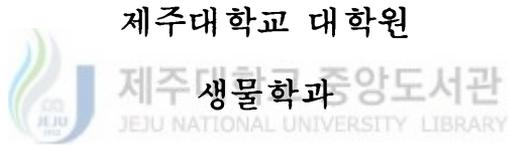


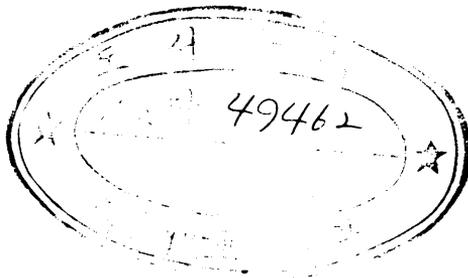
81.8
H338H

석사학위 논문

백합의 원형질체 분리 및 배양에 관한 연구



박 수 영



1998년 12월

백합의 원형질체 분리 및 배양에 관한 연구

지도교수 : 허 인 옥

박 수 영

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함



박수영의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장
위
위

허인옥
신영
신영

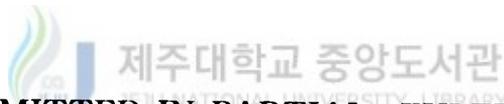
제주대학교 대학원

1998년 12월

A Study on the Isolation and Culture of Protoplasts from *Lilium*

Soo-Young Park

(Supervised by professor In-Ok Heo)



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

**DEPARTMENT OF BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY**

1998. 12

목 차

List of Tables	i
List of Figures	ii
Abstract	iii
Abbreviations	iv
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 공시재료	3
2. 인편배양	3
3. 캘러스에서의 기관분화 유도	4
4. 원형질체 분리 및 배양	4
가. 원형질체 분리 및 정제	4
나. 원형질체 배양	5
5. 원형질체 융합 및 잡종세포 배양	5
IV. 결과 및 고찰	8
1. 인편배양	8
2. 캘러스에서의 기관분화 유도	10
3. 원형질체 분리 및 정제	12
4. 원형질체 배양	14
5. 원형질체 융합 및 잡종세포 배양	16
V. 적 요	22
VI. 참고문헌	23

List of Tables

- Table 1. Composition of PEG solution for the fusion of protoplasts
- Table 2. Effect of NAA and BAP on organogenesis from lily scale cultured for 60 days
- Table 3. Effect of NAA and BAP on organogenesis from lily callus cultured for 40 days
- Table 4. Isolation of protoplasts from lily by enzyme treatments
- Table 5. Composition of enzyme solution for the isolation of protoplasts
- Table 6. Effect of culture method on protoplast division in lily
- Table 7. Effect of PEG concentration and treatment time on protoplasts fusion

List of Figures

Fig. 1. Effect of media on survival of protoplasts from lily.

Fig. 2. Effect of hormones on survival of protoplasts from lily.

Fig. 3. Developmental stages of protoplasts obtained from lily.

Fig. 4. Division stages of protoplasts after PEG treatment.



Abstract

The study was carried out isolation and culture of protoplast from mesophyll tissues of lily(*Lilium longiflorum* Thunb), and protoplast fusion of Georgia and Macro polo for breeding of lily.

In scale culture MS medium with 1.0mg/L NAA and 5.0mg/L BAP was the best for shoot number and root number, 1.0mg/L NAA and 0.1mg/L BAP for the lengths of shoot, 0.1mg/L NAA and 1.0mg/L BAP for the lengths of root, 0.1mg/L BAP for the number of bulb, and 0.1mg/L NAA and 0.1mg/L BAP for the formation of callus. Plantlet regeneration from callus was the highest in the MS medium and 1/2 MS medium with 1.0mg/L NAA and 1.0mg/L BAP.

The yield of protoplasts was the highest when cells are incubated in the enzyme solution of 0.5M mannitol, 1.0% Onozuka cellulase R-10, 1.0% Macerozyme R-10, and 0.1% Pectolyase for treatment of 2~3 hours. The protoplasts was most effectively cultured in the modified 1/2 MS medium without NH_4NO_3 with 1.0mg/L NAA and 1.0mg/L BAP, and also protoplasts survived the best on stabilized liquid layer. Colonies were obtained after 1 month of culture. The calli grew and regenerated shoots by transferring them on the same composition of the solidified medium.

The protoplast fusion was performed with the PEG methods. The yield of protoplast fusion was the highest in the 50% PEG concentration treated for 20 minutes.

Abbreviations

BAP	:	6-Benzylaminopurine
NAA	:	α -Naphthaleneacetic acid
MS	:	Murashige and Skoog
EtOH	:	Ethyl alcohol
CPW	:	Cell and protoplast washing
PEG	:	Polyethyleneglycol
DMSO	:	Dimethyl sulfoxide
MES	:	(2-N-Morpholino)ethane sulfonic acid
BSA	:	Bovine Serum albumin
PDS	:	Potassium dextran sulfate

I. 서론

Lilium 속은 백합과에 속하는 단자엽 식물로 전세계적으로 130여 종이 자생하고 있다. 그 분포는 아시아에 71종, 유럽 및 유러시아에 22종, 북미대륙에 37종이 분포되어 있는 것으로 알려지고 있으며, 변종을 합치면 모두 600여 종에 달하고 원예품종은 4,000종 이상으로 헤아릴 수 없을 정도로 많다(허 등, 1994).

우리나라는 매우 중요한 나리 원산지 중의 한 곳으로 전국적으로 섬말나리를 비롯하여 10여 종이 자생하고 있다. 이들은 모두 유색계로 꽃의 모양이나 꽃색이 아름다워 관상가치가 높기 때문에 자생종 그 자체로도 화훼식물로 재배될 수 있다(김 등, 1994). 또한 내병성, 내한성 등이 뛰어난 것이 많아 새로운 품종의 육성소재로써도 매우 중요한 가치를 지니고 있다(Melchior, 1964).

백합은 외부 인편이 없이 다만 인편이 겹쳐 있는 무피인경(인편상인경, Scaly bulb)에 속하며, 내한성이 강하고 가을에 정식하여 겨울동안 저온을 거쳐 봄에 개화한다. 번식은 일부 품종에서 교배 번식되기도 하지만 우량품종은 자가불화합성 때문에 대부분이 무성적으로 이루어지고 있다. 그중에서도 인편번식법이 현실적으로 사용되고 있으며, 아울러 무병구의 생산을 목적으로 한 조직배양 기술도 활용되고 있다(허 등, 1994).

백합은 교잡에 의해 육종이 이루어졌으나 최근에는 체세포를 이용한 품종개량도 많이 시도되고 있다. 체세포에서 유래된 원형질체는 특히 식물육종의 차원에서는 이미 여러 곡물과 채소류에서 원형질체의 유리 및 배양이 성공적으로 수행되어 원형질체로부터 완전한 식물체로의 재분화가 이루어진 바 있다. 그러나 지금까지는 한정된 식물종에서만 배양이 이루어져왔다(Gamborg 등, 1973 ; Gleba 등, 1984). 1950년대 조직배양에 의한 백합의 상업적 생산의 가능성이 보고된 이래(Emsweller, 1957) 백합의 여러 부위로부터 조직배양에 의한 육종가능성이 보고되는 등 많은 연구가 이루어졌으며(Simmonds 등, 1976), 현재 국내의 백합 육종에 관한 연구는 Longiforum Hybrids, Asiatic Hybrids 및 Oriental Hybrids 등 3종의 구근 생산에 대해서 교배 뿐 만 아니라 배배양에 의한 품종개량을 위해 많은 연구가 시도되고 있

으나 아직 미흡한 상태이다(최, 1994).

식물에서는 단세포에서 무성적으로 원래의 식물과 같은 완전한 식물을 복제하는 능력이 있는 것이 알려져 지금에 와서는 인공적으로 채취한 원형질체에도 꼭 같은 능력이 있다는 것이 많은 식물에서 실증되었다. 이 clone 식물의 형성은 세포융합체에도 적용되며, 체세포 잡종 식물을 생산할 수 있다. 따라서 원형질체 배양에 요구되는 조건 및 그 배양법은 대단히 중요한 요인이 된다(정 등, 1995). 원형질체 배양에 요구되는 조건들 중에서 특히 배양배지의 조성 and 식물호르몬의 선택이 결정적인 경우가 많은데, Nagata와 Takebe(1971)는 담배(*N.tabacum* L.cv. Xanthi)엽육 원형질체 배양에서 MS기본배지의 무기염류 양을 일부 조정한 배지를 사용하여 식물호르몬 NAA와 BAP를 첨가시켜 원형질체의 세포분열 유도에 성공한 바 있다.

한편 원형질체의 배양은 유전적으로 순수한 단세포성 조직을 얻을 수 있으므로 cell line의 선택이 가능하게 되며, 동일한 유전적 조성을 갖는 세포를 다량으로 획득할 수 있는 이점이 있어 이들 세포의 대량배양도 기대할 수 있을 것이다(정 등, 1995). 그러나 육종면에 있어서 원형질체 이용의 가장 중요한 목적은 성적불화합성 (sexual incompatibility)인 식물의 원형질체간 융합에 의해서 체세포 잡종을 얻어 이를 농업적으로 이용하고자 하는 것이지만, 아직까지 농업적 이용가치가 있는 체세포잡종식물을 얻은 예는 드물고(한, 1985), 특히 백합에서의 원형질체 분리 및 배양에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

이에 본 연구는 백합의 배양조건을 설정하고 원형질체를 분리, 배양함으로써 원형질체 융합과 더불어 신품종 육성의 기초자료로 삼고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용된 인편 배양 및 원형질체 배양 재료로는 제주지역에서 주로 재배되고 있는 Longiflorum 계통의 Georgia를 사용하였고, 원형질체 융합에는 Georgia와 Oriental 계통의 Marco Polo를 사용하였다.

2. 인편 배양

Longiflorum 계통인 Georgia의 인경을 흐르는 물에서 깨끗이 씻은 후 중성세제로 20분간 세척한 다음 인편을 3~4겹 벗겨내고 70% EtOH에서 10분, 2% sodium hypochlorite에서 10분간 침지시켜 살균한 후 무균상에서 멸균수로 3~5회 수세하여 인편 배양에 사용하였다. 배지로는 MS(Murashige and Skoog, 1962)배지를 사용하였고, 여기에 3% sucrose, 0.8% agar를 첨가하였으며 성장조절물질로서 auxin류인 NAA와 cytokinin류인 BAP를 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10mg/L로 하여 단용 또는 혼용처리하였다. 각각의 배지는 pH 5.8로 조정하여 121℃, 1.5기압하에서 15분간 멸균한 후 인편을 4반복으로 치상하였다. 광조건은 2400~2500Lux, 16시간 조명하에서, 배양온도는 22±3℃에서 배양하였다. 배양 60일 후에 root와 shoot의 수, 길이, 인경 수 및 캘러스 형성율을 조사하였다.

3. 캘러스에서의 기관 분화유도

인편 배양에서 유도된 캘러스를 0.1mg/L NAA와 0.1mg/L BAP가 첨가된 배지에서 다량 증식 시킨 후, 기관분화 유도를 위해 무기염류로는 1/2 MS배지와 MS배지를 사용 하였다. 여기에 3% sucrose, 0.8% agar를 첨가하여 성장조절물질로서 NAA와 BAP를 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10mg/L로 하여 단용 또는 혼용처리하였다. 각각의 배지는 pH 5.8로 조정하여 121℃, 1.5기압하에서 15분간 멸균한 후 4반복으로 치상하였다. 광조건은 2400~2500Lux, 16시간 조명하에서, 배양온도는 22±3℃에서 배양하였다. 그리고 치상 40일 후에 root와 shoot의 수 및 형성율을 조사하였다.

4. 원형질체 분리 및 배양

가. 원형질체 분리 및 정제

먼저 기내에서 인편 배양된 Georgia의 엽육조직을 얇게 자른 후, 효소의 적정 농도를 구명하기 위해 효소용액 농도(0.5, 1.0, 1.5% Cellulase, 0.5, 1.0, 1.5% Macerozyme, 0, 0.1, 0.2% Pectolyase)를 각각 달리하여 처리하였고, CPW용액을 원형질체의 전처리, 세척제로 사용하였으며(Frearson 등, 1973), 효소 용액내 첨가물 로써 MES를 사용하였다. 그리고 효소를 28℃인 곳에서 2~3시간 정도 암 처리 후 각각의 재료를 pore직경이 45 μ m되는 철망으로 세포피를 제거시켜 원심분리(500rpm, 6분)를 하여 상징액을 제거시켰다. 얻어진 원형질체에 CPW 21% sucrose 용액을 가하여 혼탁시킨 후 CPW 9% mannitol 용액을 첨가하여, 원심분리(700rpm, 10분)를 한 후 sucrose 용액과 mannitol 용액 사이에 떠 있는 원형질체를 채취하여 혈구측정기를 이용하여 그 밀도를 조사하였다.

나. 원형질체 배양

원형질체 배양조건을 알아보기 위한 배양배지로는 MS배지를 기본배지로 하여 1/2 MS배지와 NH_4NO_3 가 첨가되지 않은 1/2 MS수정배지를 사용하였다. 삼투조절은 0.5~0.7M의 mannitol, 1.0~1.3%의 sucrose을 첨가하였으며, 초기배양에 이용한 호르몬 농도는 1.0mg/L NAA와 1.0mg/L BAP, 1.0mg/L zeatin을 사용하였다. 배양방법으로서는 액체배지(Kao 등, 1971), 반고체배지(Cella 등, 1980), 그리고 액체배지와 고체배지(Ahuja 등, 1983)를 동시에 이용하는 방법 등을 병행하여 실시하였다.

1) 액체배지를 이용한 방법

액체배지에 원형질체를 적정밀도로 희석시켜 pasteur pipette을 이용하여 petri dish (55×15mm)에 12~15방울 정도 떨어뜨려 1mm의 두께로 얇게 펴서 parafilm으로 밀봉하여 배양온도를 28℃의 온도 조건하에서 암배양하였다.

2) 반고체배지를 이용한 방법

원형질체를 적정농도로 희석시킨 액체배지와 동일한 양에 녹은 0.3% 한천 배지를 45℃ 항온 수조 내에서 잘 섞은후 petri dish(100×15mm)에 5~8ml 정도로 분주하여 plating한 후 parafilm으로 밀봉하여 28℃의 온도 조건하에서 암배양하였다.

3) 액체배지와 고체배지를 동시에 이용하는 방법

한천 배지를 petri dish(100×15mm)에 plating한 후 그위에 원형질체를 함유한 배양배지를 얇게 도말하고 parafilm으로 밀봉하여 28℃의 온도 조건하에서 암배양하였다.

원형질체 초기분열 이후의 배양은 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 2,000Lux, 광주기 16/8시간으로 유지하면서 세포분열 및 분화를 유도하였다. 계대배양은 1주일을 주기로 하였으며, 삼투조절제인 mannitol 농도를 점차 줄여 나갔다. 배양 5주 후 형성된 세포괴는 새로운 배지로 옮겨 캘러스를 유도하였다.

5. 원형질체 융합 및 잡종세포의 배양

인편 배양에서 얻은 Longiflorum 계통의 Georgia 캘러스와 Oriental계통의 Marco Polo 엽육조직에서 분리된 각각의 원형질체를 1:1로 혼합한 후 배양배지를 가해 원심분리(500rpm, 5분)하여 상정액을 제거시켰다. 배양배지와 pellet을 10:1 비율로 섞어 혼합시킨 다음 petri dish(55×15mm)에 1~2방울 정도 떨어뜨려 5분간 방치 후 PEG solution(Table 1)을 원형질체의 표면 위에 1~2방울 떨어뜨려 8분간 처리하였다. 그리고 다시 Solution A와 Solution B의 용액을 9:1로 하여 12분간 처리한 후 배양배지를 가하면서 서서히 PEG 용액을 제거시켰다(Grosser 등, 1990). 최종적으로 배양배지를 12~15방울 정도 더 떨어뜨려 1mm의 두께로 얇게 펴서 parafilm으로 밀봉한 후 배양온도를 28℃로 하여 암배양하였다.



Table 1. Composition of PEG solution for the fusion of protoplasts

Composition	PEG solution	Solution A	Solution B
PEG(MW 1,450)	50 g/100mL		
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.97 g/100mL	0.97g/100mL	
Glucose	5.41 g/100mL	7.2g/100mL	
DMSO		10mL/100mL	
Glycine			2.25 g/100 mL
pH	6.0	6.0	10.5

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 인편배양

Longiflorum 계통인 Georgia의 인편을 재료로 하여 NAA와 BAP를 단독 또는 혼용처리한 결과(Table 2), cytokinin류인 BAP를 처리하였을 때 자구의 증식효과가 양호하게 나타났는데, 특히 구의 비대를 촉진시킨다던 임 등(1998)의 보고와 일치하였다. 그리고 자구수에 있어서는 BAP의 단독처리구(1.0 mg/L BAP)에서 자구의 발생이 양호하게 유도되었고, 저농도의 auxin과 혼용처리구에서도 비슷한 양상을 보였는데, 이는 Pierik 등(1975)의 보고와 다소 차이를 보였다. Shoot와 root의 분화는 1.0 mg/L NAA와 5.0 mg/L BAP에서 root 수 7.8개, shoot 수 8.3개로 가장 많았고, 길이에서는 0.1mg/L NAA와 1.0mg/L BAP에서 root 길이 2.2cm로, 1.0mg/L NAA와 0.1mg/L BAP에서 shoot 길이 5.9cm로 가장 양호하게 나타났다. 그리고 캘러스 형성은 0.1mg/L NAA와 0.1mg/L BAP를 혼용처리한 시험구에서 양호하게 나타났다. 일반적으로 조직배양에 의한 캘러스 유도나 기관형성에는 일정비율의 auxin과 cytokinin이 요구되며, 이들의 적절한 처리에 의해 목적으로하는 분화 형태를 조절할 수 있다(Skoog 등, 1957). 식물체의 기관형성에 있어서는 cytokinin과 저농도의 auxin에 의해 좌우되는 경우가 많으며 특히 인편 배양의 경우 저농도의 auxin에 의해 촉진되고 고농도에 의해 억제현상을 나타내기도 한다(Aartrijk 등, 1981). 백합의 잎절편의 배양시에는 auxin이 전혀 첨가되지 않으면 자구의 형성이 일어나지 않고 cytokinin으로서 BAP의 농도가 1.0 mg/L 이상이 되면 비정상적인 자구가 발생하여 자구의 형성에는 NAA가 촉진적인 역할을 하기도 하며(Niimi 등, 1979), 인편자체에는 충분한 cytokinin이 함유되어 있어 기내배양시 cytokinin이 없이 auxin의 처리에 의해서도 충분히 생육하는 경우도 있다(Pierik 등, 1975).

Table 2. Effect of NAA and BAP on organogenesis from lily scale cultured for 60 days

Growth regulator (mg/L)		Root		Shoot		Bulblet	Callus
NAA	BAP	Number ^{a)}	Length(cm) ^{b)}	Number ^{a)}	Length(cm) ^{b)}	Number ^{c)}	Formation
0	0.1	5.5	1.6	8.0	7.5	2.3	-
	1	5.3	1.4	8.0	7.4	2.3	+
	5	4.4	1.7	5.3	4.2	1.2	+
0.1	0	5.6	1.8	6.7	6.7	1.3	++
	0.1	5.2	1.5	7.3	5.8	2.0	++++
	1	3.8	2.2	4.2	5.5	1.2	+++
1	5	2.8	1.4	3.8	5.8	2.0	+
	0	3.5	1.6	7.0	5.1	1.7	+
	0.1	4.5	1.6	7.5	7.0	2.3	++
5	1	4.0	1.1	5.2	5.8	1.8	+++
	5	7.7	1.2	8.3	5.9	1.3	++
	0	1.7	1.2	5.0	2.9	1.7	-
	0.1	4.3	1.0	5.3	4.9	2.7	+
	1	2.9	2.1	6.4	4.6	1.5	-
	5	3.3	0.8	6.7	4.0	1.0	-

^{a)} Numbers indicate the number of survived explants

^{b)} Numbers indicate the length of survived explants

^{c)} Numbers indicate the number of bulblet of survived explants

++++ ; excellent, +++ ; good, ++ ; moderate, + ; poor, - ; none growth

2. 캘러스에서의 기관 분화유도

인편 배양에서 유도된 캘러스를 증식 시킨 후, 기관분화 유도를 위해 1/2 MS배지와 MS배지에 성장조절물질로서 NAA와 BAP를 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10mg/L로 단용 또는 혼용처리하여, 40일 후에 shoot와 root의 수 및 그 형성율을 측정하였다.

NAA와 BAP의 농도별 처리에 따른 기관 분화율을 보면(Table 3), MS배지에서는 root 수가 2.8개로 1.0mg/L NAA와 0.1mg/L BAP에서 가장 높았으며, shoot 수에 있어서는 5.0mg/L NAA와 0.1mg/L BAP인 혼용처리구에서 5.3개로 가장 양호하게 나타났다. 1/2배지일 경우는 root수는 0.1mg/L BAP인 단용처리구에서 6.3개로, shoot수는 1.0mg/L NAA와 1.0mg/L BAP인 혼용처리구에서 2.5개로 가장 높게 나타났다. 그러나 전반적으로 1.0mg/L NAA와 1.0mg/L BAP를 혼용처리했을 경우가 기관 형성율을 포함한 모든 면에서 가장 양호함을 보였다.

Ziv 등(1970)은 유식물체 재생에 있어 캘러스와 부정근 유도를 위해서는 auxin(NAA), shoot 형성에는 cytokinin(BAP)이 필수적으로 작용하며, 기관형성에는 auxin-cytokinin balance가 중요한 역할을 한다고 하였다. 김 등(1988)에 의하면 구근류에 있어 연령이 어린 캘러스로부터의 유식물체 재분화에는 cytokinin 저농도(1.0mg/L BAP와 0.1~1.0mg/L Kinetin)가 촉진적으로 작용하지만 그 이상의 농도에서는 오히려 억제적으로 작용하고 캘러스의 연령이 6개월 이상 되었을 때는 외생 cytokinin를 필요로 하지 않는다고 하였다. 본 실험에서는 NAA 단용처리구에서 농도차에 관계없이 비슷한 양상을 보였지만, BAP인 경우는 단용처리구, 혹은 혼용처리구와 관계없이 고농도 보다는 저농도에서 기관분화율이 양호하게 나타났는데, 이는 김 등(1988)의 보고와 일치한다고 볼 수 있으며, 캘러스에서의 기관분화 형성은 NAA보다는 BAP에 의해서 좌우되어졌다고 사료된다.

Table 3. Effect of NAA and BAP on organogenesis from lily callus cultured for 40 days

Growth regulator (mg/L)		MS				1/2MS			
NAA	BAP	Root formation		Shoot formation		Root formation		Shoot formation	
		Number ^{a)}	Rate ^{b)} (%)	Number	Rate(%)	Number	Rate(%)	Number	Rate(%)
0	0	1.0	50	2.8	75	1.8	50	-	-
	0.1	1.0	25	1.5	50	0.5	50	0.5	25
	1	1.5	25	1.5	50	2.8	100	0.8	50
	5	0.6	25	2.0	50	6.3	100	0.8	25
0.1	0	0.3	25	0.5	25	0.5	25	-	-
	0.1	2.0	50	2.0	25	0.3	25	1.3	25
	1	0.5	50	0.5	50	1.0	50	0.3	25
	5	0.3	25	-	-	0.8	50	0.5	25
1	0	0.3	25	2.0	50	0.3	25	0.3	25
	0.1	2.8	75	3.0	75	1.5	50	-	-
	1	1.8	75	3.8	100	2.0	75	2.5	100
	5	1.3	75	0.5	50	0.3	25	0.3	25
5	0	0.8	75	3.3	100	0.8	50	1.8	50
	0.1	0.8	25	5.3	75	0.3	25	1.8	100
	1	0.8	50	2.3	50	1.0	50	2.3	-
	5	0.5	50	0.5	50	-	-	-	-

^{a)}Numbers indicate the number of survived explants

^{b)}Numbers indicate percentage to the number of survived explants
- ; none growth

3. 원형질체 분리 및 정제

원형질체 분리를 위한 효소처리에 따른 결과(Table 4)로서, 효소농도 처리별 원형질체의 수율을 보면 효소농도 1.0% cellulase, 1.0% macerozyme, 0.2% pectolyase에서 가장 좋았고 또한 0.1% petolyase 일때도 효소 처리 시간이 2~3시간대로 수율이 높게 나타났다. 그러나 효소농도가 증가함에 따라 생존율이 감소하는 경향을 보였으므로 효소농도 0.1% cellulase, 0.1% macerozyme, 0.1% pectolyase를 효소 적정 농도로 선택하였다. 재료의 조제에 있어서는 잎의 크기와 효소 용액내에 침지시의 크기도 수율에 큰 영향을 주었는데 재료의 잎 크기가 클수록 그리고 얇게 절단될수록 유리가 잘 되었고, 처리 시간도 단축되었다. 그러나 처리 시간이 3시간 이상 지속되자 유리된 원형질체는 활력이 감소되어 원형질체 정제시 수율이 급격히 낮아짐을 보였다. 따라서 잎을 그대로 효소용액에 침지하는 것에 비하여 1mm간격으로 절단하여 침지 시키는 것과 효소 처리 시간을 3시간 이내로 처리하는 것이 좋으리라 사료된다.

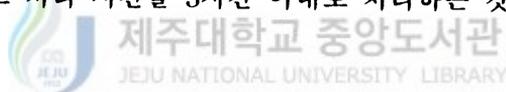


Table 4. Isolation of protoplasts from lily by enzyme treatments

Treatment (%)			Time (hours)	Yield
Cellulase	Macerozyme	Pectolyase		
0.5	1.5	0.1	4~5	++
1.0	1.0	-	4~5	+
1.0	1.0	0.1	2~3	+++
1.0	1.0	0.2	2~3	+++
1.5	0.5	0.1	3~4	++

+++ ; good, ++ ; moderate, + ; poor

효소용액이 원형질체의 수율에 미치는 영향을 보면 삼투조절제와 효소 용액내 침가물이 중요하게 작용하게 되는데, 본 실험에서는 삼투조절제로서 0.5M mannitol 이 적정 농도로 나타났으며(Table 5), 이는 杉浦(1993)의 보고와 일치하였다. 보통 재료

에 따라 mannitol, sorbitol, sucrose, glucose등을 사용하는데 이러한 처리 목적은 원형질 분리를 일으켜 원형질막과 세포벽이 유리, 격리 되면서 보다 용이하게 원형질체가 나출되도록 하고, 효소용액의 세포내 침투를 억제시켜 나출된 원형질체의 자발적 융합을 방지하기 위한 것이다(Evans 등, 1983). 효소내 첨가물로는 MES 6mM를 사용하였는데, 효소 용액내에 한 종류 또는 수 종류의 유기물과 무기물을 첨가함으로써 원형질체의 안정성과 파열을 방지하여 건전한 원형질체를 얻을 수 있다. 꽃 토마토에 BSA, PDS나 MES을 첨가했을 때 원형질체의 수량이 현저히 증가되어 효과적이었다고 보고 한 바 있다(Verma 등, 1983).

원형질체 유리시 온도 역시 상당히 중요한 요인 중에 하나로 작용하는데, 효소활성의 최적 온도는 40~50℃이지만 고온은 세포활성에 악영향을 미칠 우려가 있어 본 실험에서는 원형질체 배양을 28℃에서 실시하였다.

원형질체의 정제과정은 mannitol과 sucrose의 비등차를 이용한 비등수세법을 이용하였는데, 효소내 삼투조절제의 mannitol의 적정농도가 0.5M이었으므로 이에 맞추어 CPW 9% mannitol과 CPW 21% sucrose 농도로 하여 실시 하였다. 이 방법은 수세하여 효소액을 완전히 제거하고 양질의 원형질체를 회수할 수 있다는 것이 장점이다(정 등,1995).

Table 5. Composition of enzyme solution for the isolation of protoplasts

Composition	Concentration
Cellulase (Onozuka R-10)	1.0 %
Macerozyme (Onozuka R-10)	1.0 %
Pectolyase Y23	0.1 %
Mannitol	0.5 M
CaCl ₂	25μm
NaH ₂ PO ₄	1.4mM
MES	6mM
pH	5.6

4. 원형질체 배양

조직배양에 폭넓게 이용되는 MS배지를 기본으로 하여 1/2MS배지, 1/2MS배지에 NH_4NO_3 를 첨가하지 않은 1/2MS 수정배지를 원형질체 배양배지로 선정하였다. 원형질체 초기배양은 캘러스에서의 기관분화 유도에 가장 양호하게 나타났던 1mg/L NAA와 1mg/L BAP 그리고 배추의 원형질체 배양시 캘러스형성에 효과적이었던 1mg/L zeatin농도(한 등, 1990)를 사용하였다. 그 결과는 Fig. 1과 Fig. 2에 나타냈다. MS 기본배지는 원형질체의 생존력에 치명적인 영향을 미쳐서 배양 5일째 되면서 초기분열이 일어났으나 거의 모든 원형질체는 생존력을 잃어 갈변화 현상이 나타났다. 1/2MS배지에서는 배양 5일째 되면서 초기분열이 일어나 배양 12일 정도 경과하자 MS배지와 변함없이 갈변화 현상이 발생하여 모두 괴사하였다. 그러나 1/2MS배지에 NH_4NO_3 를 첨가하지 않은 1/2MS 수정배지에서는 MS배지나 1/2MS배지보다 원형질체의 생존력이 비교적 높게 유지되어 배양한지 한 달 후에는 육안으로 확인할 수 있을 정도의 세포괴가 형성되었다. 이 결과로 보아 NH_4NO_3 의 양적 조절은 원형질체 생존에 매우 중요하게 작용됨을 알 수 있었으며, 한편 이러한 보고는 감자 원형질체 배양에서도 보고(Bokelmann 등, 1983)된 바 있고, Zapata 등(1981)은 토마토 원형질체 배양에서 최량의 NH_4NO_3 가 원형질체 배양에 사용될 때 세포내 중요 대사경로인 TCA회로가 교란되어 세포내 대사 및 세포분열이 억제된다고 보고하였다. 그러나 세포내 암모늄이온의 결핍은 세포벽 재생에 필요한 물질의 생산이 억제됨으로서 정상적인 세포분열을 일으키지못함도 지적되었다(Meyer 등, 1975). 원형질체 배양은 세포벽의 재생과 세포분열의 유도에 따른 복잡한 제반 조건들이 요구되어 초기부터 많은 어려움이 제기된 바 있다(Gamborg 등, 1973 ; Gleba 등, 1984). 제반 조건들 중에서 특히 적절한 배양배지와 호르몬의 선택은 원형질체 배양의 결정적인 요인으로서, 많은 연구자들에 의해 조직배양배지로 고찰된 기본배지에 대한 검사와 수정이 이루어졌다.

배양방법에 따른 원형질체 배양의 결과는 Table 6에 나타냈다. 세가지 방법 중 액체배지에 원형질체를 현탁시켜 배양하는 방법이 배양배지의 조건에 관계없이 양호하

게 나타났으며, 세포분열도 빨리 일어났다.

배양 후 초기분열(Fig. 3-C,D)이 일어나자 호르몬 농도를 1.0mg/L NAA와 1.0mg/L BAP, 1.0mg/L NAA와 1.0mg/L zeatin 그리고 1.0mg/L BAP와 1.0mg/L zeatin로 하여 2,000Lux, 16시간 조명하에서 배양하면서 캘러스 유도 및 재분화시켰다. 호르몬 농도에 따른 결과(Fig. 2)를 보면 NAA 1.0mg/L와 BAP 1.0mg/L에서 생존율이 가장 높았고 가장 빨리 shoot가 형성되었다. 다른 호르몬 농도에서는 초기분열 후 15일정도 경과하자 생존력을 잃어 더 이상 분열되는 것을 관찰 할 수 없었다.

Table 6. Effect of culture method on protoplast division in lily

Elements	Cell division (%)		
	MS	1/2MS	1/2MS*
Liquid layer ^{a)}	+	++	+++
Embedding-in-agarose ^{b)}	-	+	+
Liquid-over-solid ^{c)}	+	++	++

* ; modified medium without NH₄NO₃

+++ ; good, ++ ; moderate, + ; poor, - ; none growth

^{a)} Liquid medium containing protoplasts was poured into petri-dishes

^{b)} Liquid medium containing protoplasts was mixed with an equal volume of melted agarose medium(0.3% agarose) that had been kept 40℃, than 1-2ml protoplast samples were poured into petri-dishes

^{c)} The agar medium poured into a petri-dish and solidified, then 1.0ml of liquid medium containing protoplasts was poured on to the agar layer

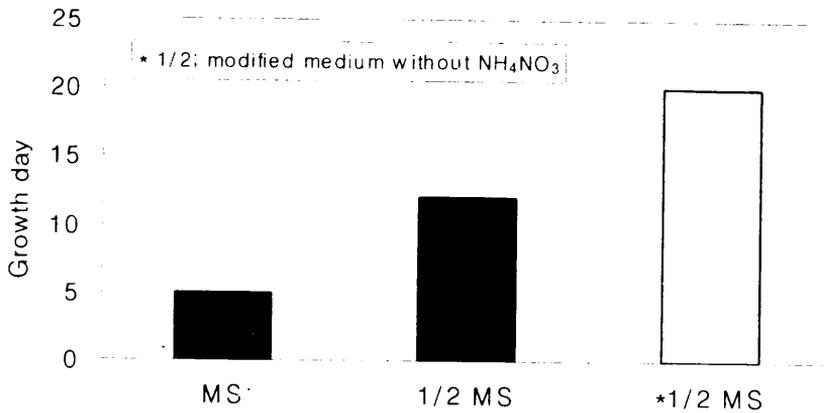


Fig. 1. Effect of media on survival of protoplasts from lily.

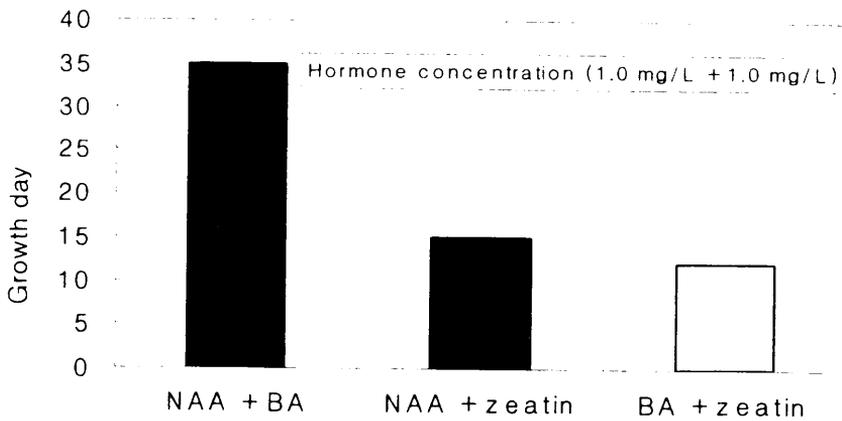
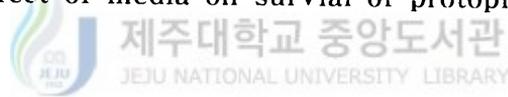


Fig. 2. Effect of hormones on survival of protoplasts from lily.

5. 원형질체 융합 및 잡종세포의 배양

PEG법을 이용하여 백합 원형질체 융합 조건을 알아보기 위해 PEG농도를 30, 40, 50%로 하여 처리한 결과(Table 7), 그 융합빈도는 그다지 높지 않았지만 PEG 50%용액에서 가장 좋았으며, 이는 정 등의 보고와 비슷한 결과를 보였다. 그러나 적정 처리시간이 20분 정도로 다소 차이를 보였고, PEG의 분자량이 높을수록 원형질체의 접착율이 높아진다고는 하나, 본 연구에서는 PEG 1,450이 적당하였다. 담배와 완두의 엽육조직 원형질체 융합인 경우 적당한 PEG(4,000) 농도는 50%였고, 가장 좋았던 처리시간으로는 15분이었으며(서 등, 1986), 감자와 담배인 경우는 50% PEG(1,450)에서 가장 적당하였고 처리시간은 15분이었다(정 등, 1987).

수세후 세포벽이 형성된 타원형의 원형질체를 관찰할 수 있었으며, 배양 2일 후 새로운 배지를 첨가해주었다. 그리고 1주일을 주기로 하여 계대배양하면서 mannitol 용액을 점차 희석해 주었다. 앞의 원형질체 배양 실험에서 가장 양호하였던 NH_4NO_3 를 첨가하지 않은 1/2 MS수정배지에 1mg/L NAA와 1mg/L BAP를 혼용처리하여 배양한 결과, 배양 7일째에 초기분열(Fig. 4-D,E)이 일어났으나 배양 15일 이후 생존력을 잃어 원형질체가 갈변화되면서 괴사하기 시작하였다. 원형질체 총 생존일수는 18일이었으며 세포분열이 일어난 원형질체는 융합체 중 20% 정도였다.

최근 식물세포의 유전학적 분석과 체세포의 교잡체 육성을 위하여 효과적이고 재생능력이 있는 세포융합체의 획득 기법에 관하여 중점적인 연구가 진행되고 있는데, Carlson 등(1972)은 *Nicotiana glauca*과 *N. langsdorffii*의 원형질체를 얻었으며, Melcher 등(1978)은 *Solanum tuberosum*과 *Lycopersicon esculentum*의 원형질체를 융합하여 순간 체세포 잡종식물을 얻는데 성공한 바 있다. 그러나 콩, 옥수수 등과 같은 농작물이나 화훼류에서는 아직 재현성 있는 식물체 분화의 예는 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 백합 품종간의 원형질 융합이 양호하게 이루어짐을 확인할 수 있었으며, 융합된 원형질체를 배양하여 초기 세포분열 과정을 거쳐 식물체 재분화까지는 이루지 못하였으나 Georgia의 원형질체 배양시 재분화된 식물체를 얻을 수 있었으므로 앞으로 지속적인 연구를 통해 체세포잡종식물체 획득이 가능하리라 사료된다.

Table 7. Effect of PEG concentration and treatment time on protoplast fusion

Time(minutes)	Concentration(%)		
	30	40	50
10	+	+	++
15	+	++	+++
20	++	+++	++++

Data were carried out protoplast fusion between Georgia and Marco polo
 ++++ ; excellent, +++ ; good, ++ ; moderate, + ; poor

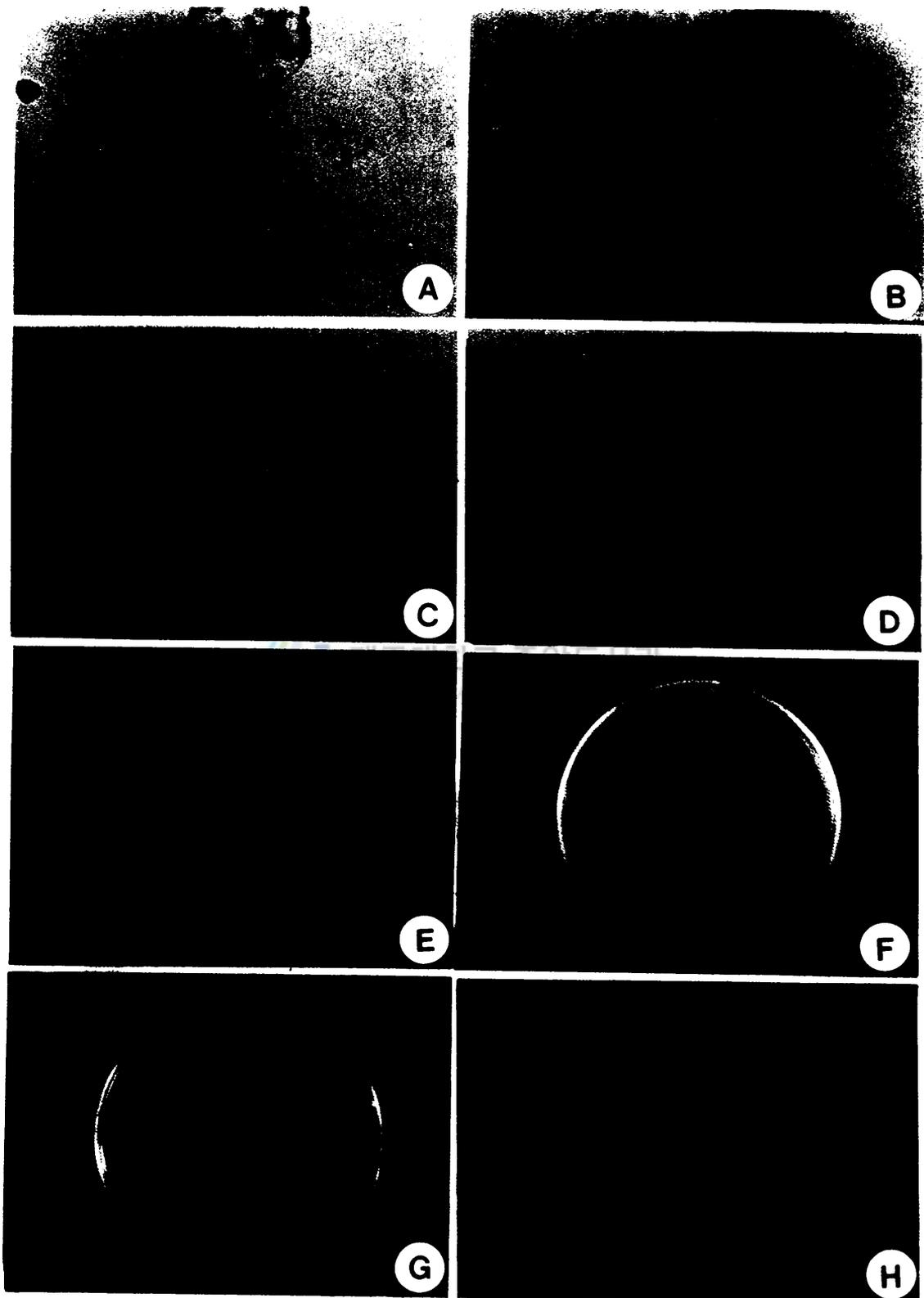


Fig. 3. Developmental stages of protoplasts obtained from lily.

A; Isolated protoplasts($\times 300$)

B; Protoplasts after 5 days of culture($\times 300$)

C-D; Cell division after 7 days of culture($\times 300$)

E; Cell division after 15 days of culture($\times 300$)

F; Colony formation in liquid-over-solidified medium

G; Callus formation after 2 months of culture

H; Plantlet regeneration from the callus after 3 months of culture



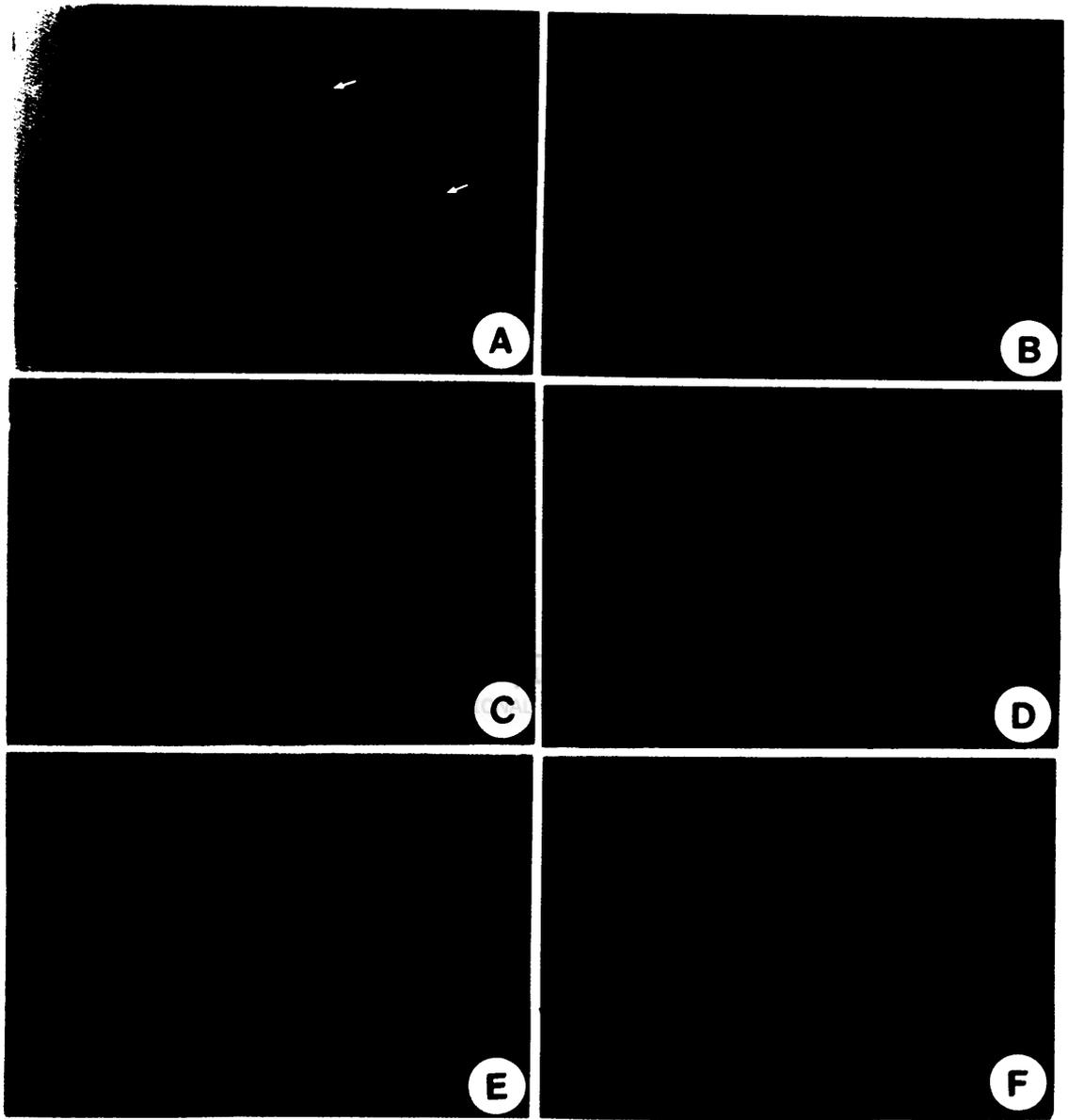


Fig. 4. Division stages of protoplasts after PEG treatment.

A; Isolated protoplasts($\times 300$)

a- Protoplast from mesophyll of Macro polo

b- Protoplast from callus of Georgia

B-C; hybrid cell after PEG treatment

D-E; Cell division after 7 days of culture($\times 300$)

F; Cell division after 15 days of culture($\times 300$)

IV. 적 요

본 연구는 백합육종의 기초자료로 삼고자 Longiflorum 계통의 Georgia 엽육조직 으로부터 원형질체를 분리, 배양함으로써 재생여부를 확인하고 Georgia와 Macro polo의 원형질체 융합을 시도하였다.

1. 인편 배양 결과 shoot와 root의 수는 1.0 mg/L NAA와 5.0 mg/L BAP에서 높게 나타났고, shoot 길이는 1.0mg/L NAA와 0.1mg/L BAP, root 길이는 0.1mg/L NAA와 1.0mg/L BAP에서, 자구수는 1.0mg/L BAP 단독처리구에서 높게 나타났다. 그리고 캘러스 형성은 0.1mg/L NAA와 0.1mg/L BAP에서 양호하게 나타났다.
2. 캘러스에서의 기관 분화 유도는 MS배지와 1/2MS배지에 배양한 결과 2개의 배지 모두 shoot와 root 분화가 1.0mg/L NAA와 1.0mg/L BAP 혼용처리구에서 양호하게 나타났다.
3. 원형질체 분리 적정농도를 알아보기 위해 Onozuka cellulase R-10, Macerozyme R-10, 그리고 Pectolyase를 효소농도별로 처리해본 결과 삼투조절제는 0.5M mannitol, 효소농도는 1.0% Cellulase, 1.0% Macerozyme, 0.1% Pectolyase를 처리시 2~3시간대로 분리가 가장 잘 되었다.
4. 원형질체 배양은 NH_4NO_3 를 첨가하지 않은 1/2MS수정배지에 1.0mg/L NAA와 1.0mg/L BAP를 혼용처리하였을때가 가장 좋았으며, 액체배지를 이용할 때가 원형질체의 생존율 및 세포분열이 가장 양호하였다. 초기배양 한달 후 세포괴가 형성 되었고, 그 후 한천배지로 계대배양하여 재분화를 유도하였다.
5. PEG에 의한 원형질 융합은 그 융합빈도는 높지 않았으나 PEG 50%용액에서 약 20분간 처리시 융합 빈도가 가장 높게 나타났다.

V. 참고문헌

- Aartrijk, J. K and G. J. Blom-Barmhoorn. 1981. Growth regulator requirement for adventitious regeneration from *Lilium* bulb scale tissue *in vitro* in relation to duration of bulb storage and cultivar. *Sci. Hort.* 14:261-268.
- Ahuja, P. S., S. Hadiuzzaman, M. R. Dauvey and E. C. Cocking. 1983. Prolific plant regeneration from protoplast-derived tissues of *Lotus corniculatus* L. (birdsfoot trefoil). *Plant cell Rep.* 2:101-104.
- Bokelmann, G. S and S. Roest. 1983. Plant-regeneration of protoplast of potato (*Solanum tuberosum* cv. Bintje). *Z. Pflanzenphysiol.* 109:259-265.
- Carlson, P. S., H. H. Smith and R. D. Dearing. 1972. Parasexual plant hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69:2292-2294.
- Cella, R and E. Galum. 1980. Utilisation of irradiated carrot cell suspensions as feeder layer for cultured *Nicotiana tabacum* cultivar Xanthi cells and protoplasts. *Plant Sci. Lett.* 19:243-252.
- 최상태. 1994. 구근 화훼종구의 국내 생산 기술. 화훼종구의 국내생산 기술개발 심포지엄. pp.44.
- 정상호, 심웅섭. 1987. 감자와 담배의 원형질체 배양 및 융합. 식물학회지. 30(4):287-298.

Cocking, E. C. 1985. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature* 187:962-963.

Emswella, S. H. 1957. Propagation of lilies. *Nor. Am. Lily Soc.* 10:7-18.

Evans, D. A. 1983. Agriculture applications of plant protoplast fusion. *Biotechnology* 1:253-261.

Frearson, E. M., J. B. Power and E. C. Cocking. 1973. The isolation, culture and regeneration of *Petunia leaf* protoplasts. *Dev. Biol.* 33:130-137.

Gamborg, O. L and J. P. Shyluk. 1970. The culture of plant cells with ammonium salts as the nitrogen source. *Plant Physiol.* 45:598-600.

Gamborg, O. L., K. N. Kao, R.A. Miller, L. C. Fowke and F. Constabel. 1973. Cell regeneration, division and plant developments from protoplasts (I). *Colloques Internationaux C. N. R. S.* 212:155-160.

Gleba, Y. Y and K. M. Sytnik. 1984. Techniques of parasexual hybridization. In protoplast fusion. *Springer-Verlag, Berlin.* pp.5-33.

Grosser J. W, Gmitter F. G Jr. 1990. Protoplast fusion and citrus improvement. *Plant Breed Rev.* 8:339-374

한창렬. 1985. 식물조직배양의 이용현황과 전망. *한국원예학회지.* 26(4):382-392.

한은주, 김호. 1990. 배추 원형질체로부터 Root 및 Shoot분화. *식물조직배양학회지.*

17(4):285-289.

허복구, 한용희, 이순봉, 김삼곤. 1994. 나리(백합)재배의 이론과 실제. 한국화훼기술 연구소. pp.26-61

정재동 외 17인. 1995. 최신생물공학. 경북대학교출판부. pp.412~643.

Kao, K. N., O. L. Gamborg, R. A. Miller. 1970. Cell division in cells regenerated from protoplasts of soybean and *Haplopappus gracilis*. *Nature* 232:124-131.

김규원, 최정분, 관기영. 1988. 켈러스배양에 의한 글라디올러스의 급속대량 증식. 한국원예학회지. 29(4):312-318.

김윤식, 이웅무. 1990. 한국산 나리속(*Lilium L.*)의 외부형태학적 형질에 관한 연구. 식물분류학회지. 20:165-178.

임순, 선정훈, 손성호, 한봉희, 백기엽. 1998. 광, 무기물 및 생장억제제가 나리류의 자구형성에 미치는 영향. 한국원예학회지. 39(1):107-110.

Meyer, Y and W. O. Abel. 1975. Budding and cleavage division of tobacco mesophyll protoplast in relation to pseudo-wall and wall formation. *Planta* 125:1-13.

Murashige, T and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.* 15:473-497.

Nagata, T and I. Takebe. 1971. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta* 99:12-20.

Melchers, G., M. D. Sacristan and A. A. Holder. 1978. Somatic hybrid plants of and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg. Res. Commum.* 43:203-218.

Niimi, Y and Onozawa, T. 1979. In vitro bulblet formation from leaf segment of lilies, especially *Lilium rubellum* Baker. *Sci. Hort.* 11:379-389.

Pierik, R. L. M and H. M. M. Steegmans. 1975. Effect of auxin, cytokinins, gibberellins, abscisic acid and ethephon on regeneration and growth of bulblet on excised bulb scale segments of hyacinth. *Physiol. Plant.* 34:14-17.



Shilito, R. D., J. Paszkowki and I. Potrykus. 1983. Agarose and bead type culture technique enables and stimulates development of protoplast-derived colonies in a number of plant species. *Plant Cell Rep.* 2:244-247.

Simmonds, J. A and Cumming, B. G. 1976. Propagation of *Lilium* hybrids. II. Production of plantlets from bulb-scale callus cultures for increased propagation rate. *Sci. Hort.* 5:161-170.

Skoog, F and C. O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and oragn formation in plant tissue cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11:118-131.

杉浦廣幸. 1993. *Lilium speciorubel* および *L. × elegans* プロトプラストからの
植物體再生. 育雜. 43:429-437.

서정우, 이광웅. 1986. 전기장하에서의 담배 및 완두 원형질체 융합. 식물학회지.
29:1-10.

Verma, D. C and S. R. Wann. 1983. 6th International protoplast symposium,
Potrykus, I. et al. (Editors), Experientica Suppl. 45:10-11.

Zapata, F. J and K. C. Sink. 1981. Somatic embryogenesis from
Lycopersicon peruvianum leaf mesophyll protoplasts. *Theoret. Appl. Genet.*
59:265-268.

Zapata, F. J., K. C. Sink and E. C. Cocking. 1981. 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.

Ziv, M., A. H. Halevy and R. Shilo. 1970. Organs and plantlet regeneration
of gladiolus through tissue culture. *Ann. Bot.* 34:671-676.

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 항상 사랑으로 이끌어 주신 허인옥 교수님께 먼저 진심으로 감사를 드립니다. 또한 부족하지만 논문이 나오기 까지 바쁘신 중에도 심사를 맡아 논문을 다듬어 주신 고석찬 교수님, 김문홍 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 평소에 학문 뿐만 아니라 삶의 밑바탕을 다져주신 오문유 교수님, 오덕철 교수님, 이용필 교수님, 김원택 교수님, 이화자 교수님, 김세제 교수님께도 더불어 감사를 드립니다.

특히 연구과정을 수행함에 있어 격려와 충고를 아낌없이 해주신 김성철 선배님, 한태완 선배님을 비롯한 대학원생 여러분과 실험실 가족들에게 고마움을 전합니다. 그리고 제주농업시험장 송창훈 장장님, 서호덕 과장님 이하 직원 여러분에게도 고마움을 전합니다.

끝으로 저를 낳아 주시고 지금까지 따뜻한 사랑으로 보살펴 주신 부모님과 어려울 때 항상 힘이 되어준 가족들에게 감사를 드리며 미흡하나마 이 조그마한 결실을 드립니다.

1998년 12월

박수영 드림