant Tissue Culture Letters*, 4(2) 75-78.
- Koop, H. U., 1985. Regeneration of plants after electrofusion of selected pairs of protoplasts. *European Journal of Cell Biology*. 39, 46-49.
- Kouider, M., R. Hauptmann, J. M. Widholm, R. M. Skirvin and S. S. Korban, 1984. Callus formation from *Malus x Domestica* cv. 'Jonathan' protoplasts. *Plant Cell Reports*, 5: 142-143.
- Krishnamurthy, K. V., D. A. Godbole and A. F. Mascarenhas. 1984. Studies on a drought resistant legume: The moth bean, *Vigna aconitifolia*(Jacq) Marechal. I. Protoplasts culture and Organogenesis. *Plant Cell Reports* 3: 30-32.
- Laine, E., H. David. 1988. Callus formation from cotyledon protoplasts of *Pinus oocarpa* and *Pinus patula*. *Physiologia Plantarum*. 72: 374-378.
- Lee, Y. H. and H. I. Kim, 1991. Plant regeneration from the protoplasts to Tong-il type Rice (*Oryza sativa* L.) variety taebaebyeo. *Korean J. Plant Tissue Culture*. Vol. 18, No. 1: 7-15.
- Luc Crepy, Marie-Christine Chupeau and Yves Chupeau. 1982. The isolation and culture of leaf protoplasts of *Cichorium intybus* and their regeneration into plants. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 107.S. 123-131.
- Min, S. R., W. J. Jeong, M. K. Kim, N. H. Song, J. R. Liu. 1991. Effects of growth regulators and osmotica on somatic embryogenesis in Rice (*Oryza sativa* L.). *Korean J. Plant Tissue Culture*. Vol. 18, 5: 331-335.

- Menczel, L. and K. Wolfe. 1984. High frequency of fusion induced in freely suspended protoplasts mixtures by polyethylene glycol and dimethylsulfoxide at high pH. *Plant Cell Reports* 3: 196-198.
- Monye, A. L., V. Tour, B. Pelissier, C. Bergounioux, G. Fressinet. 1988. Callus and embryoid formation from protoplasts of *Helianthus annuus*. *Plant Cell Reports*. 7:437-440.
- Morikawa, H., Y. Hayashi, Y. Harabayashi, M. Asada and Y. Yamada. 1988. Cellular and vacuolar fusion of protoplasts electrofused using Plakinum microelectrodes. *Plant Cell Physiol*. 29(1): 189-193.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15:473-497.
- Nagy, J. I. and P. Maliga. 1976. Callus induction and plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Nicotiana sylvestris*. *Z Pflanzenphysiol*. Bd. 78.S. 453-455.
- Ni L. and Y. W. Hazel. 1988. Protoplasts isolation and callus production from leaves of tissue-cultured *Vitis spp.* *Plant Cell Reports*. 7: 531-534.
- Oka, S. and K. Ohyama. 1985. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of *Broussonetia Kazinoki Sieb*(paper Mulberry). *Plant Physiol*. 119: 455-460.
- Park, Y. G., M. S. Choi and J. H. Kim. 1990. Plant regeneration of *Populus glandulosa* from mesophyll protoplasts. *Korean J. Plant Tissue Culture*. Vol. 17, 3: 189-199.

- Scheurich, P. and U. Zimmermann, 1981. Electrically stimulated fusion of different protoplasts, *Plant, Physiol.*, 67: 849-853.
- Senda, M., J. Takeda, S. Abe and T. Nakamura. 1979. Induction of cell fusion of plant protoplasts by electrical stimulation. *Plant Cell Physiol.* Tokyo. 20: 1441-1443.
- So, S. S., U. D. Yeo and W. Y. Soh. 1986. Isolation and Fusion of protoplasts from *Acacia* and *Bush* clover cultured cells. *Korean J. Plant Tissue Culture.* Vol. 13. No. 2: 137-142.
- Szabados, L. and W. M. Roca. 1986. Regeneration of isolated mesophyll and cell suspension protoplasts to plants in *Stylosanthes guianensis*. A tropical forage legume. *Plant Cell Reports.* 3:0 174-177.
- Tempelaar, M. J. and M. G. K. Jones. 1985. Fusion characteristics of plant protoplasts in electric fields. *Planta.* 165: 205-216.
- Toriyama, K. and K. Hinata. 1988. Diploid somatic-hybrid plants regenerated from rice cultivars. *Theor Appl Genet.* 76: 665-668.
- 유 순남. 1988. *Pelargonium* 속 식물의 육종을 위한 조직 배양, 원형질체 및 융합체 배양으로 부터의 callus 형성. 고려대학교 박사학위 논문.
- Yarrow, S. A., E. C. Cooking and J. B. Power. 1987. Plant regeneration from cultured cell-derived protoplasts of *Pelargonium aridum*, P.X

-
- hortorum* and *P. peltaatum*. Plant Cell Reports. 6: 102-104.
- Zimmermann, U., J. Vienken and G. Pilwat. 1981b. Rotation of cells in an alternating electric field : the occurrence of a resonance frequency. Z. Naturforsch. 36: 173-177.
- Zimmermann, U and J. Vienken. 1982. Electric field-induced cell-to-cell fusion. J. Membrane Biol. 67: 165-182.
- Zimmermann, U. and P. Scheurich. 1981. High Frequency fusion of plant protoplast by electric fields. Planta. 151: 26-32.

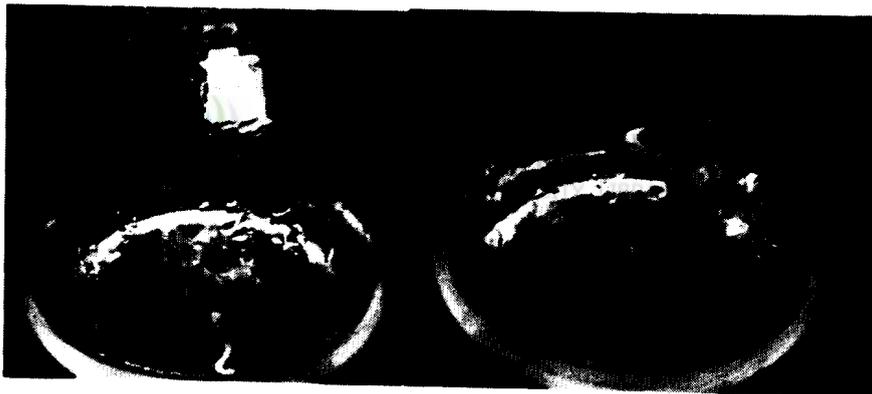




NAA 3 ppm +
BA 0.5 ppm

NAA 3 ppm +
BA 1 ppm

Photo. 1. Shoot regeneration by NAA and BA treatment.



IAA 0.1 ppm +

IAA 3 ppm +

Kinetin 2 ppm

Kinetin 0.5 ppm

Photo. 2. Shoot regeneration by IAA and kinetin treatment.



Photo. 3. Shoot regeneration by Thidiazuron and Fulmet treatment.



Photo. 4. Root formation after shoot regeneration.

Photo. 5. Transplanted to soil after root formation.

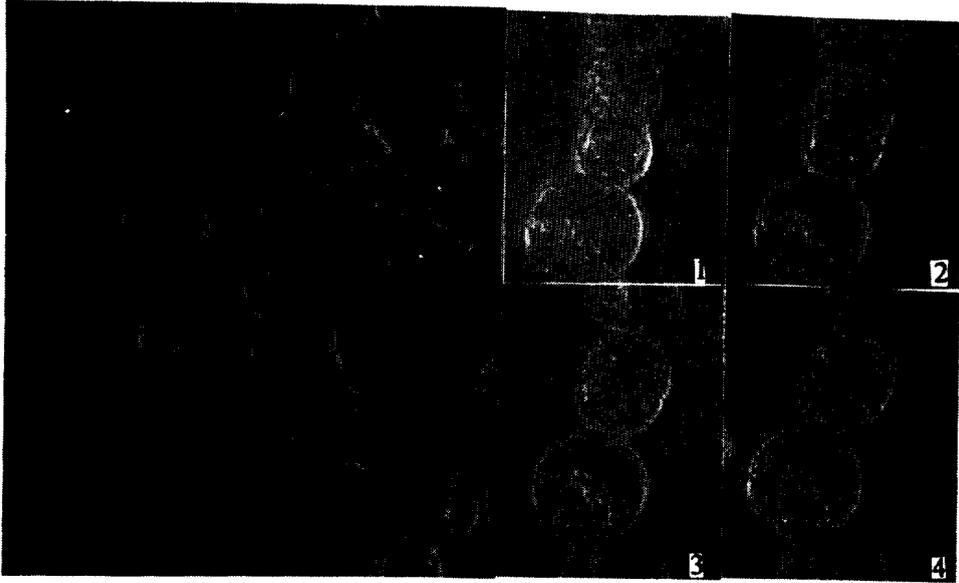


Photo. 6. Freshly isolated protoplast from *Geranium* callus.

Photo. 7. Progress of protoplast fusion.



Photo. 8. Cell wall regeneration 2 days after protoplast culture.

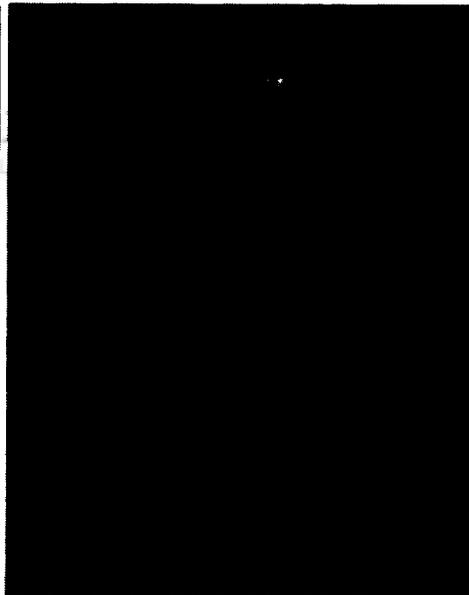


Photo. 9. The First Cell division 4 days after protoplast culture.

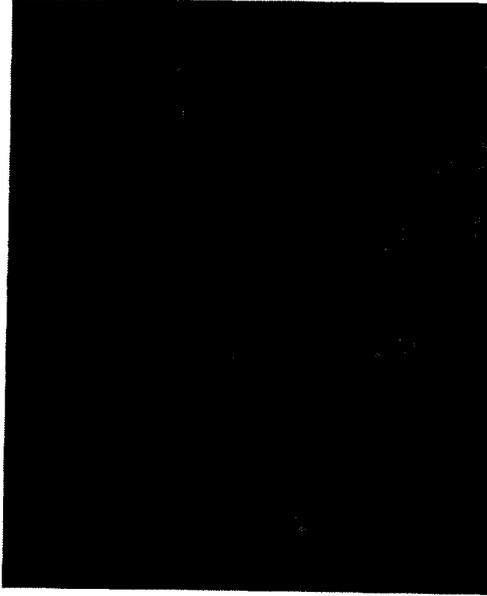


Photo.10. The Secound cell division
7 days after protoplast
culture.

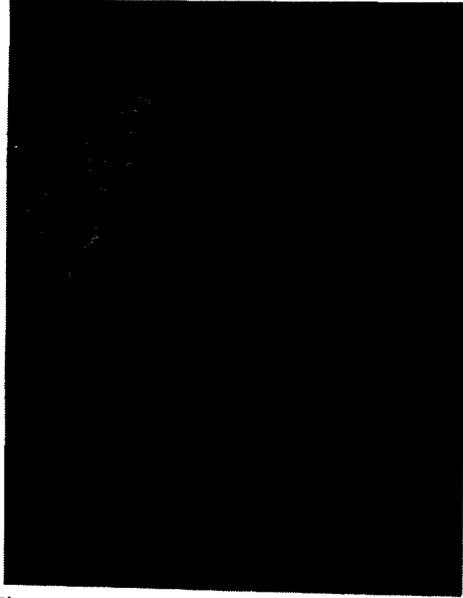


Photo. 11. The third and fourth cell
division 10 days after
protoplast culture.

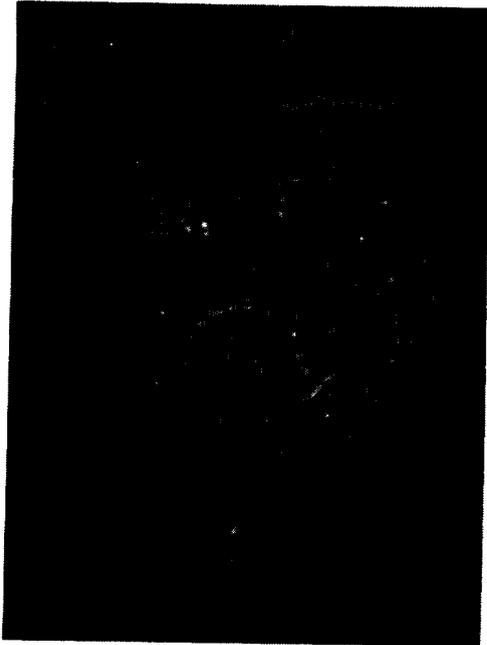


Photo.12. Cell colony formation from
protoplast 15 days after
culture.



Photo.13. Micro callus formation
from protoplast culture
30 days after culture.

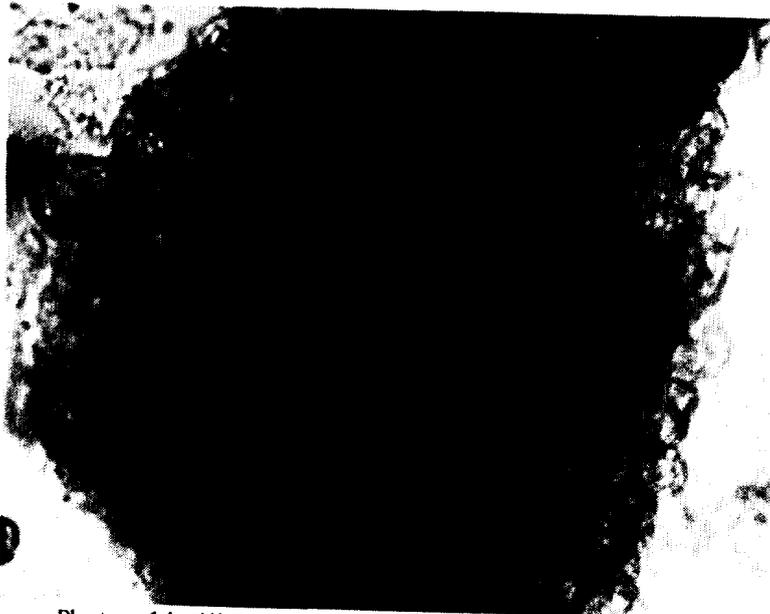


Photo. 14. Micro callus formation from protoplast culture 40 days after culture.

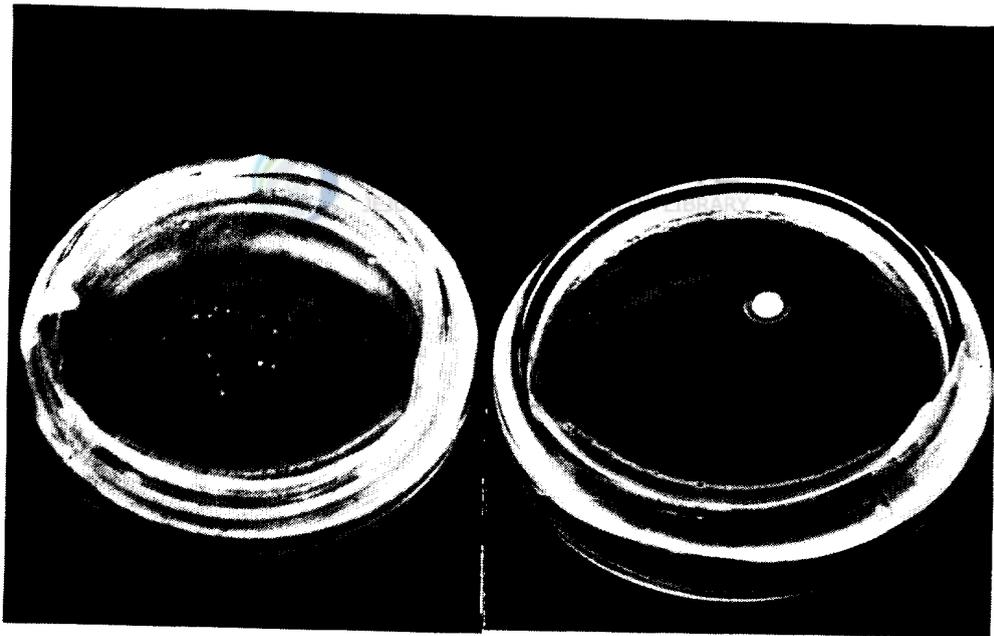


Photo.15. Micro callus formation from protoplast culture 8 weeks after culture(in agar medium)

Photo.16. Micro callus formation from protoplast culture 12 weeks after culture(in agar medium)

감사의 글

본 논문이 완성되기 까지 아낌없는 지도와 격려를 해 주신 유 장걸 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 바쁘신 중에도 논문 심사는 물론 실험 수행에 도움을 주신 원예학과 소 인섭 교수님과 류 기중 교수님께 감사를 드리며, 항상 사랑으로 이끌어 주신 강 순선 교수님, 고 정삼 교수님, 현 해남 교수님, 김 찬식 교수님께도 감사를 드립니다.

또한, 어려운 여건 속에서도 실험을 수행할 수 있도록 배려해 주신 방사능 이용 연구소 김 재하 소장님과 실험 수행에 있어서 처음부터 마지막까지 많은 도움을 주신 송 성준, 홍 경애 선배님과 직원 여러분께 감사를 드립니다.

어려울때 도움을 주신 한 동휴 제주도 농촌 지도소장님과 평소에 많은 조언을 해 주신 고 정은 선배님, 임 한철 선배님, 동료 대학원생들께 감사를 드리며, 항상 나를 염려해 준 친구분들에게도 우정의 마음을 전합니다.

특히 모든 일을 내일처럼 여겨 많은 노력과 따뜻한 마음을 아끼지 않은 친구 치택과 이 동은, 박 광석, 김 기홍 선배님께 이 지면을 빌어 감사를 드립니다.

끝으로 오늘이 있기까지 끝없는 사랑과 염려로 오직 학문에만 전념할 수 있도록 하여 주신 부모님과 가족들에게 이 논문을 올립니다.