


碩士學位論文

참다래 *Actinidia chinensis*와 *A. deliciosa*
조직 유래 켈러스의 원형질체 분리,
배양 및 식물체 재분화

The background features a large, faint watermark of the Jeju National University logo. The logo is circular, containing a stylized flame or leaf design in blue, green, and purple. The text 'JEJU NATIONAL UNIVERSITY 1952' is written around the perimeter, and 'JEJU 1952' is in the center. Below the logo, the Korean text '제주대학교' is also visible.

濟州大學校 大學院

食品工學科

吳 秉 敦

2010年 2月

참다래 *Actinidia chinensis*와 *A. deliciosa*
조직 유래 캘러스의 원형질체 분리,
배양 및 식물체 재분화

指導教授 高榮煥

吳秉敦

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 提出함

2010년 02월

吳秉敦의 工學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 金星徹 (印)

委員 任尙彬 (印)

委員 高榮煥 (印)

濟州大學校 大學院

2010年 2月

Protoplast isolation, culture and Plant regeneration from callus in Kiwifruit *Actinidia chinensis* and *A. deliciosa*

Byungdon Oh
(Supervised by professor Young-Hwan Ko)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of Master of Engineering

2010. 02

This thesis has been examined and approved.

Thesis director, Seong-Cheol Kim, Ph. D., National Agricultural research Center for Climate Change, Rural Development Administration

Sang-Bin Lim, Prof. of Food Science and Engineering, Jeju National University

Young-Hwan Ko, Prof. of Food Science and Engineering, Jeju National University

February 2010

Department of Food Science and Engineering
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

List of Tables	i
List of Figures	ii
Abbreviations	iii
Abstract	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	
1. 식물재료	7
2. 원형질체 분리	8
3. 원형질체 배양	10
4. 기관분화 및 식물체 재분화	13
5. 원형질체로부터 얻은 식물체의 변이 검정	
1) 형태학적 특성비교	13
2) 변이 검정을 위한 배수성 판정	14
III. 결과 및 고찰	
1. 유도된 캘러스의 특성 비교	15
2. 원형질체의 분리 조건	
1) 효소종류와 농도의 영향	17
2) 효소처리시간의 영향	18
3) 삼투농도의 영향	19
4) 순수하게 분리된 원형질체의 특성	20

3. 원형질체 배양 조건 확립	
1) 배양방법과 배양배지에 따른 세포분열 효과	21
2) 식물생장호르몬에 따른 세포분열 효과	24
4. 기관분화 및 식물체 재분화	26
5. 원형질체로부터 얻은 식물체의 형태학적 특성비교	30
6. 배수성 판정	33
IV. 요약	36
참고문헌	37
감사의 글	41



List of Tables

Table 1. Comparison of fruit and growth properties among three cultivars (<i>A. deliciosa</i> cv. 'Hayward', 'Daeheung', and <i>A. chinensis</i> cv. 'CS9413')	6
Table 2. Composition of washing and floating solution	8
Table 3. Enzyme combinations used for protoplast isolation	9
Table 4. Composition of culture media	12
Table 5. Flow cytometric condition for determination of variation on regenerated plants from protoplasts	14
Table 6. Callus formation, size, and color from petioles, leaves and roots	16
Table 7. Enzyme combination for the isolation of protoplasts	17
Table 8. Effect of basal media and culture types on cell division	22
Table 9. Effect of plant growth regulators on cell division	24
Table 10. Effect of plant growth regulators on organogenesis	28
Table 11. Morphologic characteristics of clones from protoplasts in <i>A.</i> <i>chinensis</i> cv. 'CS9413'	31

List of Figures

Fig. 1. Fruit set and flesh of <i>A. chinensis</i> cv. 'CS9413' and <i>A. deliciosa</i> cv. 'Daeheung'	6
Fig. 2. Callus induced from petioles	16
Fig. 3. Effect of enzyme treatment time on protoplast yield in leaves and petioles-callus in <i>A. chinensis</i> cv. 'CS9413'	18
Fig. 4. Effect of mannitol conc.(osmotic pressure) on protoplast yield in leaves and petioles-callus in <i>A. chinensis</i> cv. 'CS9413'	19
Fig. 5. Freshly isolated protoplasts from callus	20
Fig. 6. Effect of culture types on the planting efficiency (initiated after 2month protoplast culture)	22
Fig. 7. Cell division and colony formation from callus-protoplasts	25
Fig. 8. Observation of organogenesis and shoot formation in <i>A. chinensis</i> cv. 'CS9413'	27
Fig. 9. Plantlet regeneration from protoplasts in <i>A. chinensis</i> cv. 'CS9413'	
Fig. 10. Plantlet regeneration from protoplasts in <i>A. deliciosa</i> cv. 'Daeheung'	29
Fig. 11. Morphologic characteristics of regenerated plants from protoplasts	32
Fig. 12. Flow cytometric histograms of protoclones in <i>A. chinensis</i> cv. 'CS9413' (Diploid, $2n=2x$)	34

Abbreviations

- BA : Benzyladenine
- CPW : Cell and protoplast washing
- DAPI : 4,6-diamidino-2-phenylindole-2HCl
- IAA : Indole-3-acetic acid
- IBA : Indole-3-butyric acid
- MES : (2-N-Morpholino)ethane sulfonic acid
- MS : Murashige and skoog
- NAA : α -Naphthaleneacetic acid
- NN69 : Nitsch and Nitsch 1969
- TDZ : Thidiazuron
- 2ip : 6-(gamma,gamma-Dimethylallylamino)purine
- 2,4-D : 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

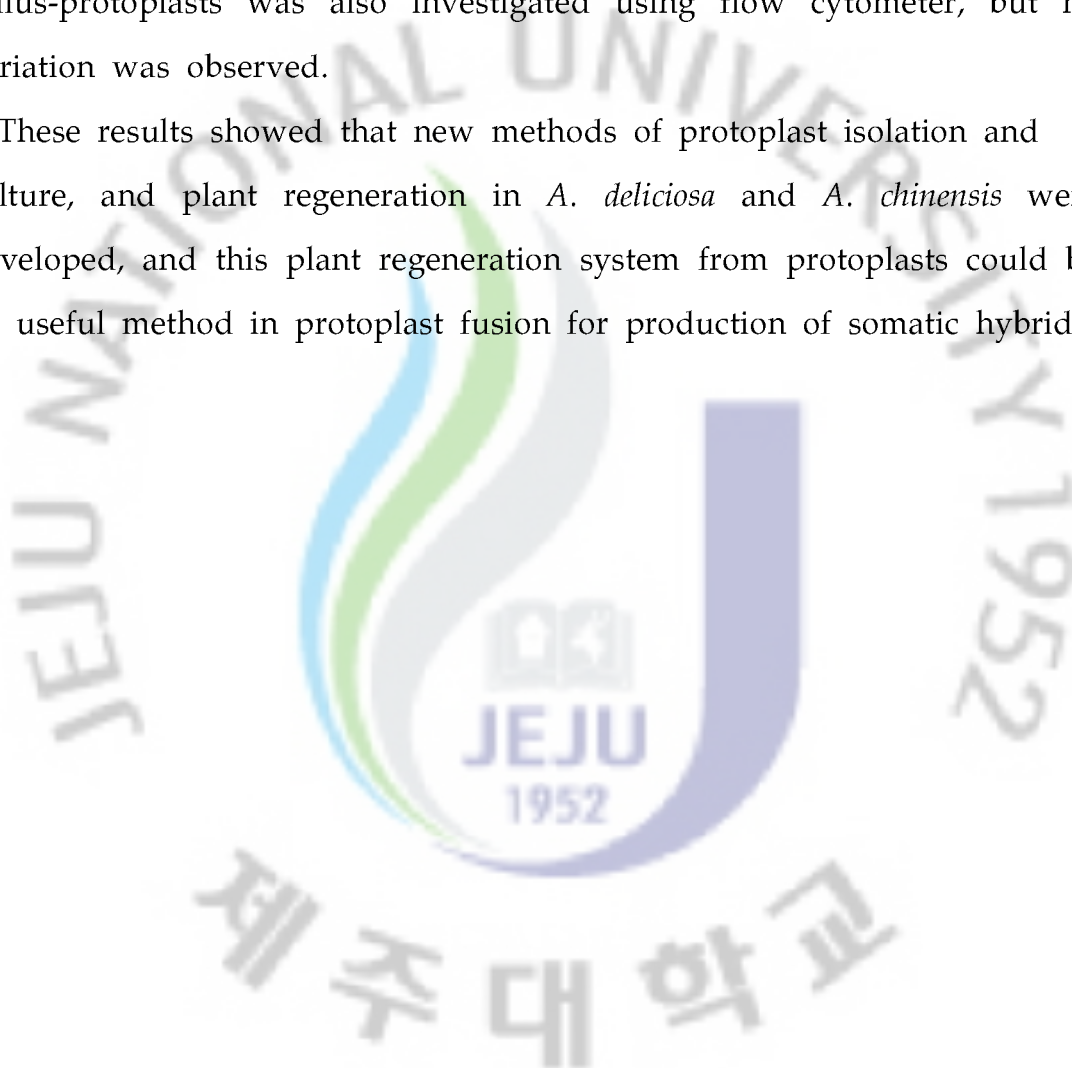
Abstract

Protoplast isolation and culture, and plant regeneration were performed using *Actinidia deliciosa* cv. 'Daeheung' and *A. chinensis* cv. 'CS9413' for developing new cultivars of kiwifruit. The calluses derived from petioles with one month initiation were found to be a good source of protoplasts. Protoplast isolation was optimized in terms of enzyme types and treatment time, and mannitol concentration with slices of callus tissue incubated in CPW13M in dark for 1 h. The optimum enzyme combination was 1.5% Cellulase R10 and 0.5% Macerozyme in CPW Salts containing mannitol and 3 mM MES (pH 5.6) for about 8 h. 0.5 M mannitol was the best in adjusting osmoticum for protoplast isolation from callus. Culture media and types, and plant growth regulators were important factors in cell division, colony formation and plant regeneration. MS(-NH₄NO₃) medium containing 0.2 M glucose, 0.4 M mannitol, 10 g/L sucrose, 1 mg/L 2,4-D, 0.05 mg/L zeatin as a liquid medium over the solid culture was effective for protoplast culture.

First cell division occurred after 5 ~ 7 days in culture and microcalli were observed after 2 months. Addition of fresh medium with low osmoticum was necessary for protoplasts to form visible microcolonies. Greenish small calluses (2 ~ 4 mm) were transferred to semi-solid medium for organogenesis. MS medium with 0.1 mg/L BA and TDZ was the best in *A. deliciosa* species, while MS medium with 0.5 or 1.0 mg/L zeatin in *A. chinensis* species. Variation of regenerated plants from protoplasts was determined based on morphologic characteristics

and flow cytometer. From morphologic characteristics, several clones of *A. chinensis* cv. 'CS9413'(CS-4, 7, 8, 14, 30, 39) were different in leaf shapes, colors and density of hairness. Clonal variation of clones from callus-protoplasts was also investigated using flow cytometer, but no variation was observed.

These results showed that new methods of protoplast isolation and culture, and plant regeneration in *A. deliciosa* and *A. chinensis* were developed, and this plant regeneration system from protoplasts could be an useful method in protoplast fusion for production of somatic hybrids.



I. 서 론

참다래(kiwifruit)는 다래나무속(genus *Actinidia*)에 속하는 다년생의 덩굴성식물이다. 다래나무속은 동 아시아의 아열대 지역, 특히, 중국과 그 주변국가에 자생하며 약 65여종과 110분류군을 포함하고 있다(Ferguson, 1990). 참다래는 뉴질랜드에서 1920년대 초에 육종된 후 뉴질랜드의 국조인 kiwi새와 유사하다하여 상품명으로서 '키위푸르츠(Kiwifruit)'라는 이름으로 전 세계에 알려지게 되었다. 국내에는 1974년에 묘목이 도입되어 제주도 및 남해안 일대 일부농가에서 재배되기 시작하였으며 '양다래'라는 이름이 통용 되어오다가 '참다래'로 개칭되어 현재까지 이르고 있다.

참다래는 항산화효과와 면역 활성을 가지는 것으로 인식되는 높은 비타민 C 함량(92.7 mg/100 g)(USDA, 2004)를 포함하여 다양한 영양소를 가지며 변비효과 등에도 탁월하여 건강을 중시하는 현 시대에 어울리는 과일이다(R. G. Atkison과 E. A. Macrae, 2007). 또한 FAO에 따르면 전 세계 총 생산량은 최근 10년간 꾸준히 증가하는 추세를 보이며 현재 전 세계 재배면적은 100,000 ha, 생산량은 백만 톤을 넘어섰으며 그 소비량도 점차 증가하고 있어 경제적으로 재배에 대한 전망이 매우 밝다(FAO, 2007). 국내에서도 2002년 2만천 톤에서 2004년 3만6천 톤, 그리고 2006년에는 4만 7천 톤으로 소비량이 계속적으로 증가하고 있다(Kim, 2007).

전 세계적으로 재배되고 있는 품종은 '헤이워드(*A. deliciosa* cv. 'Hayward'))로 우리나라에서도 재배면적의 85%에 해당한다. 이 품종은 재배가 용이하고 품질과 저장력이 우수하지만, 과육내의 calcium oxalate로 인하여 한번에 많은 양을 먹을 수 없는 단점이 있다. 또한 만생종으로서 11월 중하순에야 수확되기 때문에 10월 하순 서리가 내리는 우리나라 남부지역에서는 빠른 수확으로 인하여 품질이 낮아지는 원인이 되고 있다.

최근에 소비자들이 보기 좋고 맛있는 참다래에 대한 요구로 과육색이 다양하면서도 당도가 높고 맛있는 품종들이 개발되고 있다. 특히 뉴질랜드에서는 1990년대 초 'Hort16A'를 개발하여 "제스프리골드"라는 이름으로 전 세계의 참다래

시장을 공략하고 있다. 우리나라에서는 농촌진흥청을 중심으로 1990년대 초부터 교배육종을 실시하여 왔으며 최근에 '제시골드'와 '제시스위트' 등 신품종들이 보고되고 있다(Kim 등, 2007, 2009).

참다래에서 신품종 육종은 암그루와 수그루 간의 교배에 의하여 만들어진다. 최근까지도 교배육종에 의해 많은 품종들이 보고되고 있지만 재배품종은 극히 미미한 실정이다. 이는 교배육종의 한계로서 유전자원의 제한이나 중간교배가 이루어지지 않는 계통들, 즉, 성적 불화합성(Sexual incompatibility)인 품종이 존재하게 되고 이에 따라 종자의 미생성, 조기낙과 등의 현상이 발생하게 된다. 또한 자웅이주 식물로 과실의 크기나 품질 등 수품종의 육종학적 가치를 판단하는데 어려움이 있으며 타 과수와 마찬가지로 교배가 되어 종자가 형성되더라도 종자에서 꽃이 피어 과실이 결실하기 까지 영양생장이 지속되는 유년성이 존재하기 때문에 세대진전을 위해서는 약 10년 이상의 시간이 요구되는 등 오랜 육종기간과 많은 육종비용이 필요하다(안 등, 2008). 따라서 이러한 전통적인 교배육종의 문제점들을 해결할 수 있는 대안의 방법으로 체세포 변이(Somaclonal variation)와 조직배양을 통한 육종방법(Hirsch 등, 1992), 그리고 형질전환(Kim, 2007), 분자마커 개발(kim 등, 2002), 원형질체 융합을 통한 체세포 잡종체 생산(Xiao 등, 2004) 등 생명공학을 이용한 효과적인 육종방법들이 이에 적용되고 있다. 원형질체 융합을 통한 체세포 잡종체 생산은 성적 불화합성을 극복할 수 있을 뿐만 아니라 육종학적 가치를 가지는 암품종간 조합을 가능케 하여 참다래 품질 향상에 매우 효과적일 것으로 사료된다(Park 등, 1986).

한편, 원형질체의 배양은 하나의 세포에서 유래되는 다량의 재분화 식물체를 확보할 수 있는 이점을 지니고 있으며 이러한 원형질체의 분리 및 배양조건의 확립을 통한 완전한 식물체의 형성은 원형질체 융합을 통한 체세포 잡종체 생산이나 유전자이식을 통한 형질전환을 위한 기본 조건이다. 따라서 참다래에 있어서도 원형질체의 분리, 배양, 기관분화를 통한 재분화된 식물체를 얻는 것이 매우 중요하다고 볼 수 있다(Tsai, 1988; M.M. Oliveira 와 M. Salome S. Pais, 1991). 이는 식물에서는 동물세포와 달리 단세포에서 원래의 완전한 식물체로 복제될 수 있는 전형성능(totipotency) 때문에 가능할 결과라 할 수 있겠다(Vasil 등, 1972).

현재까지 참다래의 원형질체 관련 연구는 *A. chinensis*(Xiao 와 Han, 1997)와 *A. deliciosa*(Mii 와 Ohashi, 1988; Oliveira 와 Pais, 1991; Tsai, 1988)의 캘러스 유래 원형질체로부터 식물체 재분화, 잎에서 분리된 원형질체의 식물체 재분화(Zhang 등, 1998; Raquel 과 Oliveira, 1996), *A. chinensis* 과 *A. kolomikta* 이종간 체세포 잡종과 그것의 내한성(Xiao 등, 2004)에 관한 연구가 이루어졌으나 아직 까지도 이에 대한 연구가 전 세계적으로 계속되고 있으며 우리나라에서는 참다래의 원형질체 분리, 배양 및 융합에 관한 보고가 없는 실정이다.

'대홍'은 1997년 중국에서 수집된 *A. deliciosa* 종자에서 선발한 품종이다. 과실무게는 120 g, 당도가 15.3 °Brix인 우수한 계통으로서 전라남도지역을 중심으로 10 ha정도 재배되고 있지만 저장력이 약하고 유통기간이 짧아 농가들이 저장력 향상에 대한 연구를 요구하는 품종이다. 'CS9413'은 1997년에서 수집된 *A. chinensis* 계통으로서 과중은 80 ~ 107 g 으로 황색과육의 당도가 15.4 °Brix인 고당도 품종이지만 과실모양이 납작하고 '제스프리골드'처럼 과일 끝이 튀어나와 상품가치가 떨어진다고(박 등, 2009).

따라서 본 연구에서는 '대홍'의 저장력 향상과 'CS9413'의 모양 개선과 원형질체 융합을 통한 신품종 개발의 기초자료로 이용코자 원형질체 분리, 배양 및 재분화 조건을 구명하였다.



Fig. 1. Fruit set and flesh of *A. chinensis* cv. 'CS9413'(left) and *A. deliciosa* cv. 'Daeheung'(right).

Table 1. Comparison of fruit and growth properties among three cultivars(*A. deliciosa* cv. 'Hayward', 'Daeheung' and *A. chinensis* cv. 'CS9413')

Cultivar	Flowering time (month/day)	Weight (g)	Sugar contents (°Brix)	Shape	Flesh color	Vigour	Harvest season	Ploidy
Hayward	05/22~05/28	92.7	13.8	ellipsoid	Green	medium	11.03~11.08	2n=6x
Daeheung	05/15~05/20	120	15.3	oblong	Light green	strong	10.28~11.03	2n=6x
CS9413	04/22~04/27	80~107	15.4	ovoid ¹⁾	Golden	strong	09.20	2n=2x

¹⁾UPOV Test guideline for kiwifruit 66. Fruit(general shape of stylar end) 6. strongly blunt protruding

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

식물 재료는 온난화대응농업연구센터 내 참다래 포장하우스에서 채취한 *A. chinensis* cv. 'CS9413'와 *A. deliciosa* cv. '대홍'의 접수에서 액아를 기내로 도입하여 사용하였다. 기내도입은 약 3주간 증류수에서 액아를 유도하고 얻어진 액아가 포함된 잎을 제거한 마디를 절단하여 70%(v/v)에탄올에 1분간 담근 후 Tween 20 1 ~ 2방울이 첨가된 1% sodium hypochlorite solution (v/v)에서 약 7분간 소독하였다. 멸균증류수로 4번 정도 세척을 해준 다음 양 끝 부위를 절단한 후 호르몬이 첨가되지 않은 MS배지에 3% sucrose와 0.8%의 agar를 혼합한 배지를 포함하는 test tube에 배양하였다(121°C에서 15분간 멸균 전에 1 NaOH를 이용하여 pH 5.8 보정). 생장한 신탄는 대량 증식을 위해 식물생장호르몬인 BA 1 mg/L, IBA 0.1 mg/L, 그리고 3% sucrose와 0.8% agar가 첨가된 MS배지가 담긴 500 mL의 배양병에 계대배양하였다. 모든 배양은 16시간 광주기, 조도 1000 Lux, 그리고 25±1°C의 온도 하에서 배양하였다.

실험재료로 사용된 캘러스는 3% sucrose, 0.8% agar와 식물호르몬인 2,4-D 0.1 mg/L 이 첨가된 MS 배지에 암 배양하여 유도한 후 3 ~ 4주 간격으로 동일배지에 계대 배양된 흰색의 무른 캘러스를 분리에 사용하였다. 각 조직별 캘러스 형성률, 크기, 색깔 등 특성을 살펴보기 위해 기내 배양 중인 식물체의 잎, 엽병 그리고 뿌리를 채취해 약 0.5 ~ 1 cm 크기로 자른 후 배양하였다.

2. 원형질체 분리

원형질체 분리는 Xiao 등(2004)의 방법을 변형하여 사용하였으며, 본 실험에 이용된 CPW13M과 25% sucrose 용액 및 효소용액의 조성은 Table 2와 3에 나타내었다. 약 1시간 정도 CPW13M용액에 암배양 전처리된 캘러스를 조직배양용 칼로 가늘게 자른 후 압조건 하에서 효소조합별로 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 50 rpm으로 처리하였다. 약 6 ~ 8시간 정도 효소 처리된 혼합액은 150 혹은 200 mesh망으로 걸러낸 다음 100 xg로 5분간 원심분리 하였다. 상정액을 제거한 후 남아있는 pellet에 25% 설탕이 첨가된 CPW용액을 3 mL첨가하여 잘 혼합한 후 CPW13M용액 2 mL을 벽을 따라 천천히 농도구배가 생기도록 첨가한다. 이것을 다시 100 xg로 10분간 원심분리 한 다음 25% 설탕용액과 CPW13M용액 사이에 모아진 원형질체를 수집하였다. 수집된 원형질체는 CPW13M용액으로 100 xg로 5분간 2 ~ 3회 정도 세척하였고 다시 원형질체 배양배지에서 재현탁하였다.

Table 2. Composition of washing and floating solution¹⁾

Composition	Washing solution (mg/L)	Floating solution (mg/L)
CPW	KH ₂ PO ₄	27.2
	KNO ₃	101.0
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1480.0
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.0
	KI	0.16
	CuSO ₄ ·7H ₂ O	0.025
	mannitol	13%
sucrose	-	25%
pH	5.8	5.8

¹⁾Frearson *et al.*, 1973

원형질체 분리를 위한 효소들은 Cellulase onozuka R-10, Macerozyme R-10(Yakult pharmaceutical Co. Ltd., Japan), Driselase(Sigma aldrich Inc. USA), Pectolyase Y-23(Kyowa hakko kogyo Co. Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하였고 모든 효소조합들은 0.7 M mannitol과 3 mM MES가 포함된 CPW용액에 용해하여 사용하였다. 다른 효소와 달리 Driselase는 용해 후 100 xg로 3 분간 원심분리 후 얻어진 상정액을 이용하였다. 효소액의 멸균은 0.45 μm MCE syringe filter를 이용하여 멸균하였고 pH는 5.6으로 보정하였다.

Table 3. Enzyme combinations used for protoplast isolation¹⁾

Enzyme ²⁾	Cellulase R-10	Pectolyase Y-23	Macerozyme R-10	Driselase
E1	1.5	0.05	-	0.5
E2	1.0	0.05	-	0.5
E3	1.0	0.05	-	0.5
E4	1.5	-	0.5	-
E5	1.5	-	0.1	-
E6	1.0	-	0.5	-

¹⁾All enzyme combinations were dissolved in CPW Salts contained 0.6 M mannitol, and 3 mM MES and the pH of the enzyme solution was adjusted to 5.6 before it was filtered using 0.45 μm MCE syringe filter.

²⁾Cellulase onozuka R-10, Macerozyme R-10(Yakult pharmaceutical Co. Ltd., Japan)
 Driselase(Sigma aldrich Inc. USA)
 Pectolyase Y-23(Kyowa hakko kogyo Co. Ltd., Tokyo, Japan)

분리 최적 조건을 확립하기 위해 원형질체의 생존력과 분리수율에 관계하는 효소조합, 삼투농도에 따른 분리수율을 확인하였다. 효소조합은 위의 Fig. 4와 같이 조합을 구성하여 처리한 후 그 결과를 확인하였다. 삼투농도는 0.5, 0.7, 그리고 0.9 M의 mannitol을 각각 첨가하여 분리수율을 확인하였고 효소처리시간에 따른 효과는 효소액 처리 후 2, 4, 6, 8, 10, 그리고 12시간 후 각각의 분리수율을 확인하였다. 원형질체 분리수율은 hemocytometer(Marienfeld, Germany)를 이용하여 측정하였고 생체 중 1 g 당 원형질체수로 환산하였다. 커버글라스가 포함된 hemocytometer의 각 사각형은 10^4 cm^3 ($1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ mL}$)를 나타내며 mL 당 총 세포의 수는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{밀리리터 당 세포수} = \text{격자당 평균 수} \times 5(\text{희석배수}) \times 10^4$$

3. 원형질체 배양

순수하게 분리된 원형질체는 그 밀도를 약 $1 \times 10^4 \sim 10^5 \text{ cells/mL}$ 로 조절하고 초기 5주간 원형질체 배양배지를 이용하여 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 암배양을 실시하였으며 주기적으로 세포분열을 관찰하였다. 원형질체 배양 조건을 알아보기 위해 원형질체를 기본배지인 MS, MS(1/2 Macro), MS(- NH_4NO_3), NN69(modified), TCCW, B5에 삼투조절물질로 mannitol, 그리고 glucose를 각각 0.4 M과 0.2 M 혼용 사용하고 원형질체의 세포분열과 생존율을 높이기 위해 casein hydrolysate(100 ~ 200 mg/L), coconut water(2%)를 첨가하였다. 성장조절제는 auxin류 인 2,4-D와 NAA를 0.5, 1.0 mg/L, cytokinin류 인 BA와 zeatin을 0, 0.1, 0.5 mg/L로 하여 단용 혹은 혼용 처리하여 배양하였다.

배양방법으로는 액체배지, 고체배지 위에 액체배지, 고체배지에서 병행하여 실시하였다(Park, 1998). 액체배지를 이용한 방법은 액체배지에 적정밀도로 희석된 원형질체를 파스퇴르 피펫을 이용하여 유리 혹은 플라스틱용기(60×15 mm)에 12 ~ 15 방울 정도 떨어뜨려 얇게 펴서 파라필름으로 밀봉하여 배양하였고, 고체배지

위에 액체배지에서의 배양은 0.6% agar가 첨가된 고체배지 위에 원형질체를 함유한 액체배지를 얇게 도말하고 밀봉하여 배양하였다. 고체배양은 원형질체를 액체배지에 적정농도로 희석시킨 다음 액체배지와 동일한 양에 녹은 0.3% 한천배지를 45°C 항온 수조 내에서 잘 섞은 후 배양용기에 분주하고 밀봉하여 배양하였다. 모든 배양은 25±1°C 조건 하에서 암배양 하였으며, 원형질체 초기분열 이후에는 25±1°C, 1000 Lux, 광주기 16시간 명, 8시간 암 조건을 유지하면서 세포분열을 유도하였고 계대배양은 삼투조절제인 mannitol이 제거된 동일배지 0.2 mL를 첨가하면서 점차 삼투농도를 줄여 나갔다.



Table 4. Composition of culture media¹⁾

Constituent	Media						
	MS	MS (-NH ₄ NO ₃)	MS (1/2macro)	NN69	TCCW	B5	
Macro nutrients	NH ₄ NO ₃	1650	-	-	367.15	360	-
	KNO ₃	1900	1900	950	1309.09	1900	2500
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	332.2	332.2	166.1	166	450	113.24
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	180.7	180.7	90.35	185	370	122.09
	KH ₂ PO ₄	170	170	85	68	200	-
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	-	-	-	-	-	130.5
	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	-	67	134
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.8	13.9	27.8	11.12	27.8
	Na ₂ -EDTA	37.26	37.26	18.63	37.3	14.92	37.26
Micro nutrients	H ₃ BO ₃	6.2	6.2	6.2	10	10	3
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	16.9	16.9	16.9	25	25.67	16.9
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	8.6	8.6	10	10	2
	CuSO ₄ ·7H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.025	0.025	-	0.025	0.025
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
	KI	0.83	0.83	0.83	-	-	0.75
Vitamins	Myo-inositol	100.00	100.00	100.00	-	100	-
	Nicotinic acid	0.5	0.5	0.5	-	1	-
	Pyridoxine-HCl	0.5	0.5	0.5	-	0.5	-
	Thiamine-HCl	0.1	0.1	0.1	-	1	10.00
	Glycine	2.00	2.00	2.00	-	2	-
	Biotin	-	-	-	-	0.01	-
	Folic acid	-	-	-	-	0.5	-

¹⁾The pH of all the media is adjusted at 5.8, Autoclave at 121 °C, for 15 min, 0.7% agar(For solid media)

세포 분열율은 원형질체 배양 개시 후 7, 14, 21일 후 분열된 세포를 관찰하여 확인하였으며 배양용기 일정구역의 약 200여개의 원형질체를 무작위로 선정하여 카운팅하였다. 세포 분열은 다음의 공식에 따라 계산하였다.

$$\text{세포분열} = \frac{\text{분열하는 원형질체 수}}{\text{일정 면적 내에서 관찰된 원형질체 수}}$$

4. 기관분화 및 식물체 재분화

원형질체를 배양하고 약 7 ~ 8주 후에는 눈에 보일 정도의 미세한 캘러스가 형성되면 기관분화를 위해 기관분화배지로 이식하였다. 성장한 캘러스로부터 기관 분화하여 신초로 재분화 시킬 수 있는 적정배지를 선발을 위해 auxin류인 2,4-D를 제거하고 cytokinin류(zeatin, BA, TDZ, 2ip)를 단용 처리하여 신초유기를 유도하였고 또한 비교적 저농도의 IAA와 NAA를 혼용 첨가하여 기관분화조건을 확인하였다. 성장한 신초는 zeatin 0.5 mg/L이 첨가된 MS배지에 마디 계대 배양을 통해 증식하였다.

5. 원형질체로부터 얻은 식물체의 변이검정

1) 형태학적 특성비교

원형질체로부터 형성된 식물체의 변이를 조사하기 위해 잎과 엽병을 중심으로 변이를 확인하였다. 대조구는 기내에서 마디배양을 통해 계속 증식하고 있는 기존의 식물체와 원형질체의 모체가 되는 엽병캘러스로부터 형성된 식물체를 사용하였고 이들과 원형질체로부터 형성된 클론체들 간의 차이를 비교하였다. 특성비교항목은 엽신 모양, 엽신 표면 색깔과 털, 엽병의 털 밀도, 잎 그리고 총 길이를 중심으로 비교하여 조사하였다. 형태학적 특성 조사는 농림수산식품부 작물별 특성조사요령의 조사기준(NSMO, 2002)을 참고하여 비교하였다.

2) 변이 검정을 위한 배수성 판정

배수성을 측정하기 위해 식물체 잎을 0.5 cm² 정도의 길이로 자른 후 페트리디쉬에 놓고 nuclei extraction buffer(A solution, partec HR-A solution)를 한 두 방울 떨어뜨린 다음 면도칼로 잘게 자르고 0.5 mL을 다시 첨가하여 부드럽게 흔들어 현탁 시료를 제조하였다. 이 현탁 시료는 30 μm partec CellTrics™을 통해 튜브로 걸러 DAPI가 포함된 2 mL의 staining buffer(B solution)을 가하여 핵을 형광염색하였다.

배수성판정(Flow cytometry)을 위해서 HBO-100 W mercury lamp와 dichroic mirror(TK420)을 갖춘 Ploidy Analyser(PA II, Partec, Germany)를 이용하였고 그 결과는 DPAC software(Partec)로 해석하였다. 먼저 염색체 관찰을 통해 2배체로 확인된 개다래(*A. polygama*)의 잎을 재료로 하여 channel number 50에 peak와 gain 값을 조정된 다음 측정할 시료를 주입하여 그 차이를 비교함으로써 배수성을 비교분석하였다. 분석 시 한 개의 시료는 최소한 1,500 particles 이상 분석하였고 데이터는 2C에서 64C의 높은 내배수성을 한축으로 보여주기 위해 semi-logarithmic scale로 분석하였다. 배수성 차이를 확인하기 위해 기내배양 중인 'CS9413'의 어린 잎을 대조시료로 사용하였다.

Table 5. Flow cytometric condition for determination of variation on regenerated plants from protoplasts¹⁾

Parameter	Condition
Gain	465
L-L	50
U-L	999
Speed	2.5
Particles	A minimum of 1500
Rate(1/s)	2 ~ 5
Analyzer	DPAC software, Partec

¹⁾Ploidy analyser(Partec PA-II, Germany)

III. 결과 및 고찰

1. 유도된 캘러스 특성 비교

원형질체를 분리 및 배양은 식물체의 종류와 이용할 조직에 따라 많은 영향을 받는다. 일반적으로 많이 이용되는 조직은 야외에서 자란 식물체의 엽육 조직, 기내도입 후 무균 배양되는 식물체, 진탕 배양한 세포, 잎, 엽병, 줄기, 뿌리 등으로부터 유도한 캘러스, 그리고 배의 자엽이나 종자를 약간 발아시킨 후의 자엽 또는 치묘의 자엽 등이다(정 등, 1996). 본 실험에서는 마디와 마디사이에서 성장한 신초의 엽병과 잎, 그리고 뿌리를 이용하여 캘러스를 유도하였고 이 중 세포 활성화와 분리수율이 좋은 캘러스를 유도한 후 원형질체 분리 및 배양에 사용하였다. 일반적으로 조직배양에 의한 캘러스 유도나 기관형성에는 일정비율의 auxin과 cytokinin이 요구되며, 이들의 적절한 처리에 의해 목표로 하는 분화형태를 조절할 수 있다. 김 등(2007)은 캘러스 유도를 위해 절편을 다양한 호르몬에 10일간 배양한 결과 auxin류인 2,4-D가 가장 효과적이었다고 보고하고 있으며 그 농도를 0.1 mg/L를 최적조건으로 사용하였고, 김과 문(2007)은 2,4-D의 농도 증가는 오히려 엽조직에서 캘러스 유도에 불리하다고 보고하였다. 따라서 본 실험에서는 0.1 mg/L의 2,4-D를 배양배지에 첨가해서 캘러스를 유기에 사용하였다. 배양 결과 두 품종('CS9413'와 '대홍') 모두 엽병에서 각각 91.1 ± 0.06 , $94.4 \pm 0.07\%$ 로, 잎과 뿌리에서보다 높은 형성율을 보였으며, 잎과 뿌리에서의 캘러스는 형성율이 다소 낮고 크기가 아주 작아 원형질체 분리용으로 사용이 어려웠으며 특히, 잎의 경우 엽의 상태(생육기간)와 절단부위에 따라 큰 차이를 보였다. 따라서 원형질체 분리를 위한 캘러스는 엽병조직으로부터 캘러스 유기 배양 후 약 3 ~ 4주 후 형성된 약 1 cm 크기의 흰색의 무른 캘러스가 가장 적절한 것으로 판단되었다.

Table 6. Callus formation, size and color from petioles, leaves and roots¹⁾

Cultivar		Callus formation(%)	Callus size(cm)	Color
<i>A. chinensis</i> cv. 'CS9413'	petioles	91.1±0.06 ²⁾	0.77±0.12	White
	leaves	73.3±0.16	0.80±0.10	Light-white
	roots	20.0±0.14	0.47±0.06	White
<i>A. deliciosa</i> cv. 'Daeheung'	petioles	94.4±0.07	0.97±0.21	White
	leaves	82.2±0.10	0.93±0.06	Light-white
	roots	33.3±0.21	0.63±0.12	White

¹⁾All materials were cultured on MS basal media + 3% sucrose + 0.8% agar + 0.1 mg/L 2,4-D(pH 5.8) in dark at 25°C

²⁾Callus size is given as means±S.E.



Fig. 2. Callus induced from petioles.

① *A. chinensis* cv. 'CS9413', ② *A. deliciosa* cv. 'Daeheung'.

2. 원형질체의 분리 조건

1) 효소 종류와 농도의 영향

원형질체의 효과적인 분리를 위하여 각 효소별 처리를 실시한 결과 효소조합, 처리시간 그리고 삼투농도 등이 분리수율과 생존율에 영향을 미치고 있음을 확인할 수 있었다.

'CS9413'과 '대홍' 두 품종 모두 Cellulase R10 1.5%와 Macerozyme 0.5%조합(E4)에서 분리수율이 각각 256.7×10^4 과 296.1×10^4 cells/mL로 높게 나타났으며, '대홍'의 경우에는 Pectolyase와 Driselase와의 조합에서는 전혀 분리가 되지 않았다(Table 8). 이는 Cellulase R10와 Macerozyme의 조합을 이용한 Tsai(1988), Oliveira와 Pais(1991) 및 Xiao 등(1992)의 연구와 유사한 결과였지만 Zhang 등(1998)이 Pectolyase를 첨가한 조합 또는 Xiao 등(2004)이 Cellulase R10, Driselase와 Pectolyase Y-23을 이용하는 것과는 다른 결과를 보였다. 특히 Zhang 등(1998)은 Pectolyase Y-23의 처리가 원형질체의 분리에 효과적이라고 하였으나 본 실험에서 'CS9413'의 경우는 분리가 관찰되었지만 불순물이나 파괴된 형태의 원형질체가 다량 관찰되기도 하여 부적절하였다.

Table 7. Enzyme combination for the isolation of protoplasts¹⁾

	Enzyme combination(%)				Yield($\times 10^4$ cells/mL) ²⁾	
	Cellulase R10	Macerozyme	Pectolyase Y23	Driselase	'CS9413'	'Daeheung'
E1	1.5	-	0.05	0.5	-	-
E2	1	-	0.05	0.5	176.1	-
E3	1	0.5	0.05	-	190.0	-
E4	1.5	0.5	-	-	256.7	296.1
E5	1.5	0.1	-	-	-	-
E6	1	0.5	-	-	132.2	195.6

¹⁾Shaking at 50 rpm, 25±1°C, in darkness

²⁾Yield($\times 10^4$ cells/mL) = No. of protoplasts per g fresh weight

2) 효소처리시간의 영향

효소처리시간의 경과에 따른 분리수율을 확인해 본 결과 약 6 ~ 8시간처리 시 가장 높은 분리수율을 나타내었다(Fig. 3). 13시간 이후에도 더 분리가 가능하지만 장시간 처리 시에는 현미경 상에서 관찰했을 때 세포가 터지거나 혹은 찌그러진 형태의 원형질체가 관찰되었고 이는 아마도 효소에 장시간 노출 시 발생할 우려가 있는 원형질막의 손상으로 세포활성을 떨어뜨리는 역할을 하는 것으로 생각되었다(박 등, 1986). 한편 Tsai 등(1988)과 Mii와 Ohashi(1988)의 연구에서는 4 ~ 5시간이 적절하다고 하였고, Oliveira와 Pais(1991), 그리고 Raquel과 Oliveira(1996)의 연구에서는 16시간이 적절하다고 한 바 있다. 또한 이러한 효소 처리에 있어 처리방식에도 큰 차이를 보여 4시간 정체 배양시 효과적으로 원형질체를 얻은 반면 40 rpm으로 진탕 배양시 기계적 파괴로 분리수율이 감소되었던 김 등(1999)의 연구결과와 달리 50 rpm으로 진탕배양 하였을 때 가장 효율적으로 원형질체를 얻을 수 있었다.

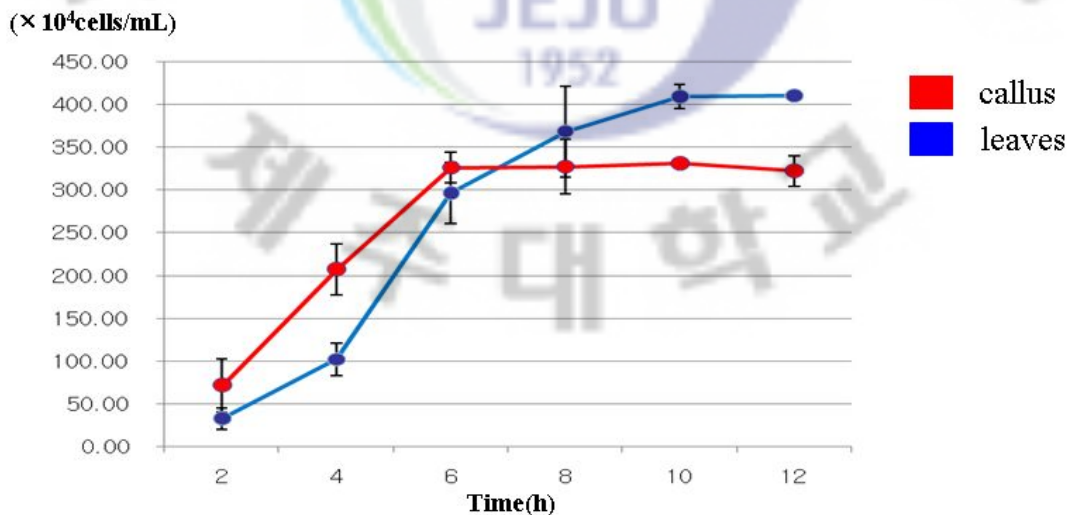


Fig. 3. Effect of enzyme treatment time on protoplast yield in leaves and petiole-callus of *A. chinensis* cv. 'CS9413' (2, 4, 6, 8, 10 and 12 hours treatment in E4, shaking at 50 rpm, 25°C, in darkness).

3) 삼투농도의 영향

원형질 분리는 식물세포에 고장액을 첨가 시 액포 속의 물이 세포 밖으로 빠져나와 세포막이 세포벽으로부터 떨어지는 현상으로 원형질체를 분리함에 있어 고장액(mannitol 13% 함유된 CPW용액)을 전처리함으로써 분리효율을 더욱 향상시킬 수 있었다. 이와 유사한 반응으로 효소액에 삼투농도를 조절함으로써 분리수율을 향상시킬 수 있었는데 mannitol 농도별 처리결과 Fig. 4와 같이 캘러스의 경우에는 처리한 모든 조건에서 거의 동일한 분리수율을 나타내었다. 보통 식물체와 분리재료에 따라 다르지만 삼투조절제로는 mannitol, sorbitol, sucrose, glucose 등이 사용되는데 이러한 처리목적이 원형질막과 세포벽이 유리, 격리되면서 보다 용이하게 원형질체가 나출되도록 함과 함께 효소액이 세포내로의 침투를 억제시켜 나출된 원형질체의 자발적인 융합을 방지하기 위해 사용된다 (Evans 등, 1983). 본 실험결과 캘러스로부터의 원형질체 분리를 위해서는 0.5 M의 mannitol이 최적조건으로 확인되었다.

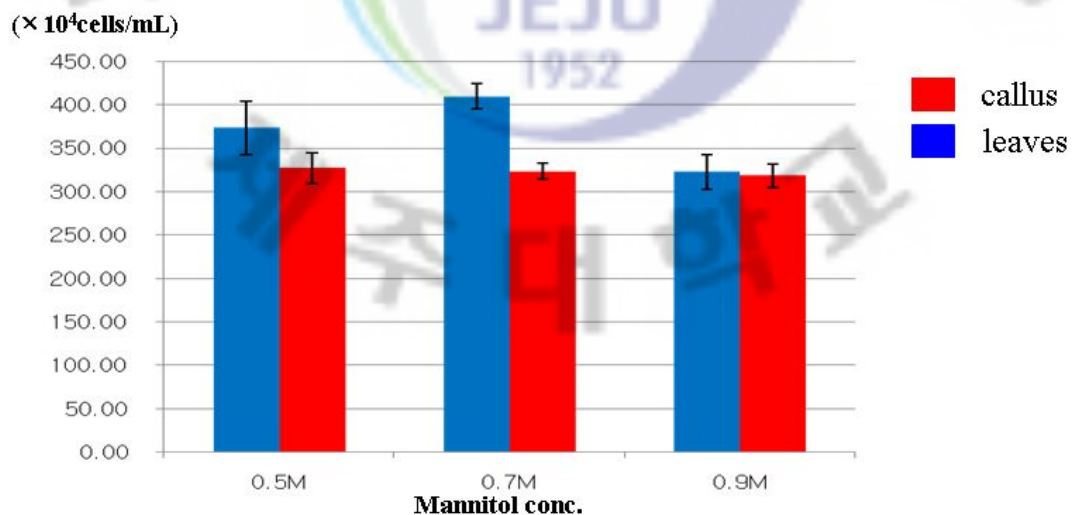


Fig. 4. Effect of mannitol concentration on protoplast yield (osmotic pressure) in leaves and petiole-callus of *A. chinensis* cv. 'CS9413' (0.5, 0.7, and 0.9M mannitol in E4, shaking at 50 rpm, 25°C, in darkness).

4) 순수하게 분리된 원형질체의 특성

순수하게 분리된 캘러스 원형질체는 엽록체를 포함하지 않은 투명 혹은 반투명의 약 75 ~ 100 μm 크기를 나타내었고 두 품종 간 크기가 다소 차이를 보여 'CS9413'의 경우 동일한 크기의 원형질체가 관찰된 반면 '대홍'의 경우 크기가 매우 다양하고 핵을 포함한 부분이 대부분이 가장자리에 위치해 있음을 확인하였다(Fig. 5). 앞에서 얻은 원형질체는 엽록체를 완전히 채우거나 드물게 채운 약 50 μm 의 크기로 캘러스원형질체와는 다소 차이를 보였다. 잎 혹은 캘러스 원형질체의 크기, 모양 그리고 핵 혹은 엽록체의 이러한 다양한 특성과 세포활성의 연관성에 대한 차후 연구가 필요할 것으로 사료되었다. 본 실험에서 얻어진 순수한 원형질체들은 대체로 원형질체간 밀도가 분리과정마다 동일하게 나타나 분리방법이 효과적임을 확인하였다.

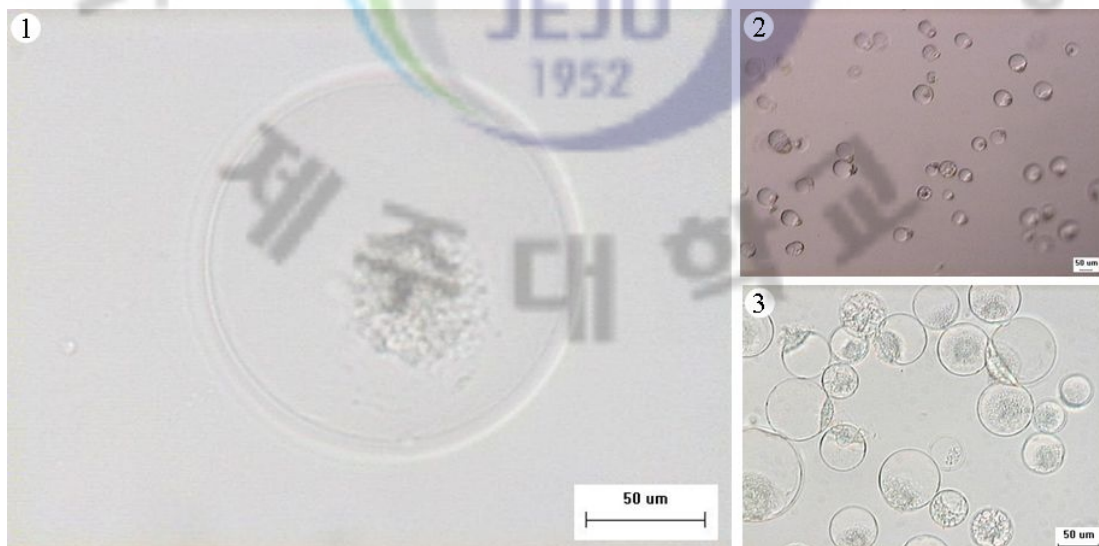


Fig. 5. Freshly isolated protoplasts from callus.

- ① *A. deliciosa*. cv. 'Daeheung'($\times 200$), ② *A. deliciosa*. cv. 'Daeheung'($\times 40$), ③ *A. chinensis* cv. 'CS9413'($\times 100$) (Olympus JP/IX70 W/ACC).

3. 원형질체 배양 조건 확립

1) 배양방법과 배양배지에 따른 세포분열 효과

원형질체 배양에 있어서도 배양방법, 배지종류와 포함된 식물생장호르몬의 종류 등이 세포분열과 콜로니 형성에 큰 영향을 받음을 확인하였다. 배양배지가 세포분열에 미치는 영향을 살펴보기 위해 액체배지, 고체배지 위 액체배지, 고체배지에서 배양을 실시해 본 결과 MS(-NH₄NO₃), MS(1/2macro) 그리고 NN69배지에서 액체배지와 고체배지 위 액체배지에서 다른 방법에 비해 높은 세포분열을 확인할 수 있었다(Table 8). 안(2001)의 보고에 따르면 액체배지와 고체배지 위 액체배지에서는 세포가 미세캘러스로 성장하면서 점차적으로 삼투농도를 줄여주며 신선한 배지를 첨가해주는 것이 중요한 요인으로 작용한다고 보고하고 있는데 본 실험에서도 이와 유사한 결과를 보였다. 삼투농도가 조금 낮은 신선 배지(0.2 M glucose을 함유한 원형질체 배지)의 첨가는 세포벽이 분리된 상태의 세포가 세포벽을 다시 형성하기 전까지 고장액에 장기간 노출 시에 수축된 형태로 계속 유지되어 분열에 악영향을 미치게 될 것으로 사료되며 급격한 저장액의 첨가 역시 순간적인 팽압의 상승으로 세포가 파괴될 수 있기 때문에 1 ~ 2주 간격으로 조금씩 줄여주는 것이 효과적임을 확인하였다.

Oliveira와 Pais(1991)는 원형질체를 유리배양용기에서 배양할 경우 적절한 농도의 원형질체를 배양했을 때 효과적으로 세포분열 및 식물체로의 재분화가 이루어진 반면 플라스틱 용기에서의 배양은 약 1 ~ 2주 후 세포사멸을 보고하고 있는데 이는 플라스틱의 독성이 세포사멸에 영향을 미치는 것으로 생각되며 액체배양에서보다 고체배지 위에 액체배지에서의 배양이 보다 좋은 결과를 보인 것은 배양 중 배양액 하층에 존재하는 일부 원형질들이 고체배지 상에 존재하게 되어 플라스틱의 독성으로부터 영향을 덜 받게 되어 나타난 현상으로 생각된다.

Table 8. Effect of basal media¹⁾ and culture types on cell division

Culture type	Cell division ²⁾					
	MS	MS (-NH ₄ NO ₃)	MS (1/2macro)	NN69	TCCW	B5
Liquid	0.017±0.01 ²⁾	0.10±0.05	0.10±0.05	0.08±0.03	0.01±0.01	0.01±0.01
Liquid/solid	-	0.14±0.03	0.09±0.03	0.07±0.03	0.01±0.01	0.01±0.01
Semi-solid	-	-	-	-	-	-

¹⁾MS basal medium(Murashige, T. and Skoog, F., 1962)

MS medium(Modified, 1/2 conc. of Macro elements)

MS medium(Modified, NH₄NO₃ Free)

NN69 medium(Nitsch, J.P. and Nitsch, C., 1969)

TCCW protoplast culture medium(Tsai, C.K., 1988)

B5 medium(Gamborg. *et al.*, 1968)

²⁾Cell division is given as means±S.E.

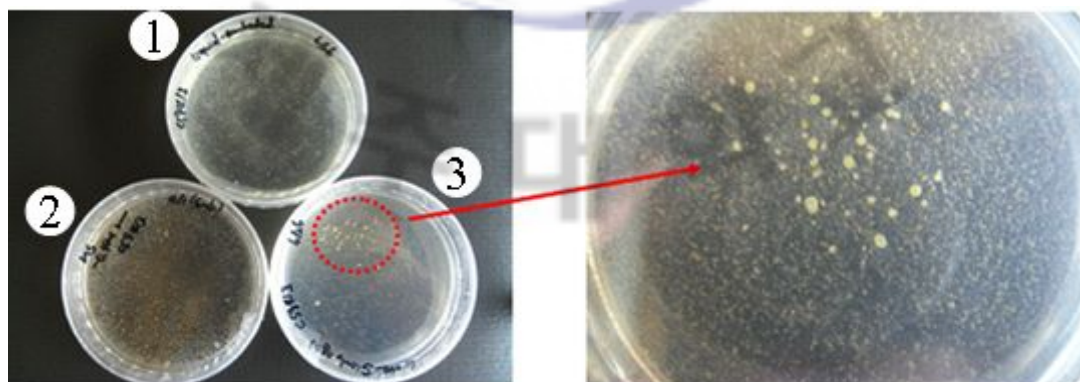


Fig. 6. Effect of culture types on the planting efficiency(Initiated after 2month protoplast culture).

① Semi-solid, ② Liquid, ③ Liquid on solid culture type.

원형질체의 배양에 있어서 NH_4NO_3 을 포함하는 MS기본배지는 세포분열과 세포활성에 치명적인 영향을 주어 초기에는 몇몇 세포가 분열을 시작했으나 배양 2주 후에는 모든 원형질체가 생존력을 잃고 갈변과 함께 사멸하였다. 반면 NH_4NO_3 을 제거한 MS변형배지에서는 효과적인 세포분열이 관찰되었다. 이는 NH_4NO_3 가 원형질체 배양시 세포내의 TCA회로를 교란시켜 세포내 대사 및 세포분열을 억제하지만 세포내 암모늄이온의 결핍은 세포벽 재생에 필요한 물질의 생산이 억제되어 정상적인 세포분열을 일으키지 못하기 때문에 이 물질의 효과적인 조절이 필요하다는 Zapata 등(1981)과 비교해 볼 때 암모늄이온은 NH_4NO_3 형태로 첨가하지 않는 것이 좋다는 결론을 얻을 수 있었다. 또한 다량원소의 양을 반으로 줄인 배지에서도 NH_4NO_3 을 제거한 배지와 마찬가지로 기본배지보다 세포 분열율이 높은 것이 관찰되어 다량원소의 함량 또한 세포분열에 많은 영향을 미침을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

2) 식물생장호르몬에 따른 세포분열 효과

원형질체 배양에 있어 세포벽의 재생과 세포분열의 유도에는 적절한 배지 성분과 성장조절물질 등의 제반 조건이 결정적인 요인으로 작용하며 특히 세포가 성장함에 있어 식물생장호르몬의 매우 중요한 역할을 한다(박, 1999). 본 연구에서는 원형질체의 기관분화에 알맞은 식물생장조절물질과 적정농도를 찾기 위하여 auxin으로서 NAA와 2,4-D, cytokinin으로서 BA와 zeatin을 사용한 결과 두 품종 모두에서 auxin은 2,4-D, cytokinin은 zeatin이 양호하였고 그 중 2,4-D 1.0 mg/L과 zeatin 0.5 mg/L 혼용처리시 'CS9413'과 '대흥' 모두에서 세포분열과 콜로니형성이 가장 양호하였다. Zhang 등(1998), Tsai (1988), Mii와 Ohashi(1988), Oliveira와 Pais(1991), 그리고 Xiao 등(1997)은 식물생장 호르몬 중 auxin류인 2,4-D가 원형질체 배양에 효과적이라는 보고를 하고 있는데 본 실험에서도 이와 동일한 결과를 나타내었다.

Table 9. Effect of plant growth regulators on cell division¹⁾

Plant growth regulators(mg/L)				Cell division ³⁾		Colony formation ²⁾	
2,4-D	NAA	BA	Zeatin	CS9413	Daeheung	CS9413	Daeheung
0.5	0	0.05	0	-	-	-	-
1.0	0	0.05	0	0.16±0.08	-	++	-
0.5	0	0	0.05	0.12±0.03	0.11±0.08	+	++
1.0	0	0	0.05	0.22±0.05	0.16±0.1	+++	++
0	0.5	0.05	0	0.13±0.03	-	-	-
0	1.0	0.05	0	0.11±0.05	-	-	-
0	0.5	0	0.05	0.13±0.04	0.01±0.02	-	-
0	1.0	0	0.05	0.14±0.05	0.02±0.03	+	-

¹⁾Culture medium : Modified MS(-NH₄NO₃), Culture type : Liquid culture

²⁾Colony formation : - ; none, + ; poor, ++ ; moderate, +++ ; good.

³⁾All the data are given as means±S.E.

'CS9413'의 캘러스로부터 분리된 원형질체는 대체로 배양 개시 약 5일 후 크기가 커지면서 타원형에서 가운데가 움푹 들어간 형태의 모습을 띄며 초기분열을 시작하였다. 분열이 진행되면서 다양한 모양으로 변화하였고 점차 분열하여 배양 3 ~ 4주 후에는 콜로니 다발을 이루어 존재하는 형태로 변모하였다. 이때부터 점차적으로 삼투농도를 줄여주며 신선배지를 첨가하였고 약 7 ~ 8주 후에는 2 ~ 4 mm 크기의 육안으로 확인할 수 있는 작은 캘러스가 형성되었다(Fig. 6 - ①, ②, ③).

'대홍'의 경우 배양된 원형질체는 구형의 모습이 변형되기 시작하는데 형태와 크기가 다양하게 변화하기 시작하였다. 그 중 정상적인 분열은 세포벽을 중심으로 동일한 형태의 원형질체가 분열되어 쌍을 이루는데 반해 몇몇은 불규칙적인 현상이 관찰되는데 이는 세포벽의 형성이 불완전하여 약한 부분에서 형성되는 것으로 생각된다.(김 등, 1999). '대홍'의 경우도 약 5 ~ 7일 후 초기 세포분열이 관찰되다가 3 ~ 4주 후에 콜로니 다발이 형성되는 등 두 품종이 동일하게 분열이 이루어졌다(Fig. 6 - ④, ⑤, ⑥).

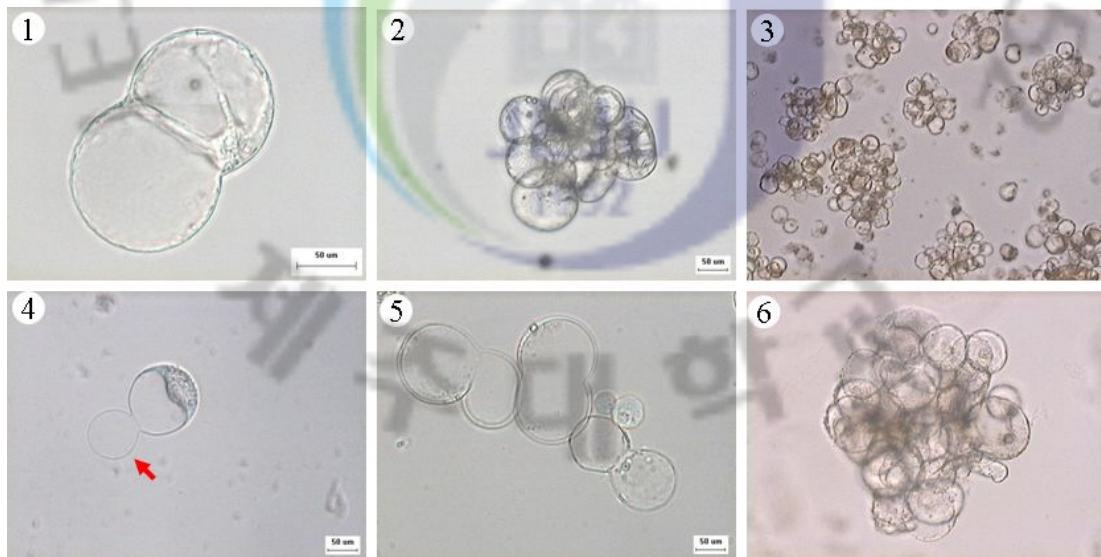


Fig. 7. Cell division and colony formation from callus-protoplasts.

- ① First cell division(After 5days), ② Colony cluster(After 3 ~ 4weeks), ③ Micro calli(After 7 ~ 8weeks, *A. chinensis* cv. 'CS9413'), ④ Buding(After 48 hours), ⑤ First cell division(After 7 days), ⑥ Colony formation from protoplasts(After 3 ~ 4weeks, *A. deliciosa* cv. 'Daeheung') (Olympus JP/IX70 W/ACC).

4. 기관분화 및 식물체 재분화

원형질체로부터 형성된 미세캘러스는 삼투농도를 낮춘 배지(mannitol 0.4 M을 제거하고 glucose를 3%로 첨가)를 2주 간격으로 첨가해 주면서 점차적으로 삼투농도를 낮추며 캘러스를 성장시켰고 기관분화를 유도하였다. 대부분의 원형질체는 기관분화 혹은 부정배형성에 의해 개체재생이 가능하다. 즉, 캘러스에서 원래의 식물체로 재생되는 재분화과정은 캘러스 혹은 원형질체 증식을 위해 첨가했던 2,4-D를 제거하는 것만으로도 마치 수정란의 배발생과 유사한 형태를 나타내어 개체식물에 이르는 배발생형(embryogenesis)과 2,4-D를 제거하고 cytokinins를 첨가하여 캘러스의 어떤 부분에서 싹과 비교적 저농도의 IAA나 NAA를 첨가하여 다른 부분에서 뿌리형성을 유도하는 기관형성형(organogenesis)의 경로가 존재하는데(Ojima K, 1993) 실체현미경을 통해 관찰한 결과 신초증식을 위한 배양초기에는 투명하고 매끈했던 표면에서 여러 개의 구슬형태가 발생하여 배(embryo)모양과 유사한 형태가 밀집하여 분포하다가 시간이 경과하면서 그 중 일부가 길게 성장해 점차 녹색으로 변하였고 더 시간이 경과되면 육안으로 확인할 수 있을 정도로 크기가 큰 어뢰형으로 변하였고 일부 부위에서는 뿌리도 형성됨을 확인하였다(Fig. 8). 이러한 신초 재분화는 embryogenesis(배발생형)에서 나타나는 심장형(heart embryo)-어뢰형(torpedo embryo)-자엽(cotyledon) 단계를 거쳐서 이루어진다는 것을 보여주지만 embryogenesis를 통한 신초분화는 일반적으로 2,4-D를 제거하여 나타나는 것과 달리 이번 실험에서는 zeatin, TDZ, BA 등 cytokinins를 첨가했을 때도 이러한 현상이 관찰되었다. 식물체의 기관형성은 cytokinins과 저농도의 auxins에 의해 좌우되는 경우가 많으며(박, 1998) 본 실험에서도 이와 유사한 결과를 나타낸 것으로 보아 organogenesis(기관형성형)로 인한 식물체 형성임을 확인할 수 있었다.

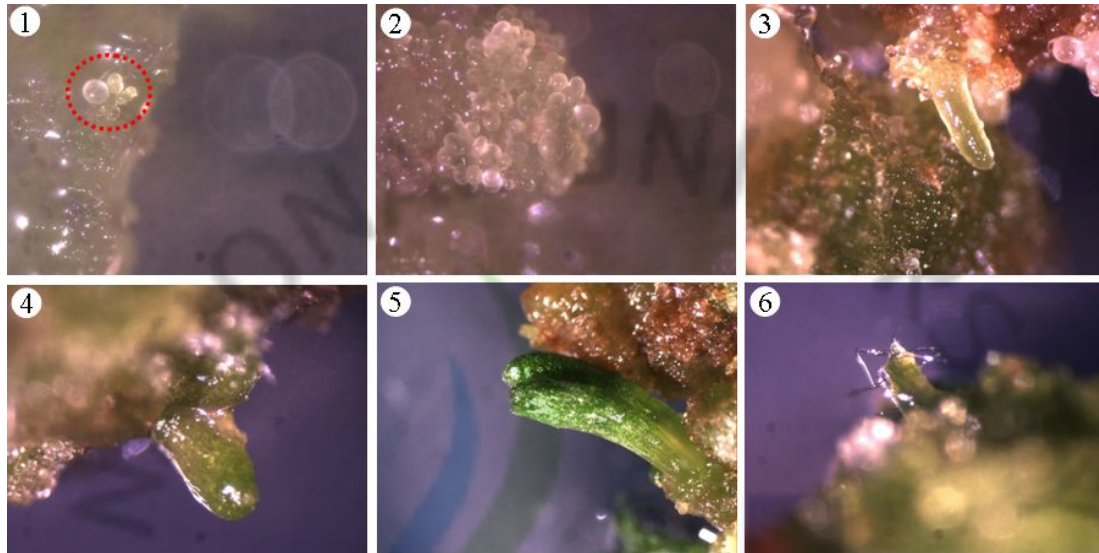


Fig. 8. Observation of organogenesis and shoot formation in *A. chinensis*. cv. 'CS9413'.

- ①, ② Embryoids(Globular shape and cluster), ③ Transformation with long height, ④ Differentiated bud(Change in colour from white to green), ⑤ Development of bipolar buds(Torpedo shape), ⑥ Roots formed on calli.

Mii와 Ohashi(1988), Oliveira와 Pais(1991), Tsai(1988), 그리고 Xiao와 Han(1997)은 다래나무속의 잎과 캘러스 원형질체 배양으로부터 형성된 미세콜로니로부터 재분화된 식물체를 얻기 위해 단계적인 기관분화유도배지(1차, 2차, 그리고 3차 분화배지)를 사용하였다. 본 실험에서는 이러한 복잡한 분화단계 대신 MS 기본배지에 첨가된 효과적인 식물생장호르몬의 조건을 탐색하여 절차를 간소화하는 결과를 얻을 수 있었다.

기관분화는 각 품종마다 다소 차이를 보여 'CS9413'의 경우 zeatin 0.5, 1.0 mg/L 포함된 배지에서 각각 25.8%, 11.9%로 가장 높게 나타났고 TDZ에서도 높은 분화를 보이긴 했으나 캘러스에서 형성된 신초 전단계인 둥글고 긴 어뢰형태에서 새로운 잎이 형성되어 신초가 되는 단계에서 발달정도가 미흡했고 또한 단일클론이 형성되지 않고 다수의 비정상적인 형태가 관찰되어 본 실험에는 적절

하지 않았다. 이러한 결과는 zeatin이 다른 식물생장호르몬 특히, cytokinin 혹은 cytokinin 유사물질보다 참다래 조직배양에 더욱 효과적이라는 Kim과 oh(1998)의 보고와 일치하였다. 반면 '대홍'은 zeatin(0.5 mg/L) 그리고 TDZ(0.1, 0.5 mg/L)에서 각각 4.5, 39.1, 5.3%로 'CS9413'보다는 조금 낮은 분화율과 특히 BA 0.1 mg/L 에서도 23.1%의 분화율을 나타내었다(Table 10).

Table 10. Effect of plant growth regulars on organogenesis¹⁾

PGRs(mg/L)						No. of Calli transferred	No. of shoot regeneration		Regeneration frequency(%)		
Zeatin	TDZ	2iP	BA	IAA	IBA	CS9413	Daeheung	CS9413	Daeheung	CS9413	Daeheung
0.1	0	0	0	0	0	36	20	4	0	11.1	0
0.5	0	0	0	0	0	31	22	8	1	25.8	4.5
1.0	0	0	0	0	0	59	19	7	0	11.9	0
0	0.1	0	0	0	0	35	23	3	9	8.6	39.1
0	0.5	0	0	0	0	43	19	3	1	7.0	5.3
0	1.0	0	0	0	0	37	16	6	0	8.1	0
0	0	0.1	0	0	0	30	18	0	0	0	0
0	0	0.5	0	0	0	30	15	0	0	0	0
0	0	1.0	0	0	0	32	14	0	0	0	0
0	0	0	0.1	0	0	37	13	0	3	0	23.1
0	0	0	0.5	0	0	42	10	0	0	0	0
0	0	0	1.0	0	0	36	11	0	0	0	0
1.0	0	0	0	0.1	0	37	15	5	0	13.5	0
1.0	0	0	0	0	0.1	33	15	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	35	15	0	0	0	0

¹⁾Organogenesis medium : MS basal medium + 3% sucrose + 0.8% agar + PGRs.

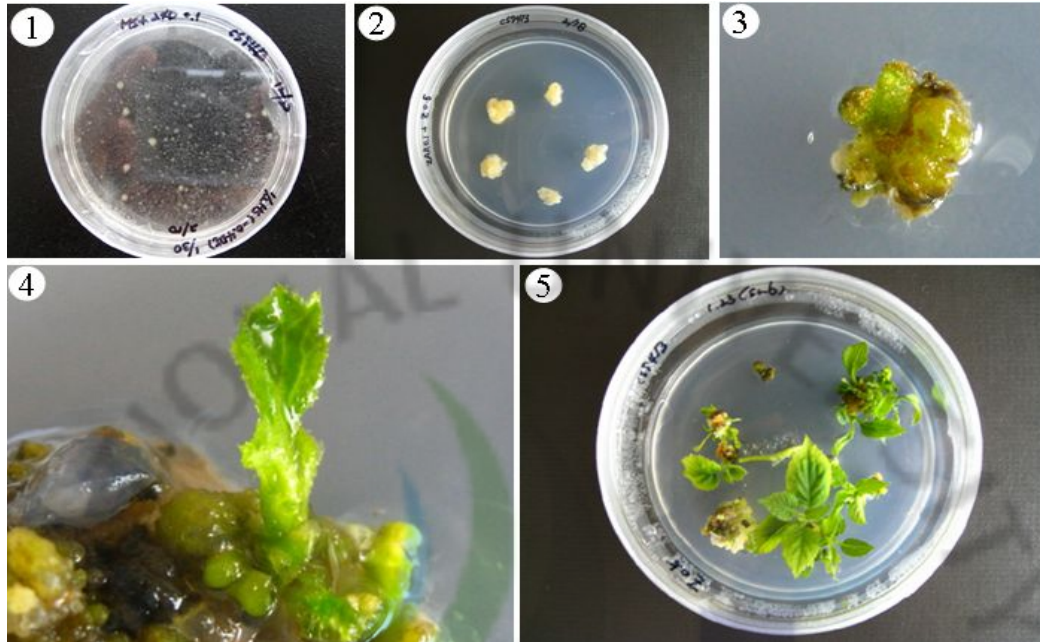


Fig. 9. Plantlet regeneration from protoplasts in *A. chinensis*. cv. 'CS9413'.

- ① Microcalli formation(After 7weeks), ② Callus formation through microcalli growth, ③ Green callus(After 9~10weeks), ④ Shoot formation(After 11~12weeks), ⑤ Plant regeneration(After 3months).

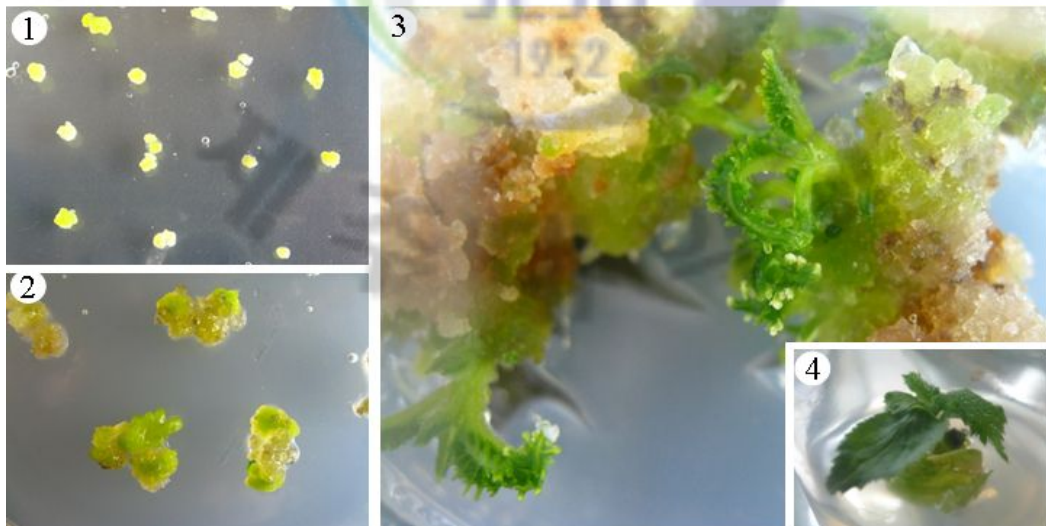


Fig. 10. Plantlet regeneration from protoplasts in *A. deliciosa*. cv. 'Daeheung'.

- ① Microcalli(After 7 ~ 8weeks), ② Green calli(After 9 ~ 10weeks), ③ Shoot formation from protoplasts(After 13weeks), ④ Plant regeneration.

5. 원형질체로부터 얻은 식물체의 형태학적 특성비교

원형질체로부터 얻은 식물체는 기내배양중인 식물체 그리고 캘러스에서 형성된 캘러스와 대부분 유사한 형태를 보였으나 몇몇 클론들은 기존 식물체와 조금 다른 형태를 나타냄을 확인 할 수 있었다. 특히, *A. chinensis* cv. 'CS9413'의 클론체 4, 7, 8, 14, 30, 39의 경우 Fig. 11과 같이 가장자리에 미세한 톱니바퀴 형태를 보이던 대조구와 달리 큰 톱니바퀴모양으로 변하였고, 클론체 8, 30, 39는 대조구에 비해 엽 녹색의 정도가 더 어두워짐을 확인할 수 있었다. 그리고 클론체 4, 7, 14는 앞뒤에 나있는 털의 밀도가 기존 식물체(대조구)보다 적어짐을 확인할 수 있었다. Xiao와 Han(1997)은 2배체인 *A. chinensis* var. *chinensis*($2n=2x=58$)의 자엽유래 캘러스로부터 분리된 원형질체와 *A. deliciosa* var. *deliciosa*($2n=6x=174$)의 자엽유래 캘러스와 *A. kolomikta*($2n=2x=58$)의 엽육 원형질체와의 융합을 통한 체세포 잡종체의 선발을 위한 단계로 RAPD분석과 배수성 판정 이전에 잎 가장자리모양, 털의 조밀도 그리고 절간 길이 등 클론들의 형태학적 특성들을 비교하였고 안(2008)의 경우에도 감귤의 체세포 잡종체의 선발에도 잎의 형태학적 차이를 두고 부모종과의 차이를 기술하였는데 이들의 경우에는 토양으로의 이식 이후 혹은 타묘목에 접목 후 생장한 신초의 특성을 비교하였으며 본 실험에서도 더욱 정확한 검정을 위해서는 외부로 이식하여 성목이 된 후에 생육상태와 과실의 특성 등에 대한 비교연구가 필요할 것으로 사료된다.

Table 11. Morphologic characteristics of clones from protoplasts in *A. chinensis* cv. 'CS9413'

Morphologic characteristics	leaf				petiole			Total size
	size	leaf shape ¹⁾	color ³⁾	hairs ²⁾	internode length(cm)	hairness ⁴⁾	color ⁵⁾	
control	3.0	fine	3	5	0.3	5	3	3.4
callus-clone	2.9	fine+coarse	5	5	0.3	5	3	3.2
CS-4	3.5	deep coarse	5	3	0.7	5	3	3.0
CS-7	3.8	deep coarse	5	3	1.2	5	3	5.5
CS-8	2.6	deep coarse	7	5	0.5	5	1	2.2
CS-14	3.2	deep coarse	5	1	0.6	5	3	2.6
CS-22	4.0	fine+coarse	5	5	1.2	5	3	4.7
CS-30	3.0	deep coarse	7	5	0.8	5	3	4.7
CS-39	3.2	coarse	7	5	0.9	5	1	2.7

¹⁾Leaf shape(Serrations on the leaf margin) : fine, coarse, fine with coarse

*UPOV Test guideline for kiwifruit

²⁾29. Leaf blade(hairs on upperside) : absent(1), sparse(3), medium(5), very dense(9)

³⁾32. Leaf blade(green colour of upperside) : light(3), medium(5), dark(7)

⁴⁾38. Petiole(density of hairness) : absent(1), sparse(3), medium(5), very dense(9)

⁵⁾39. Petiole(anthocyanin colouration on upperside) : absent(1), weak(3), medium(5), very dense(9)

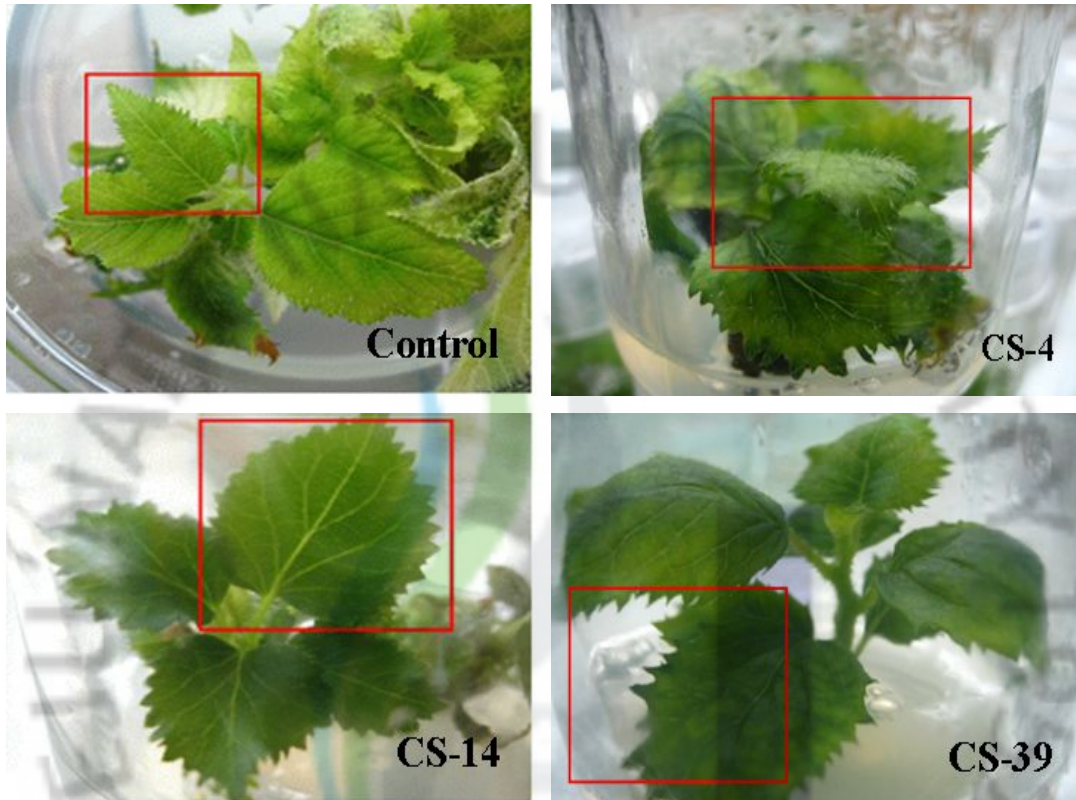


Fig. 11. Morphological characteristics of regenerated plants from protoplasts.

① Control, ② Clones CS-4, ③ Clones CS-14, ④ Clones CS-39.

6. 배수성 검정

다래나무속은 염색체가 너무 작고 수가 많아서 현미경으로 염색체 수를 세는 것이 매우 어렵다(이 등, 2004). 따라서 배수성 판정기를 이용한 배수성 차이를 확인 하는 방법이 최근에 많이 이용되고 있다. 다래나무속의 배수성은 *A. deliciosa*에 속하는 계통은 대부분 6배체, *A. chinensis*계통들은 대부분 2배체임이 검정되었고 다래류는 다수가 6배체와 교잡종인 것으로 추정되는 9배체, 12배체 등, *A. eriantha*계통들은 대부분 2배체로 판명되는 등 다양한 배수성을 보이는 특성을 가진다(조 등, 2004).

본 실험에서도 2배체인 개다래(*A. polygama*)를 표준으로 하여 gain값은 465, L-L값은 50, H-L값은 999로 설정하여 실행하였고 speed는 2.5로 하여 설정하였다. 배수성 검정을 위한 시료는 각 클론별로 증식 시킨 후 형성된 식물의 세포분열이 왕성한 유엽을 채취하여 사용하였을 때 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었으며, 기기설정에 있어서는 gain값이 피크 형성에 큰 영향을 주었는데, 660이상으로 상향 조정 시 모든 시료에서 채널 50에서 높은 단일피크가 형성되어 차이를 확인할 수 없었고 본 실험에서는 465에서 다소 뚜렷한 피크를 확인할 수 있었다.

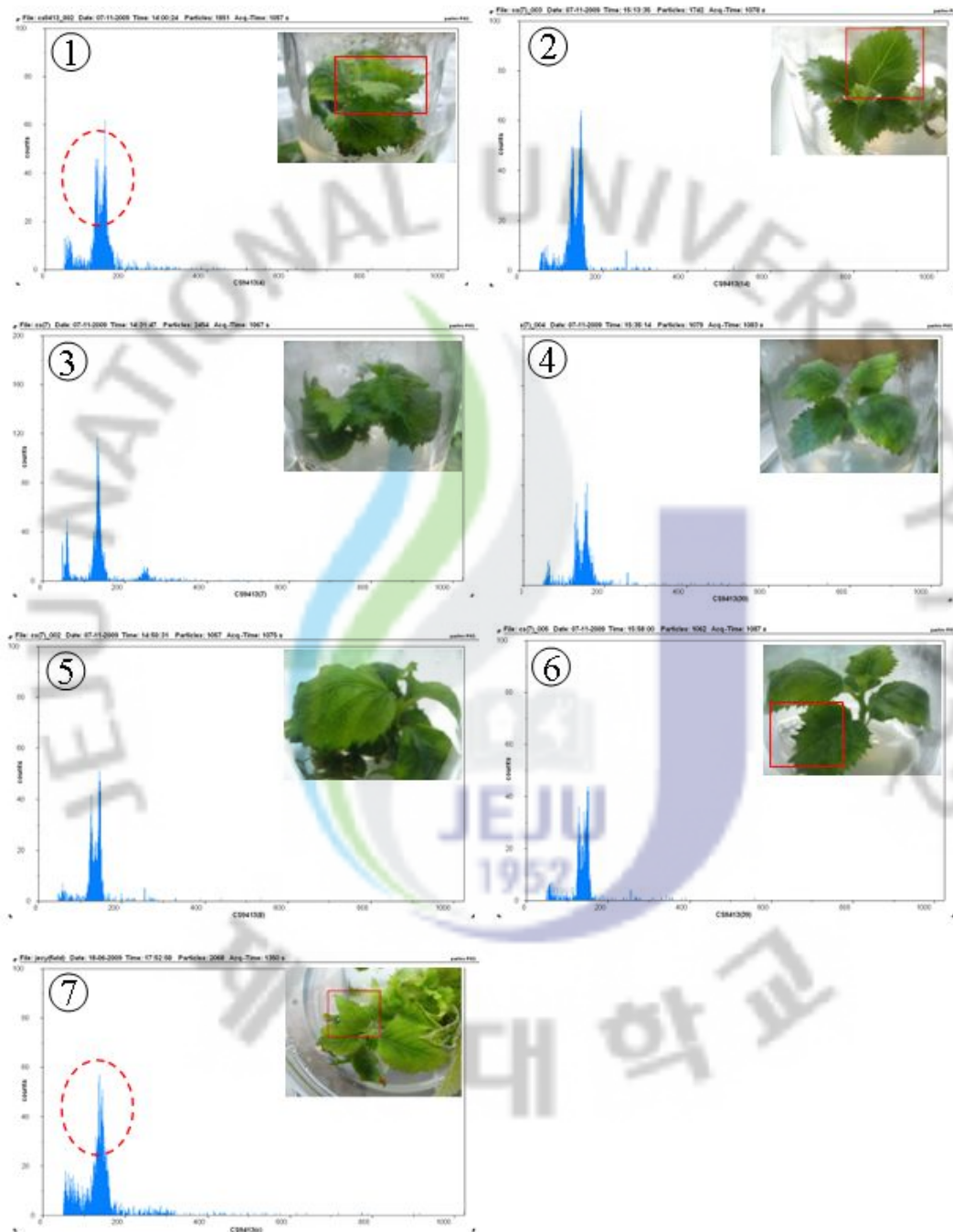


Fig. 12. Flow cytometric histograms of clones from protoplasts in *A. chnensis* cv. 'CS9413'(diploid, $2n=2x$).

① CS-4, ② CS-14, ③ CS-7, ④ CS-30, ⑤ CS-8, ⑥ CS-39, ⑦ Control.

배수성 판정기를 이용하여 확인해 본 결과 대조구로 사용된 기내 배양 중인 'CS9413'의 배수성은 2배체임을 확인할 수 있었고 형태학적으로 차이를 보이는 클론체를 대상으로 측정한 결과 또한 모두 2배체를 나타내어 배수성은 차이를 보이지 않았다. 결과적으로 *A. chinensis* cv. 'CS9413'의 원형질체로부터 재분화된 식물체는 배수성에서는 차이를 보이지 않았으며 좀 더 정확한 유전적인 변이 검정이 필요할 경우에는 DNA분석이나 염색체 분석 등이 필요할 것으로 생각되었다.



IV. 요 약

참다래 신품종 육성을 위해 국내에서 육종된 고당도의 *A. deliciosa* cv. '대홍'과 *A. chinensis* cv. 'CS9413' 조직 유래 캘러스의 원형질체 분리, 원형질체 배양 및 식물체로의 재분화에 대한 연구를 실시하였다.

원형질체 분리를 위한 캘러스는 기내 도입 하에 계대 배양 중인 식물체의 엽병으로부터 유기된 캘러스가 가장 효과적이었다. 캘러스로부터 원형질체를 분리함에 있어 효소조합, 효소처리시간, 그리고 mannitol 농도에 따른 삼투농도 등에 대한 영향을 조사한 결과, 두 품종 모두 E4(1.5% Cellulase R10+0.5% Macerozyme)에서 50 rpm의 속도로 효소 처리하였을 때 가장 효과적이며 처리시간은 약 6 ~ 8시간 처리했을 때 가장 분리수율이 좋았다. 삼투농도는 분리수율에 큰 차이를 보이지 않았지만 0.5 M mannitol을 포함한 효소용액에서 좋은 수율을 보였다. 두 품종의 원형질체를 배양함에 있어서는 호르몬의 농도와 종류에 따라 조금 차이를 보이긴 했지만 0.2 M glucose, 0.4 M mannitol, 10 g/L sucrose, 1 mg/L 2,4-D, 0.05 mg/L zeatin을 첨가한 MS(-NH₄NO₃)배지를 고체 위 액체배지형태로 배양 시 가장 적절하였다. 원형질체는 약 5일 후 초기 세포분열이, 약 3 ~ 4주 후 2, 3차 세포분열이 관찰되어 콜로니 다발이 형성되면서 눈에 보일 정도의 미세캘러스를 형성하였다. 육안으로 관찰할 정도의 1 ~ 2 mm까지 성장한 캘러스는 좀 더 증식한 후 재분화를 위해 기관분화배지로 이식하였다. 기관분화를 위한 배지는 계통별로 차이를 보여 *A. chinensis*계통은 MS기본배지에 zeatin이 0.5와 1.0 mg/L가 첨가된 배지에서 분화가 가장 잘 이루어 졌고 *A. deliciosa*계통은 MS기본배지에 BA와 TDZ이 각각 0.1 mg/L씩 첨가된 배지에서 분화가 관찰되었다. 재분화된 *A. chinensis* cv. 'CS9413'의 클론체의 형태학적으로 차이를 보이는 CS-4, 7, 8, 14, 30, 39 클론체를 대상으로 배수성을 확인한 결과 모든 클론체가 부모종(2n=2x, 2배체)과 동일한 배수성을 보여 원형질체로부터 재분화된 식물체의 배수성은 차이를 보이지 않았다.

V. 참고 문헌

1. Ahn, Y.K., H.Y. Kim, J.Y. Yoon, and H.G. Park. Plant regeneration from leaf protoplasts of potato. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 42: 415-419(2001)
2. Atkinson R.G. and Macrae E.A. Kiwifruit. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol 60. *Transgenic Crops V*(ed. by E.C. Pua and M.R. Davey). Springer-verlag Berlin Heidelberg(2007)
3. Chung, J.M. and S.S. Kim. Isolation of mesopyll protoplasts from in vitro cultured *Zizyphus jujuba*. *J. Inst. Agr. Res. Util. Gyeongsang Nat'l Univ.* 27: 29-37(1993)
4. Evans, D.A. 1983. Agriculture application of plant protoplast fusion. *Biotechnology* 1:253 ~ 261(1983)
5. FAO. Statistical databases. <http://www.fao.org>(2007)
6. Ferguson, A.R. and E.G. Bollard. Domestication of the kiwifruit, p. 165-246. In: I.J. Warrington and G.C. Weston (eds.) *Kiwifruit: Science and management*. Ray Richard Publ., Auckland, N.Z(1990)
7. Freason, E.M., J.B. Power, and E.C. Cocking. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Dev. Biol.* 33: 130-137(1973)
8. Gamborg, O.L, Miller, R.A. and Ojima, K. Plant cell cultures. 1. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50, 151-158(1968)
9. Hirsch, A.M., Fortune, D., Xiao, X.G. and Blanchet, P. Somaclonal variations related to kiwifruit micropropagation, study of fruitful male plants and use of peroxidase as an early sex marker. *Acta Horticultrae* 297, 123-131(1991)

10. Kim, Y.S. and S.D. Oh. Plant regeneration from leaf and petiole culture of kiwifruit(*Actinidia deliciosa*). Kor. J. Plant Tissue Cult. 25:305-308(1998)
11. Kim, C.H., S.C. Kim, K.C. Jang, E.Y. Song, M. Kim, D.Y. Moon, K.C. Seong, J.S. Lee, H.D. Suh, and K.J. Song. A new kiwifruit cultivar, 'Jecy Gold' with yellow flesh, Korean J. breed. Sci. 39: 258-259(2007)
12. Kim, C.H., S.C. Kim, E.Y. Song, N.Y. Ro, M. Kim, K.H. Kang, K.C. Jang, and S.J. Chun. A new kiwifruit, 'Jecy Sweet' with high soluble solids content. 27: 325-328(2009)
13. Kim, M. Rapid shoot propagation and *Agrobacterium*-mediated transformations from micro-cross sections in 'Hayward' Kiwifruit(*Actinidia deliciosa*). Ph. D. thesis. Cheju national University, Korea(2007)
14. Kim, S.C. Inheritance analysis and SCAR marker development for molecular breeding of Kiwifruit in the Genus *Actinidia*. Ph. D. thesis. Cheju national University, Korea(2002)
15. Mii, M. and Ohashi, H. Plantlet regeneration from protoplasts of kiwifruit, *Actinidia chinensis* Planch. *Acta Horticulture* 230, 167-170(1988)
16. Murashige, T. and Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497(1962)
17. National Seed Management Office. The guidelines of characteristics for application and registration of new varieties in Kiwifruit(2002)
18. Nitsch, J.P. and Nitsch, C. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163, 83-87(1969)

19. Ojima Kunihiko, Nutrition of plant tissue culture, pp. 30 ~ 36(1993)
20. Oliveira, M.M. and M.S.S. Pais. Plant regeneration from protoplasts of long-term callus cultures of *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* cv. Hayward(Kiwifruit). Plant Cell Rep. 9: 643-646(1991)
21. Park, S.Y., J.H. Bu, G.P Song, T.W Han, S.C. Kim, and I.O. Heo. Determination of culture condition and isolation of protoplast in *Lilium*. J. of Basic Sciences. Cheju Nat'l Univ. 12(1), 77~85(1999)
22. Park Y.S. and S.H Son. Factors affecting the isolation of mesophyll protoplasts from *Populus euramericana* cv. I-214. J. Korean For. Soc. 74: 29-36(1986)
23. Ruquel, M.H. and Oliveira, M.M. Kiwifruit leaf protoplasts competent for plant regeneration and direct DNA transfer. *Plant Science* 121, 107-114(1996)
24. Tsai, C.K. Plant regeneration of *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* cv. Hayward(kiwifruit). Plant Cell Rep. 9: 643-646(1988)
25. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. USDA Nutrient Database for standard reference. Release 17. Nutrient Data Laboratory Home Page, <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>(2004)
26. Vasil. I.K. Vasil, V. Totipotency and embryogenesis in plant cell and tissue cultures. *In vitro*. 8:117-127(1972)
27. Xiao, Z.A. and B.W. Han. Interspecific somatic hybrids in *Actinidia*. *Acta Bot. Sin.* 39: 1110-1117(1997)
28. Xiao, Z.A., S.C. Wan, and B.W. Han. An interspecific somatic hybrid between *Actinidia chinensis* and *Actinidia kolomikta* and its chilling tolerance. P. cell. Tissue. Organcult. 79: 299-306(2004)

29. Zapata, F.J., K.C. Sink and E. C. Cocking. Callus formation from leaf mesophyll protoplasts of three *Lycopersicon* species; *L. esculentum* cv. 'Walter', *L. pimpinellifolium* and *L. hirsutum*, *L. glabratum*. *Plant Sci. Lett.* 23:41 - 46(1981)
30. Zhang, Y.J., Y.Q. Qian, X.J. Mu, Q.C. Cai, Y.L. Zhou, and X.P. Wei. Plant regeneration from in vitro-cultured seedling leaf protoplasts of *Actinidia eriantha* Benth. *Plant Cell Rep.* 17: 819-821(1998)
31. 김명덕, 김준철, 진창덕, 임창진, 한태진, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 엽육원형질체로부터 효율적인 식물체 재분화와 이들의 형태적 특성, *Korean J. Plant Tissue Culture* Vol. 26, No. 2, 127-132(1999)
32. 김용욱, 문홍규, 잡종키위(양다래×다래)의 엽조직 캘러스로부터 식물체 재분화, *Jour. Korean For. Soc.* Vol. 96, No. 1, pp. 34 ~ 39(2007)
33. 박용서, 국내 육성 참다래 신품종에서 저장력 구명, *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 27(1):123-127(2009)
34. 안현주, 이동훈, 이지현, 최영훈, 강병철, 박효근, 감귤 embryogenic callus 원형질체 배양에 의한 식물체 재분화, *J. Plant Biotechnol.* Vol. 35, No. 1, 81-86(2008)
35. 이병실, 이문호, 황석인, 김선창, 한상섭, 다래×양다래 교잡종의 배수성 및 기공특성, *한국임학회, 2004 학술연구 발표논문집*, Vol. 1, No. - (2004)
36. 정재동 외, 최신생물공학(식물편Ⅱ), 경북대학교 출판부(1996)
37. 조윤섭, 조혜성, 노정호, 박문영, 방극필, 다래나무속(*Actinidiaceae*)유전자원 배수성 검정, *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* Vol. 22. No. s II(2004)

감사의 글

하나하나 논문을 완성해 가면서 그 동안 지금의 저를 만들어준 분들을 생각했습니다. 우선, 저의 대학원 생활에 있어 큰 가르침을 주신 고영환 교수님께 진심으로 감사의 말씀을 드립니다. 항상 감사드리며 지금까지의 가르침 마음속 깊이 새기겠습니다.

배움보다 더 중요한 것이 일깨워 주신 임상빈 교수님, 부족한 저의 논문을 완성하기까지 애써주셔서 감사합니다. 그리고 저에게 큰 힘과 용기를 가르쳐 주신 하진환 교수님, 항상 환한 미소로 격려해주신 김수현 교수님, 제자들을 많이 사랑하시는 강영주 교수님, 열정적으로 지도해주신 김광표 교수님께 깊은 감사의 말씀을 전합니다. 학부 때부터 지금까지 많은 격려의 말씀을 해주시는 오창경 교수님, 오명철 교수님께도 감사드립니다.

또한 좋은 논문이 될 수 있게 논문의 시작부터 끝까지 돌보아주신 온난화대응농업연구센터의 김성철 박사님께 진심으로 감사드립니다. 2년간의 실험실 생활은 결코 잊을 수 없는 저의 큰 자산입니다. 좋은 환경에서 실험을 할 수 있게 많은 배려를 해주신 임한철 소장님, 전승중 과장님께 감사드리며 성기철 연구관님, 김천환 연구사님, 송은영 연구사님께도 감사드립니다. 때로는 엄한 선생님으로, 때로는 큰 누나처럼 자신의 일처럼 도와주신 김미선 박사님께도 정말 감사드리고 힘들 때마다 어깨를 두드려준 능재형에게도 감사의 말을 전합니다. 모든 온난화대응농업연구센터 가족들에게 이 기회를 빌어 감사드립니다. 연구소와 인연을 맺어준 오현정 박사님, 전경용 팀장님, 그리고 좋은 말씀 많이 해주시는 강호정 선배님께도 감사드립니다. 또 친동생처럼 아껴주시는 민옥누나, 효민누나에게도 감사드립니다.

자신의 일처럼 여러모로 신경써주신 김태현, 신우석 조교 선생님께 감사드립니다. 그리고 각자의 논문을 준비하는데 고생하신 대학원 동기 승완형님, 정환형님, 재성, 대학원생활을 즐겁게 보낼 수 있게 많은 도움을 주신 김종관 선배님, 현은희 선배님, 이지현님, 혜원군에게도 감사드립니다. 힘들 때나 기쁠 때나 곁에서 함께해주고 힘이 되어준 푸름양, 그리고 승환형, 종훈형, 용원형, 치원형, 줄리, 일족희 선배님들 식품공학과가 맺어준 소중한 나의 모든 인연들에게 감사의 말을 전합니다. 항상 힘내자고 응원해주는 주혁과 태준에게도 감사드립니다. 논문의 마무리를 위해 많은 배려와 격려를 해주신 임형락 실장님을 포함한 한국농어촌공사 보상팀 직원분들께도 감사드립니다.

마지막으로 못한 아들을 위해 항상 응원해주시는 사랑하는 부모님과 소중한 가족들에게 이 논문을 바칩니다.