

*Petunia hybrida* cv. 'Pink Magic'의 protoplast  
培養에 의한 變異個體 發生

李 宗 錫, *R.J. Griesbach*\*

Leaf Varigated Plant Generated from Protoplast Culture of  
*Petunia hybrida* cv. 'Pink Magic'

*Lee Jong-suk, R. J. Griesbach*\*

Summary

The calli were obtained from the protoplasts isolated from the leaf tissues of *Petunia hybrida* cv. 'Pink Magic' and cultured in modified Murashige and Skoog liquid medim.

The proliferation of the calli and the differentiation into the plantlets were effective in culturing the calli in the modified Murashige and Skoog medium added 1.0mg/ℓ NAA, 2.0mg/ℓ BA and 20ml/ℓ coconut milk.

The petunia plants obtained from the protoplasts could bloom after 6-7 months from the beginning of the protoplast culture supplemented with 0.5mg/ℓ NAA and 1.0mg/ℓ BA.

And the varigated individuals showing white color on the leaves of the plants also generated from protoplast culture of *Petunia hybrida* cv. 'Pink Magic' leaf tissues.

---

農科大學 副教授

United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Florist and Nursery  
Crops Laboratory, Beltsville, Maryland, 20705, USA\*

## 序 論

1892年 高等植物에 있어서 protoplast分離에 관한 연구가 이루어진 以來, Cocking(1960)은 酵素處理 方法을 導入하여 *Lycopersicon esculentum*의 뿌리에서 多量의 protoplast를 分離하였고, 以後 *Lycopersicon chilense* (Hassanpour-Estahbanati and Demarly, 1986)에서 protoplast를 分離, 培養을 試圖하여 植物體를 分化시킨 바 있다. 또한 *Petunia*(Power 등, 1976), *Kalanchoe blossfeldiana*(Pierre and Queiroz, 1976)를 비롯하여 *Chrysanthemum* (Otsuka 등, 1985), *Brassica juncea*(Wenbin 등, 1986), potato (Tavazza and Ancora, 1986) 등 多數의 草本性 植物의 種類 (Binding 등, 1981)에 있어서 protoplast 培養을 通하여 植物體의 分化가 成功的으로 이루어졌으며 細胞融合을 通한 體細胞 雜種의 育成에 관한 研究(O'Connell and Hanson, 1986)가 集中的으로 이루어지니 二 있는 단계에 이르렀다. 草本 植物類 뿐만 아니라 *Vitis*(De Filippis and Ziegler, 1985), *Malus*(Kouider 등, 1984), *Pinus*(Patel, 1984) 등 各種 木本性 植物種類(Butt, 1985)에 있어서도 protoplast를 分離, 培養에 관한 研究가 試圖되고 있다.

그런데 본 實驗의 對象植物인 *petunia*에 있어서는 single protoplast로부터 callus를 誘起시킨 바 있으며 (Potrykus and Durand, 1972), Power(1976)등에 依해서도 數種의 *petunia* 葉組織으로부터 分離한 protoplast를 培養하여 幼植物體를 分化시킨 바 있다. 그런가하면 化學物質을 利用하여 *Petunia hybrid* α의 抵抗性의 突然變異 發生에 관한 研究를 試圖하였던 바, callus로부터 植物體를 分化시키지 못하였다(Colijin 등, 1979). 最近에 와서는 *petunia*를 비롯하여, 담배, 감자, 토마토 등 가지과 식물, 그리고 배추, 무우, 유채 등 十字花科 植物에 있어서 polyethylene glycol (PEG) 같은 物質을 利用하여 細胞融合을 試圖하고 이들 protoplast를 培養, 植物體를 誘起한다

음, 融合에 依한 새로운 植物體의 發生 與否는 marker를 利用하거나 蛋白質의 檢定方法을 利用하여 判定하는 境遇가 많다. 그런데 *petunia*의 葉組織으로부터 protoplast를 分離, 培養하여 얻은 植物體의 境遇에 있어서도 mutagene의 處理나 細胞融合을 實施하지 않는다 하더라도 잎에 白色의 무늬가 들어 있는 完전한 식물체가 발생되었는데 본 논문에서는 이에 관하여 보고하고자 하는 바이다.

## 材料 및 方法

본 實驗에 使用된 *petunia*는 溫室에서 栽培한 'Pink Magic' 品種으로서 葉組織으로부터 protoplast를 分離, 培養한 過程은 다음과 같은 方法으로 하였다.

材料採取(葉組織)

↓  
表面消毒(Chlorox 20%, 15分)

↓  
酵素處理(0.8% Cellulysin  
0.4% Macerase  
10% Mannitol  
5#Mol MES  
10Mol CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O  
PH 5.2, 15時間)

↓  
濾 過(Miracloth filter paper)  
1 Mol sucrose 溶液을 低面에 添加

↓  
遠心分離(650rpm, 10分)

↓  
protoplast沈澱部位 採取(sucrose溶液과 酵素溶液 境界部位)

CPW洗滌(遠心分離 650rpm, 10分)

↓

Murashige and Skoog liquid medium으로  
洗滌(遠心分離 650rpm, 10分)

↓

密度調整(5×10<sup>6</sup>個/ml)

↓

培養(Murashige and Skoog liquid medium에 培養.  
(溫度 23℃ 光度 dime light 條件의 growth chamber)

Table 1. Component of CPW solution

Component	mg / ℓ
Stok A	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	27.2
KNO <sub>3</sub>	101.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	246.0
KI	0.16
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025
Stock B	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,480.2
MES	5mM

Table 3. Component of modified Murashige and Skoog medium for petunia callus culture

Component	
MS stock I, II, III, IV and Fe EDTA	Same as table 2
Thiamine	1mg / ℓ
Pyridoxine	0.5
Nicotinic acid	0.5
myo-Inositol	100.0
Glycine	2.0
NAA	0.5
BA	1.0
Sucrose	30.0 g / ℓ
Casein hydrolysate	2.0 g
Agar	7.5 g
pH 5.8	

Table 2. Component of Modified Murashige and Skoog medium for petunia protoplast regeneration

Component	g / ℓ
Stock I	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82.5
KNO <sub>3</sub>	95.0
Stock II	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	37.0
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2.23
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.058
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.005
Stock III	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	44.0
KI	0.083
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0025
Stock IV	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17.0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.62
Na <sub>2</sub> MO O <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.025
Fe EDTA	
Fe SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.784
EDTA Na <sub>2</sub>	3.724
Thiamine	0.001
Pyridoxine	0.0005
Nicotinic acid	0.0005
myo-Inositol	0.1
Bacto-peptone	2.0
Glucose	68.4
Sucrose	0.25
Fructose	0.25
Mannitol	0.5
NAA	0.001
BA	0.002
Coconut milk	20.0ml
pH 5.8	

Table 2와 같이 造成한 液體培地에서 callus가 形成되어 直徑이 1~2mm 程度 자란 것을 Table 3과 같이 造成한 固體培地에 옮겨서 光度 約 700 lux, 온도 23℃, 日長 16時間/日의 條件으로 培養하였다. 以後, callus에서 shoot가 分化된 것들은 줄기를 잘라서 器

내挿植을實施하였다.發根된個體들은,直徑 10cm되는 플라스틱花盆에 심어 mist system 아래에서 1주일간 硬化시킨 다음, 23~25℃가 유지되는溫室에서 1日 16時間의 長日條件에서 栽培하였다. 植栽時培養土는 美國에서 一般植物의 花盆植物 栽培용으로 市販되고 있는 Metro Mix 350(商品名)을 使用하였고 施肥는 株當 Osmocote 20粒씩 주었다.

### 結果 및 考察

petunia의 葉組織으로부터 protoplast를 分離하여(Fig. 1) 液體 培地에서 培養을 始作한 後, 다른 境遇에는 만 하루가 경과한 다음부터 細胞의 分化가 이루어지기 始作(Fig. 2)하였고, 곧이어 colony가 形成되었는데(Fig. 3) 木本性 植物인 *Pinus coulteri*(Patel 等, 1984)와 같은 植物은 細胞의 分化 開始에 7~10日이 所要되었으며 colony의 形成은 15~20日이 所要되었던 것에 比하면 多少 빠르다는 것은 알 수 있었다. 培養開始 20日이 경과된 petunia의 protoplast는 肉眼으로 callus를 確認할 수 있었고 1個月이 지난 以後, 이들 液體培地上的 callus(Fig. 4)를 Table 3과 같이 造成한 Murashige and Skoog 固體培地에서 光度 700 lux, 溫度 23℃, 1日 16時間 照明한 條下으로 培養을 實施한 結果, Fig. 5에 나타난 바와 같이 callus가 增殖되었으며 約 20日이 經過된 다음부터(protoplast 培養開始 77日) 幼植物體가 分化되기 始作하여 急速하게 자랐다(Fig. 6). 그런데 Murashige and Skoog, Nitsch 그리고 Gamborg's 培地 等, 基本培地の 種類를 달리하여 callus의 增殖과 分化 能力을 觀察한 結果는 Murashige and Skoog培地에서 가장 良好하였다(Table 4). 이러한 結果는 *Brassica*屬(Wenbin 等, 1986)이나 daylily(Fitter and Krikorian, 1982), 其他 植物들의 protoplast 培養時 再分化를 위한 培地는 대부분이 Murashige and Skoog培地를 基本培地로 하여 使用되고 있음을 考察할 수 있었다. 培養開始 100日 程度가 經過된 後, callus에서 發生된 幼植物體는 添加物質을 달리한 Murashige and Skoog培地에 挿植하여 觀察하였던 바, 活性炭 1g/l을 添加한 培地에서는

Table 4. Proliferation of calli and differentiation of plantlets in different basic medium supplemented with NAA 0.5mg and BA 1.020 per liter

Medium	Proliferation and differentiation status
Murashige and skoog	+++
Gamborg	++
Nitsch	+

Symbols :

- + ; Moderate
- ++ ; Good
- +++ ; Excellent

뿌리의 生育이 多少 억제되는 傾向이었고 NAA 0.5 mg/l을 添加한 培地에서는 뿌리가 굵고 均一하였으나 成長이 多少 지연되었는데 peptone 2g/l을 添加한 培地에서 뿌리의 發生과 幼苗의 初期 生育이 良好하였던 것을 알 수 있었다. 한편 培養開始 180日 後에는 直徑 10cm의 플라스틱花盆에 完전한 植物體를 옮겨 심을 수 있었다(Fig. 7,8). 그 中에는 白色의 무늬가 들어있는 變異個體(Fig. 11)도 있었으며 이들은 植栽 後 20日만에 開花(Fig. 9)되었지만 꽃잎에는 무늬가 나타나지 않았다(Fig. 10). 이들 變異個體는 single protoplast에서 誘起되었는지, callus의 培養過程에서 誘起되었는지 또는 幼植物體의 培養過程에서 發生되었는지에 關係해서는 좀더 자세히 研究되어야 할 課題로 생각되었지만 어찌되었든간에 protoplast培養을 通하여 完전한 植物體를 만들어내는 過程에서 chimera현상이 나타난 變異個體가 發生된 事實은 앞으로 參考되어야 할 結果라고 생각되었다.

### 摘 要

*Petunia hybrida* cv. 'Pink Magic' 品種의 葉組織에서 分離한 protoplast를 1.0mg/l NAA, 2.0mg/l BA 그리고 20 ml/l coconut milk를 添加한

modified Murashige and Skoog의 液體培地에서 培養하여 얻은 callus를 0.5mg/ℓ NAA와 1.0mg/ℓ BA를 添加한 固體培地上에서 生育시키는 것이 callus의 增殖과 幼植物體의 分化에 効果的이었고, protoplast培養開始 6~7個月만에 開花시킬 수 있

었다.

또한 protoplast培養을 통하여 얻은 植物體 중에서 白色의 무늬가 들어있는 變異個體도 發顯 되었다.

## 引 用 文 獻

- Binding, H., R. Nehls, R. Kock, J. Finger and G. Mordhorst. 1981. Comparative studies on protoplast regeneration in herbaceous species of the dicotyledonae class. Z. Pflanzenphysiol Bd. 101. S. 119-130.
- Butt, A. D. 1985. A general method for the high-yield isolation of mesophyll protoplasts from deciduous tree species. Plant Science. 42: 55-59.
- Cocking, E. C. 1960. A method for the isolation of plant protoplast and vacuoles. Nature. 187: 927-929.
- Colijin, C. M., A. J. Kool and H. J. J. Nijkamp. 1979. An effective chemical mutagenesis procedure for *Petunia hybrida* cell suspension cultures. Theor. Appl. Genet. 55: 101-106.
- De Filippis, L. F. and H. Ziegler. 1985. The physiology of grapevine (*Vitis vinifera* L.) protoplast isolated from green and senescing leaves. Biochem. Physiol. Pflanzen. 180: 645-653.
- Fitter, M. S. and A. D. Krikorian. 1982. Plant protoplast. Some guidelines for their preparation and manipulation in culture. Calbiochem Brand Biochemicals, Behring Diagnostics. p.13-17.
- Hassanpour-Estahbanati, A. and Y. Demarly. 1986. Plant regeneration from protoplasts of *Lycopersicon chilense*. Physiol. Ve'g. 24 (3): 391-196.
- Kouider, M., R. Hauptmann, J. M. Widholm, R. M. Skirvin and S. S. Korban. 1984. Callus formation from *Malus domestica* cv. 'Jonathan' Protoplasts. Plant Cell Reports. 3: 142-145.
- O'Connell, M. A. and M. R. Hanson. 1986. Regeneration of somatic hybrid plants formed between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum rickii*. Theor. Appl. Genet. 72: 59-65.
- Otsuka, H., N. Suematsu and M. Toda. 1985. The culture and plant regeneration from mesophyll protoplast of *Crysanthemum*. Bull. Shizuoka Agr. Exp. Stn. 30:25-33.
- Patel, K. R., N. S. Shekhawat, G. P. Berlyn and T. A. Thorpe. 1984. Isolation and culture of protoplast from cotyledons of *Pinus coulteri* D. Don. Plant Cell Tissue Organ Culture 3: 85-90.
- Pierre, J. N. and O. Queiroz. 1986. Rapid isolation and study of protoplast obtained throughout the day-night cycle from leaves of *Kalanchoe blossfeldiana* showing different levels of crassulacean acid metabolism. Plant Science 45: 179-187.
- Potrykus, I. and J. Durand. 1972. Callus formation from single protoplasts of *Petunia*. Nature. 237: 286-287.
- Power, J. B., E. M. Frearson, D. Gerge, P. K.

- Evans, S. F. Berry, C. Hayward and E. C. Cocking. 1976. The isolation, culture and regeneration of leaf protoplasts in the genus *Petunia*. *Plant Science Letters*. 7: 51-55.
- Tavazza, R. and G. Ancora. 1986. Plant regeneration from mesophyll protoplasts in commercial potato cultivars (Primura, Kennebec, Spunta, Desirée). *Plant Cell Reports* 5:243-246.
- Wenbin, L., Zhenghua, S. Yuhua and Z. Dawei. 1986. Studies on plant regeneration from protoplast of *Brassica juncea*. *Acta Genetica Sinica* 13(3): 184-187.



Fig. 1. Enzymatic isolated protoplast of *Petunia hybrida* cv. 'Pink Magic'



Fig. 2. Elongated protoplast (cell wall formation before division)



Fig. 3. Cell colonies after 15 days culture in modified Murashige and Skoog liquid medium



Fig. 4. 35 days old calli from protoplast cultured in the liquid medium

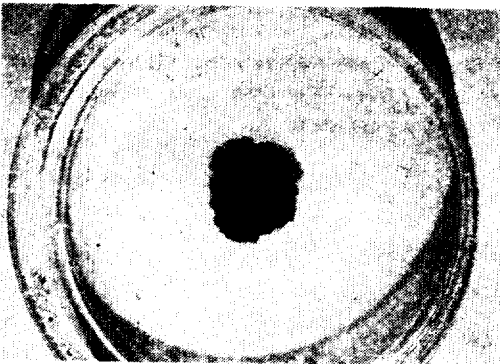


Fig. 5. Callus proliferated in modified Murashige and Skoog solid medium



Fig. 6. Shoot regeneration from the protoplast calli

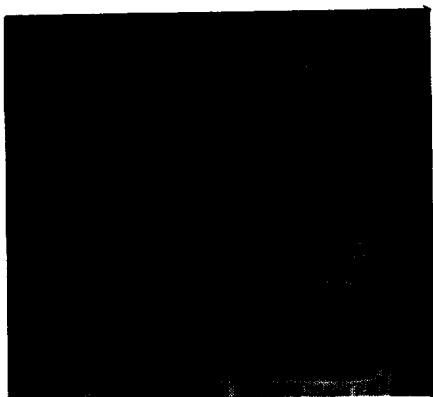


Fig. 7. Whole plants of petunia 180 days after protoplast culture

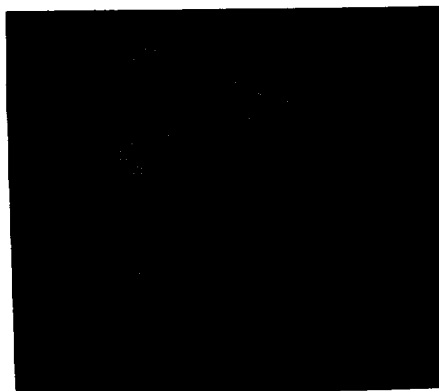


Fig. 8. Petunia plant growing in 10cm plastic pot



Fig. 9. Bloomed normal plant of *Petunia* cv. 'Pink Magic' regenerated from protoplast



Fig. 10. Leaf variegated plant regenerated from *Petunia* cv. 'Pink Magic' protoplast



Fig. 11. Comparison normal leaf(left) with white color variegated leaf(right) regenerated from the same cultivar of petunia protoplast