〔韓國造景學會誌, Vol. 21, No. 4 pp. 83~94 1993年 4月〕

造景植物의 Micro-Propagation에 關한 硏究

朱 明 七

東新大學校 自然科學大學 環境造景學科

A Study on the Micro-Propagation of Landscape-plants

Joo, Myoung Chil

Dept. of Landscape Architecture, Dong Shin University

Summary

After coming this century, as the propagative method of plants on a scientific foundation has been accompanied systematically, it has played an important part in the improvement of cultivar. But an existing propagative technique is not a few defects in our tasks and industrial structure which changes every hour and envirnment which undergoes a sudden change. To use developed biological knowledge recently, an existing propagative method which is main axis in sexual reproductive crossing, is increased much in the inside of internal organs by asexual reproductive means which is on a different level, and by, introducing a new character, it improves an inherited character etc. We have observed methods which supplement or replace a defect. These methods are not yet ripe for putting to practical use in the present reserch phase but convinced that they will offer an epoch-marking turning point.

I. 序 論

아름답고 짜임새있는 造景을 計劃하고 施工함에 있어서 質感이 좋은 造景植物의 用途別 利用과 멋있는 配植設計, 많은 樹種 中에서 適樹를 選定하여 우리가 希望하는 景觀風致를 造成하고 또한 그 植栽機能을 發揮토록 하는 것은 매우 重要한 일이며 그러기 위해서는 우리가 植栽하고자 하는 各種 造景植物의 適切한 繁殖이 先行되어야 할 것이다.

植物의 繁殖法은 種子播種에 의한 有性繁殖과 挿木, 接木, 取木 等에 의한 無性繁殖 으로 區分된다. 一般的으로 원래 野生의 植物로서 形質의 變異가 많지 않은 것 또는 한번에 多量의 苗木과 大木을 增殖시키고자 하는 造景植物은 주로 種子에 의해 繁殖 시키지만 園藝化된 花木類로서 品種名이 붙어 있는 것과 變異된 것, 그리고 種實이 생기지 않거나 또는 맺히기 어려운 種 等은 無性繁殖에 의하여 繁殖시킬 수 밖에 없다. 따라서 改良된 植物을 增殖하고자 하는 境遇 또는 形質이 優秀하거나 形質轉換된 植物을 必要로 하는 境遇, 빠른 時間안에 願하

는 種을 多量으로 增殖시키고자 하는 境遇 等에서는 特別히 새로운 增殖 手段에 依存 하여야만 할 것이다.

本 硏究의 目的은 現行 造景植物 繁殖技術上 新品種 育成, 大量繁殖 等에 오랜 歲月, 莫大한 施設과 努力, 經費가 必要되는 短點들을 많이 內包하고 있어 이것을 培養生物學, 微生物遺傳學 等에서 얻어진 새로운 知識을 利用해 解決 또는 代替할 方法이 없을는지 最近知識의 檢討와 實驗室에서의 實驗을 通하여 그 可能性을 찾는데에 있다.

Ⅱ. 硏 究 史

Micro-propagation의 原理는 Schleiden(1838)과 Schmann(1839)에 依하여 細胞自體가 全形成能(totipotency)을 지니고 있다는 理論에 根據를 두고 出發하였는데, Rechinger(1893)는 植物의 一部分을 培養하므로써 切片體가 膨大된다는 事實을 發見하였고, Kotte(1922)는 Liebig의 肉抽出物을 添加한 培地에 완두와 옥수수의 根端組織을 培養하여 一定期間 培養하는데 成功하였다.[47] 1932年 White와 Gautheret에 依해서 토마토의 뿌리를 長期間 繼代培養하는데 成功한 것이 組織培養의 始初이며 1934年 Gautheret가 *Acer pseudoplanus* 形成體로부터 callus를 誘導한 것이 木本植物 組織培養의 始初이며 이들의 基礎위에서 1950年代 以後 暴發的으로 發展하였다.[14]

植物組織 培養에 있어서 現在 實驗材料로 가장 많이 利用되고 있는 캘루스는 Gautheret, Nobecourt 및 White가 培養 切片組織에서 처음으로 獲得하였다. Gautheret와 Nobecourt(1939)는 獨自的으로 당근 뿌리의 組織培養을 通해 캘루스를 獲得하여 이것을 繼代培養함으로써 캘루스를 無限定으로 維持 增殖시킬수 있다고 報告하였으며, White(1939)도 *Nicotiana glauca* × *N. lansdorffi* 交雜種에서 切片體(explant)를 分離 培養하여 캘루스를 얻는데 成功하였다고 發表하였다. 그러나, 캘루스 培養이 植物의 生理, 生化學, 形態形成 및 遺傳育種 硏究에 廣範圍하게 適用된 것은 Skoog와 Miuer(1957)에 依하여 시토키닌이 發見된 以後부터 可能하게 되었다.[48]

1962년 英國의 Cocking은 토마토根을 *Myrothecium verrucaris*에서 單離한 細胞壁 分解酵素液으로 處理하여 植物 protoplast를 얻는데 成功한 以來 많은 植物의 protoplast 單離 例가 報告되었다.[3,54] 原形質體는 酵素液으로 細胞壁을 除去하여 얻어지는데 이들 原形質體를 適當한 培養條件下에서 培養하면 細胞壁이 再生되고 Callus를 形成하는데 主로 가지科 植物에서 硏究되었으며[5,7,33] *Quercus*,[29] *Pinus*,[12] *Abies*,[27] *Alnus*,[46] *Sorbus*,[25] *Fagus*,[3] *Malus*,[22,35] *Ulmus*,[45] *Populus*[42,55] 等에서도 報告되었다.

Melchers 等[30]이 감자와 토마토의 原形質體 融合에 成功하여 植物體를 誘導한 以來 *Nicotiana*, *Petunia*, *Datura*, *Solanum*, *Lycopersicon* 等 主로 가지科 植物에서 硏究가 이루어 졌으며[1,44] 最近에는 木本植物에서도 報告되었다.[4,19,43,56]

1982年 以後 튜머 形成과 opine 合成을 *A. tumefaciense*과 *A.rhizogenes*內의 Ti plasmid의 存在와 關係되는 分子生理에 對해 Karl, Schell, Caplan 等이 報告하였고[24] Hammerschlag[17]는 形質轉換에 對해 報告하였다. 또한 hairy roots를 形成하는 *A.rhizogenes*를 使用하여 形質轉換을 圖謀하고 있는데 Tanaka[39]는 *Brassica*와 *Raphanus*에서, Kamada 等[20]은 *Atropa*에 대하여 形質轉換을 報告하였다.

Ⅲ. 材料 및 方法

硏究를 遂行하기 위하여 文獻調査와 實驗室에서의 實驗을 竝行하였는데 共試材料로는 枸杞子를 使用하였으며 實驗室에서의 實驗方法은 다음과 같다.

1. 芽培養 • Callus 培養

8年生 枸杞子의 當年生 新梢枝를 6月 初旬에 採取하여 上端과 下端部位를 除去한 中間部位를 5cm 間隔으로 等分하여 洗滌消毒한 試料를 1~1.5cm 길이로 腋芽가 1個씩 붙도록 調製하

여 MS 培地를 基本으로한 IAA와 Kinetin 添加 培地를 使用하여 置床하였는데 培地別 hormone 組合은 Table 1과 같다. 調製된 培地는 殺菌하여 培地條件 溫度 26±2°C, 白色螢光燈下(1,500~2,000 Lux) 每日 16時間씩 照明하여 6週後에 生育狀態를 調査하였다. 2次로 培地別 生育狀況을 알아보기 爲하여 가장 生育狀態가 優秀한 hormone 組合을 利用하여 MS(Murashige-Skoog), GD(Gresshoff-Doy), WPM(Woody Plant Medium), SH(Schenk-Hildebrandt) 및 B5 5種類의 培地에 置床하였다.

Callus 培養은 MS培地(IAA 1.0,Kinetin 2.0mg/l)에서 器內培養 12週된 葉을 採取하여 生長調節物質 無添加 MS培地에 置床하여 500Lux의 照度와 16時間의 光週期 下에서 培養하였다.

Table 1. Growth regulators supplemented to Murashige and Skoog's media.(mg/l)

Media No.	IAA	Kinetin	Media No.	IAA	Kinetin
M_1	0	0	M_9	0.5	1.0
M_2	0	0.5	M_{10}	0.5	2.0
M_3	0	1.0	M_{11}	1.0	0.5
M_4	0	2.0	M_{12}	1.0	1.0
M_5	0.5	0	M_{13}	1.0	2.0
M_6	1.0	0	M_{14}	2.0	0.5
M_7	2.0	0	M_{15}	2.0	1.0
M_8	0.5	0.5	M_{16}	2.0	2.0

2. 原形質體 分離 및 培養

原形質體 分離는 R.A.dixon[61]의 方法으로 原形質體 數量은 haemocytometer(L./1mm×W./1mm×D./0.1mm)를 使用해서 生重量 1g當 原形質體 數를 換算하였고, 生存率은 에반스 溶液(0.2% Evan's blue)을 使用하여 細胞數를 顯微鏡으로 檢鏡(着色되지 않은 原形質體數/全體原形質體數×100) 計算하여 %로 나타내었다.

分離條件은 豫備實驗結果 가장 成績이 優秀한 酵素濃度 Macerozyme'Onozuka'R-10 3%와 Cellulase'Onozuka' 1%, Mannitol 濃度 0.4M, 酵素溶液의 pH 6.2, 酵素 處理時間은 6時間으로 하였고, 材料는 播種後 56日, 94日, 131日 된 잎과 뿌리, 實驗管內 置床後 46日 된 器內培養苗의 잎과 뿌리 8種으로 하였다. 培養은 器內培養(MS+IAA 1.0mg/l, Kinetin 2.0mg/l) 8週後의 葉肉組織을 材料로 原形質體를 分離後 MSP19M 培地(MS+3% sucrose+9% mannitol+NAA 2.0mg/l+BAP 0.5mg/l)에서 原形質體의 密度를 5×10^3, 5×10^4, 2.5×10^5個/ml로 調節하여 25±2°C의 暗狀態下에서 培養하였다.

3. 細胞融合

MS+IAA 1.0,Kinetin 2.0mg/l培地에서 枸杞子의 節間組織을 培養하여 8週 生長한 葉과 根組織을 融合材料로 使用하였고, 融合은 polyethylene glycol(PEG) 方法을 使用하였다.

4. 形質轉換에 關한 硏究

MS培地(IAA 1.0mg/l, Kinetin 2.0mg/l)에서 12週된 器內苗의 葉을, 菌株는 韓國菌協會에서 *Agrobacterium tumefaciens* ATCC11157을 分讓받아 使用하였으며 形成된 Tumour가 遺傳的으로 形質轉換 되었는지를 確認하기 爲하여 electrophoration法에 依하여 opine 分析을 實施하였다.

Ⅳ. 結果 및 考察

1. 組織培養技術

組織培養은 一種의 微量繁殖(micro-propagation)法으로써 人爲的으로 組成된 營養分이 含有되어 있는 培地에 植物의 組織이나 器官을 分離시켜 그것을 無菌狀態에서 營養繁殖시키는 技術을 말하며, 植物組織培養에 가장 寄與한 分野는 營養系 植物의 急速한 大量 繁殖에 있다. 그 중에서 가장 代表的인 것으로는 蘭科植物의 組織培養이며 이 外에도 1年草, 觀葉, 觀賞植物等이 組織培養에 의하여 大量 生産되고 있다.

闊葉樹에서는 *Populus, Eucalyptus, Butula, Salix, Paulownia, Celtis, Alnus, Quercus, Tilia, Sorbus, Robinia, Malus, Diospyros, Prunus, Olea, Juglans, Castanea, Citrus, Ficus, Camellia* 等에서 硏究가 이루어졌다.[6,10,15,47,48,59,60,61]

한편, 針葉樹類에 對한 硏究는 種子의 胚子葉, 어린植物體의 莖頂이나 葉束에서 不定芽誘導 및 生物體 生産이 多數 報告 되었는데 *Pinus, Picea, Larix, Cryptomeria, Chamaecyparis* 等 많은 樹種에서 報告되었다.[10,32,36,59,60,62]

實驗室에서 枸杞子를 利用하여 芽培養을 하였는데 置床 6週後 器官의 發育狀態는 Table 3과 같다.

植物組織培養에 있어서 가장 重要한 物質은 Auxin과 Cytokinin이다. 一般的인auxin의 使用濃度는 1l當 0.1~10mg이며 cytokinin의 濃度는 0.01~30mg이다. Cytokinin은 몇가지 例外가 있기는 하지만 主로 N-substituted aminopurin(Kinetin)誘導體이고, 細胞增殖, 分裂, 導管組織分化, 新梢形成에 效果的이다. Auxin 中 널리 利用되는 IAA(3-indole-acetic acid)는 植物體內에서 合成되는 內生 auxin이지만 光이나 酵素的 酸化에 依하게 쉽게 破壞되며 一般的으로 auxin은 細胞分裂, 形態發生, 葉伸長, 뿌리分化 等에 作用하기 때문에 培地內에서 auxin과 cytokinin의 比率이 器官 및 形態形成에 重要한 役割을 한다.[10,13,49,62] 一般的으로 알려진 바에 依하면 cytokinin이나 auxin을 單用處理하는 것보다 混用하여야 相互間의 上昇作用이 있다[36,40]고 하는데, MS+IAA, Kinetin 混用培地에서의 枸杞子의 shoot發生率은 74%, root發生率은 44%, plantlet形成率은 31%로 單用處理培地보다 대체로 成績이 좋았으며 hormone無處理 培地에서의 shoot發生率 67%, root發生率 33%, plantlet形成率 22%보다도 높았다(Table 3).

IAA 1.0mg/l와 Kinetin 2.0mg/l組合을 添加한 MS, B5, WPM, GD 및 SH 培地에서의 各器官別 發育狀態는 Table 4와 같다. Shoot發生率은 WPM培地에서 100%로 가장 優秀하였고 SH>MS.B5>GD 順이었으며, 길이는 WPM에서 가장 優秀했고 MS, GD, SH에서는 비슷하였으며 B5에서 低調하였다.

Table 3. Plantlet induction on MS media supplemented with IAA and Kinetin in bud culture.

Media	No. of planting	No. of explant cultured	Shooting			Rooting			Plantlet	
			No.	%	Length(mm)	No.	%	Length(mm)	No.	%
M_1	10	9	6	67	7.0	3	33	4.0	2	22
M_2	10	6	6	100	4.2	1	17	1.0	1	17
M_3	10	10	9	90	1.8	2	20	1.1	0	0
M_4	10	7	4	57	11.3	1	14	9.0	1	14
M_5	10	7	6	86	4.5	1	14	0.3	1	14
M_6	10	9	8	89	4.6	2	22	8.5	1	11
M_7	10	8	8	89	1.8	3	33	3.6	1	11
M_8	10	10	6	75	12.8	4	50	7.1	2	38
M_9	10	9	5	50	30.2	4	40	5.2	2	30
M_{10}	10	10	7	78	17.3	2	22	6.0	1	11
M_{11}	10	10	8	80	22.4	4	40	7.8	3	30
M_{12}	10	9	8	80	4.1	5	50	5.2	3	30
M_{13}	10	10	8	89	27.5	5	56	8.6	5	56
M_{14}	10	10	6	60	21.7	5	50	7.1	4	40
M_{15}	10	10	9	90	7.0	4	40	4.9	2	22
M_{16}	10	10	7	70	24.0	5	50	5.0	3	30

Root 發生率은 WPM>MS.SH>B5>GD 順이었고, 길이는 SH>MS>WPM>B5>GD 順이었다.Plantlet 形成率은 WPM培地에서 60%로 가장 優秀하였고 MS와 SH는 50%, B5 40%, GD는 30%였다.

實驗管에서 枸杞子의 shoot가 10~12cm 生長한 것을 뿌리의 agar 를 除去하고 培養土(Perlite : Vermiculite : Peat=1 : 1 : 1 v/v/v)를 넣은 pot에 移植한 後 溫室內에서 溫度 25±2°C, 關係濕度 90% 以上 維持한 後 1週日間 vinyl封紙를 씌워 以後부터 서서히 封紙를 벗기면서 硬化시킨 結果 10週後 90%의 苗木을 얻을 수 있었다.

Table 4. Shooting, rooting and intact plantlet of *Lycium chinense* obtained from various culture media.

Media	No. of explant cultured	Shooting			Rooting			Plantlet	
		No.	%	Length(mm)	No.	%	Length(mm)	No.	%
MS	10	8	80	26.2	5	50	8.4	5	50
B_5	10	8	80	17.1	4	40	7.5	4	40
WPM	10	10	100	33.6	6	60	8.1	6	60
GD	10	7	70	26.0	3	30	7.0	3	30
SH	10	9	90	25.5	5	50	8.7	5	50

2. Callus培養技術

植物의 組織이 傷處를 받게되면 傷處部位가 再生되기 위하여 캘러스가 形成되는데, 이러한 캘러스는 空氣中에 露出되면 폴리페놀性 物質이 生成되어 長期間 生存하지 못한다. 따라서 이러한 캘러스組織을 長期間 維持 增殖시키기 위한 手段으로 생겨난 것이 캘러스培養이다. 캘러스培養은 健全한 植物이 傷處를 받음으로써 생겨나는 캘러스와는 形成過程中에 必要한 營養素의 給源이 다르다는 點에서 차이가 있다. 이러한 差異와 培養環境이나 組織自體가 지닌 特殊性 때문에 細胞의 增殖이나 生長에 必要한 物質代謝 過程이 다르며, 繼代培養하여 長期間 캘러스를 保管할 境遇에는 細胞內의 生理.生化學的 變化 및 遺傳的인 變異가 심하게 나타난다. 따라서, 이러한 問題들을 硏究하기 위한 手段으로 캘러스培養이 많이 利用된다. 이 方法의 利點은 無菌的으로 取扱되며, 季節的으로 關係없이 作業할 수 있으며 短期間에 높은 增殖率을 期待할 수 있다는 것이다. 그러나 이 境遇 脫分化細胞로부터 器官의 再分化를 誘導하지 않으면 안된다는 어려움이 있다.

培養에 있어서 遺傳的으로 均一한 細胞群을 取扱하는 缺點이 있지만 이러한 遺傳的인 不均一性을 積極的으로 利用해서 變異體의 作出을 試圖한 일도 있다.

Citrus, *Corylus*, *Juglans*, *Santalum*, *Aesculus*, *Liguidambar*, *Bambusa*, *Liriodendron*, *Pawlownia*, *Albizzia*, *Malus* 等의 闊葉樹種의 캘루스培養에 對한 報告가 있으며, 針葉樹에서는 *Picea*, *Pinus*, *Larix* 等 에 對한 報告가 있다.[48,50,60,61,62]

實驗室에서 枸杞子의 캘루스 誘導는 培養 8~10日 부터 開始되는 것이 觀察되었으며 16日째 부터는 Shoot가 分化하기 始作하였다. 朴 等[59]은 느티나무 播種苗의 葉을 材料로 하여 MS同一培地에서 5~7日 부터 Callus誘導가 開始되어 모두 100%의 誘導率을 報告하였는데 本 實驗에서는 Callus誘導率 60%, Shoot分化率은 40%로 나타났다. 이와 같은 Callus誘導率의 差異는 材料內의 生長調節 物質의 含有에 基因하는 것으로 判斷된다.

3. 半數體 培養技術

葯培養(anther culture)을 通하여 半數體를 生産하는 것은 突然變異(mutation)의 誘起나 相同(homozygous)의 植物體를 生産해 낼 수 있는 手段이 되기 때문에 큰 意義를 지닌다. 또한 在來的인 繁殖方法으로는 努力이 많이 들고, 非能率的이며 繁殖에 오랜 年限이 所要되기 때문에 이러한 缺點을 補完할 수 있는 代替的인 方法으로 이를 適用할 수 있다. 특히 葯과 花粉培養에 의하여 또는 交雜種의 胚(hybrid embryo)培養을 通한 染色體 消滅에 의하여 童貞生殖(androgenesis)을 誘導하여 繁殖計劃年限을 顯著히 短縮 시킬 수 있다는 것은 植物組織培養의 큰 長點이다.

半數體는 상당히 많은 植物에서 만들어지고 있으며 染色體의 콜히친處理에 의한 倍化에 의해서 점차 純系를 만드는 것으로 交雜育種에 대해 繁殖年限을 短縮시키는 利點이 있다. Tulecke는 처음으로 裸子植物인 *Ginkgo biloba*의 成熟한 花粉을 培養하여 半數性 캘루스의 形成을 誘導하였는데 器內條件에서 配偶子體를 形成하는 花粉의 正常的인 發達經路를 造作함으로써 精子(sperm)代身에 半數性組織을 誘起시킬 수 있었다. 半數體作出은 裸子植物의 Cupressaceae科, Taxodiaceae科, Pinaceae科, 被子植物의 Salicaceae科 等에서 報告되었다.[47,48,61,62]

4. 原形質體 分離培養技術

植物細胞는 cellulase를 主成分으로 하는 細胞壁에 둘러싸여 個個의 細胞는 pectine質에 依해 接着되어 있다. 細胞壁 分解酵素로 植物細胞를 處理하는 操作에 依해 細胞壁을 갖지않는 細胞, 卽 protoplast를 얻을 수 있다. 植物의 原形質體를 獲得하는 主된 方法은 葉肉組織이나 液體懸濁 培養細胞를 利用하는 것이 一時에 多量의 原形質體를 比較的 쉽게 獲得할 수 있다. 原形質體는 모든 植物의 組織이나 器官, 즉 캘러스, 生長點, 子葉, 體細胞胚, 果實, 뿌리 및 花粉에서도 成功的으로 分離해 낼수 있다. 原形質體(protoplast) 分離의 成功은 여러가지 要因, 卽 材料의 組織, 植物의 種이나 品種, 植物體의 生理的 狀態 및 酵素의 混合 方法에 依存한다.[61] 材料의 幼弱性(Juvenility)에 따라 酵素의 適正濃度가 다를 것[57,58]이라고 하였는데 材料別 分離數는 Table 5와 같다.

Table 5. Effect of organs treated with enzyme solution on protoplast yield and viability from mesophyll tissues

Materials		Leaf age(日)	Protoplast yield	Viable protoplast	Viability (%)
Leaf	*in vitro*	56	3.9×10^5	3.2×10^5	82.1
	seeding	131	3.0×10^5	2.2×10^5	73.3
	〃	94	3.0×10^5	2.4×10^5	80.0
	〃	56	6.3×10^5	5.2×10^5	82.5
Root	*in vitro*	56	6.3×10^5	4.5×10^5	71.4
	seeding	131	2.4×10^5	1.6×10^5	66.7
	〃	94	2.9×10^5	2.0×10^5	69.0
	〃	56	3.3×10^5	2.3×10^5	69.7

實生苗의 境遇 잎과 뿌리에서 모두 葉齡이 적을 수록 原形質體 遊離數, 生存數, 生存率이 높았는데 이는 組織이 外部에 依한 stress를 조금 받아 細胞壁이 보다 硬化되지 않은 結果로 推測된다. 同葉齡의 器內揷木苗와 實生苗에서 葉肉組織의 境遇 實生苗가 原形質體 生存分離數에서 多少 높아 安 等[53]의 報告와는 差異를 보였고, 뿌리組織의 境遇에는 一致하였는데 이는 材料, 外部 環境의 差異에 基因되는 것으로 判斷된다.

葉肉組織에서 分離한 原形質體를 MSP19M 培地 (NAA 2.0mg/l+BAP 0.5mg/l)에 5×10^3, 5×10^4, 2.5×10^5密度로 培養하였다. 原形質體를 含有한 培養液은 直徑 9cm의 petridish에 8ml씩 넣어 parafilm으로 密封하여 培養하였는데 18日後에는 5×10^4와 2.5×10^5/ml에서 budding이 일어났으며 細胞分裂도 일어났다. 26日 後에는 5×10^4/ml에서 10個 以上의 細胞로 된 colony가 形成됨을 觀察할 수 있었다. Protoplast는 培養에 依해서 colony를 形成하며 캘루스를 形成한

다. 이 캘루스로 부터 器官이 分化되며 幼植物體가 誘導된다. 이것을 全形成能(Totipotency)이라 하며[48], 캘루스로부터 植物體를 再生시킨 例로는 *Solanum nigrum*,[34] *Solanum tuberosum*,[5] *Petunua hybrida*,[9] *Nicotiana tabacum*,[18] *Lycopersicon pimpinellifolium*,[23] *Solanum melongena*[37] 等 Salicaceae科 植物에서 硏究가 많으며 *Populus*,[41,52,55] *Liriodendron*,[31] *Citrus*,[26] *Broussonetia*[39] 等에서도 報告되었다.

5. 細胞融合技術

植物原形質體는 細胞와 植物體 全體의 遺傳的인 組成을 變更시키기 爲하여 實施되는 여러가지 技法의 始發點이 되며 分離된 原形質體는 細胞膜(cell wall)이 없는 細胞로서 다른 種의 原形質體와 融合하도록 誘導될 수 있으며, 이렇게 하여 새로운 植物雜種, 卽 體細胞雜種(Somatic hybridization)을 만들수 있다.[61]

原形質體를 融合誘發시키는 方法으로는 Polyethylene Glycol(PEG), 높은 pH와 Ca^{++}의 化學的 方法과 electrofusion 方法이 있는데 本實驗에서는 一般的으로 使用되는 PEG法을 使用하였다.

器內培養된 葉肉組織에서 分離한 原形質體間의 融合率은 두個의 細胞以上 數個의 細胞가 하나로 合한 것도 1個의 融合細胞로 看做하여 29.6%(163融合數/550原形質體數)를 나타내었다. 葉組織과 根組織에서 分離한 原形質體의 融合率은 葉肉組織間의 融合率보다 顯著하게 低調한 5.1%(27融合數/531 原形質體數)를 나타내었다.

Populus 懸濁細胞를 利用하여 張 等[56]은 PEG 方法에서 31.7%, PEG+high pH/Ca^{++} 融合方法에서는 30.6%의 融合率을 報告하였는데 理想的인 最適 融合率을 維持하기 爲해서는 適正密度가 分布되도록 함이 重要하다 하였다.

體細胞融合에 成功한 事例를 보면 木本植物에서는 *Citrus*+*Citrus*(Vardi 等 1982), *Populus*+*Populus*(Ahuja, 1984; Saito, 1980; 張 等 1987), *Paulownia*+*Paulownia*(Saito, 1980), *Ulmus*+*Ulmus* (Redenbaugh 等, 1981), *Citrus*+*Poncirus* (Ohgawara 等 1983), *Quercus*+*Quercus*(玄 等 1985), *Citrus*+*Citrus*(Ohgawara 等 1985) 그리고 *Populus*+*Hibiscus*(Ito 等 1986) 等에서 報告되었다.[2,4,19,43,56]

6. 形質轉換技術

組織培養技術이 發達되면서 近刊에는 外來遺傳子를 植物細胞에 挿入시켜 形質轉換된 植物體를 얻으려는 硏究가 進行되고 있다. 形質轉換을 願하는 細胞속으로 遺傳子를 導入시키는 方法으로는 electrophoration法, ethylenglycol法과 particle gun法 等이 있으며, 生物的 方法으로는 virus 使用法, Agrobacteria를 利用하는 方法 等이 있다. 이中에 electrophoration法과 Agrobacteria法이 많이 利用되고 있다.[51] *Agrobacterium tumefaciens*는 Rhizobiacea 科에 屬해 있는 土壤細菌으로써 다른 bacteria와는 달리 Ti-plasmid를 가지고 있어 植物細胞의 DNA와 結合하여 tumour를 만든다. Plasmid의 T-DNA部分에 우리가 願하는 外來遺傳子를 끼어 넣고 이렇게 挿入된 遺傳子를 *A.tumefaciens*에 依해 植物細胞속으로 집어 넣은 後 形質轉換된 細胞들을 T-DNA選拔 marker를 利用 選拔하게 된다. 이렇게 Ti-plasmid를 Vector로 利用하여 抗生劑抵抗性遺傳子, 除草劑低抗性遺傳子 等, 他植物遺傳子를 Selection marker로 形質轉換된 植物體가 報告되었다.[11,16,21,26,50]

實驗室에서 共培養에 依한 Tumour 形成은 培養 8日째에 觀察할 수 있었는데 葉下端 部分에서 튜머를 形成하였고 反對쪽 下端 主脈에서 Root가 發生되었다. Hammerschlag[17]는 *A. tumefaciens* strain tms 328 Tn5를 使用하여 *Prunus* 모든 栽培 品種에서 Tumour 組織이 生成됨을 報告하였고 Chyi와 Gregory[11]는 *Lycopersicon*에서 34%의形質轉換을 報告하였는데 本實驗에서 接種된 葉의 튜머 形成率은 10%였다. 朴 等[50]은 *Zelkova*의 Tumour 模樣이 둥글며 엷은 褐色을 띠어 一般 callus와 달랐다고 報告하였는데 本實驗에서도 Tumour의 模樣이 둥글고 褐色을

띠고 있음을 觀察할 수 있었다. 形成된 Tumour 組織이 遺傳的으로 形質轉換되었는지 確認하기 爲하여 opine 分析을 實施하였던 바 tumour 組織에서만 opine 物質이 檢出되었고 正常 callus 組織에서는 나타나지 않았다.

Ⅲ. 結 言

今世紀에 들어와서 植物繁殖法은 科學的 土臺 위에서 體系的으로 隨行됨으로서 品種改良에 決定的 役割을 해 왔지만 現行의 繁殖技術은 時時刻刻으로 變하는 우리의 嗜好와 産業構造, 急變하는 環境에 對應하기에는 缺陷이 적지 않다. 最近에 發展된 生物科學的 知識과 技術을 利用하여 有性生殖的 交雜을 主軸으로 하는 現行繁殖法과는 次元이 다른 非有性生殖的 手段에 의해 器內에서 多量으로 增殖하고 새로운 形質을 導入하여 植物의 遺傳形質을 改善하는 等 現行 造景植物 繁殖方法에서의 不足한 點을 補完 또는 代替할 수 있는 方法을 살펴 보았다. 이 方法들은 現在 研究段階에 있는 것도 있어 實用化 되기에는 아직 時機尙早 이겠지만 將次 造景植物 繁殖方法에 새로운 轉機를 提供할 것이다. 本 研究에서는 *Lycium chinense*를 對象으로 實驗을 實施하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 8年生 枸杞子의 當年生 新梢枝에서 採取한 explant의 axillary bud로 부터의 plantlet 發生은 MS+IAA 1.0 mg/l+Kinetin 2.0 mg/l 培地에서 56%로 나타났다.
2. Shoot發生은 MS+Kinetin 0.5 mg/l에서 100%, root發生은 MS+IAA mg/l+Kinetin 2.0 mg/l에서 56%로 가장 優秀하였다.
3. IAA 1.0 mg/l+Kinetin 2.0 mg/l를 添加한 培地中 plantlet發生率은 WPM培地에서 60%로 成績이 좋았으며 MS와 SH, B5 그리고 GD 培地 順이였다.
4. 實驗菅內에서 shoot가 10~12 cm 生長한 plantlet를 perlite : vermiculite : peat=1 : 1 : 1 (v/v/v)의 培養土를 넣은 pot에 移植한 結果 90% 活着率을 보였다.
5. 器內의 葉을 材料로 生長調節 物質 無添加 MS培地에서 Callus培養을 한 結果 Callus 誘導率 60%, Shoot 分化率 40%로 나타났다.
6. 實生苗 枸杞子의 葉肉組織으로부터의 原形質體 裸出은 Macerozyme 3%와 Cellulase 1% 組合, 0.4M Mannitol, pH 6.2, 6時間의 處理에서 또한 材料의 葉齡이 낮을수록 原形質體 數量과 生存率이 높았다.
7. MSP19M 培地(NAA 2.0mg/l+BAP 0.5mg/l)에 原形質體 密度別로 培養한 結果 5×10^4/ml에서 18日째 budding이 일어났으며 26日後에 cell colony의 形成을 觀察할 수 있었다.
8. 器內培養苗의 細胞融合 誘導를 爲해 Polyethlene glycol(PEG) 處理濃度 30%(W/V),處理時間 10分, 原形質體의 密度 2×10^5/ml에서 葉細胞間의 融合率은 29.6%, 葉과 根細胞間의 融合率은 5.1%였다.
9. *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 11157을 使用하여 器內培養苗 葉組織에 接種한 結果 8日째에 튜머의 形成과 뿌리分化를 始作하여 3週間 持續하였고 튜머의 形成率은 10%였으며, electrophoration에 依한 opine分析을 實施하여 形質轉換 되었음을 確認하였다.

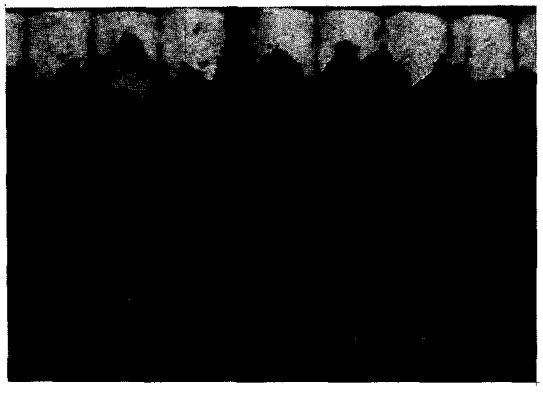

Fig. 1. Plantlet induction on MS media supplemented with IAA and Kinetin *in vitro* (mg/l).

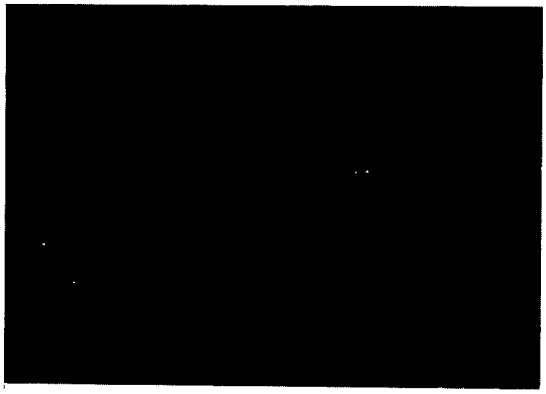

Fig. 2. Growth of Shoots and roots in different media *in vitro*.

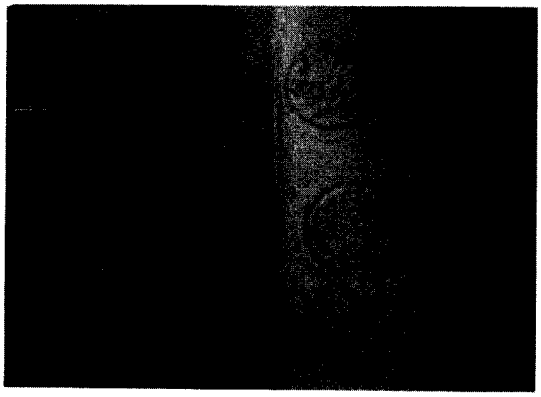

Fig. 5. Protoplast isolated from tissue.(a; mesophyll, b; root.) ×800

Fig. 3. Plantings growing vigorously after 2 months in the green house.

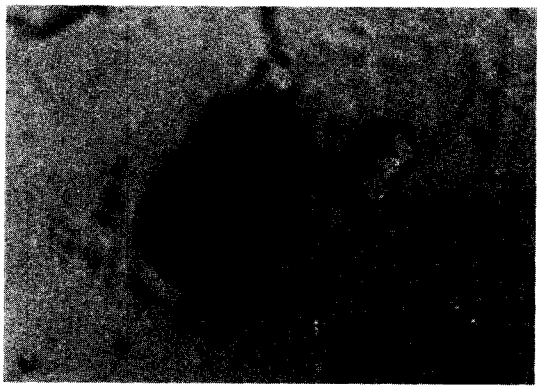

Fig. 6. Fusion between mesophyll cells. ×800

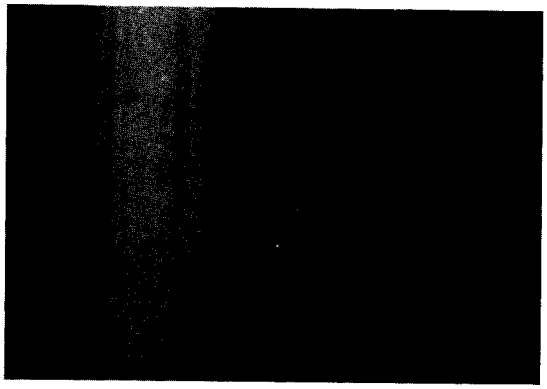

Fig. 4. Callus induced from leaf on MS containing IAA 1.0, Kinetin 2.0mg/l.

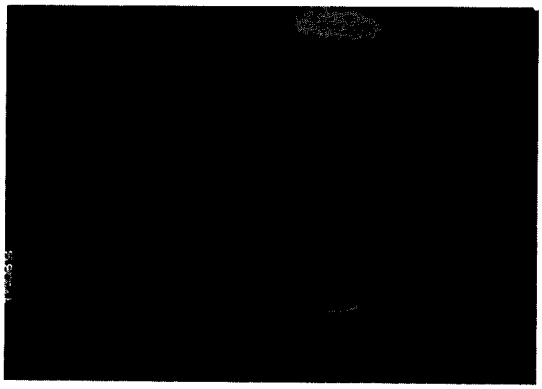

Fig. 7. Leaf co-cultured *A.tumefaciens* ATCC 11157 for 2 days.

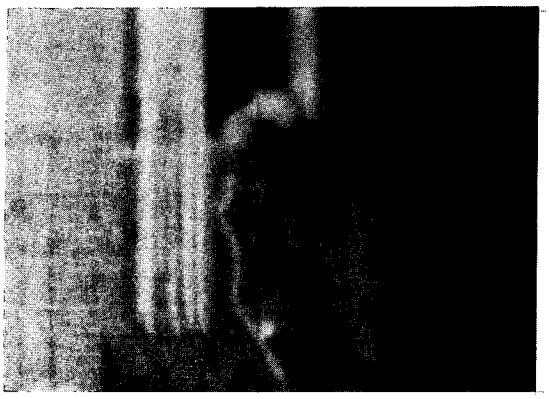

Fig. 8. Tumour tissue formed on the leaf vein by inoculation after 3 weeks.

引 用 文 獻

1. Ahuja, M.R. (1982) "Isolation, Culture and Fusion of Protoplasts; Problems and Prospects", *Silvae Genetica*, 31 : 2-3
2. Ahuja, M.R. (1984) "Protoplast Research in Woody Plants", *Silvae Genetica*, 33 : 32-36
3. Ahuja, M.R. (1984) "Protoplast Research in Woody Plants", *Silvae Genetica*, 33 : 1, 32-36
4. Akira, S. (1980) "Fusion of Protoplasts Isolated from Somatic Cells of Tree Species", *Bull. For. Prod. Res. Inst*, 309 : 7-12
5. Bhojwani, S.S., Power, J.B. and Cocking, E.C. (1976) *Isolation Culture and Division of Cotton Callus Protoplasts*, Elsevier/North-Holland Scientific Publishers, Ltd : 86-88
6. Bhojawani, S.S. and M.K. Razdan (1983) "Protoplast Isolation and Culture, *Plant Tissue Culture*, Pitman : Boston : 237-260
7. Binding, H. (1974) "Cell Cluster Formation by Leaf Protoplasts from Axenic Cultures of Haploid *Petunia hybrida* L.", *Plant Science Letter*, 2 : 185-188
8. Binding, H., Nehls, R., Schieder, O,. Sopory, S. K. and Wenzd, G. (1978) "Regeneration of Mesophyll Protoplasts Isolated from Dihaploid Clones of *Solanum tuberosum*", *Physiol Plant*, 43 : 52-54
9. Binding, H. (1980) "Regeneration of Haploid and Diploid Plants from Protoplasts of *Petunia hybrida* L.", *PMB Newsletter*, Vol. I : 77-94
10. Bonga, J.M., Durzan, D.J. (1982) *Tissue Culture in Forestry*, Junk Publishers : 232-244
11. Chyi, Y.S. (1987) "High Efficiency *Agrobacterium*-mediated Transformation of *Lycopersicon* based on Conditions favorable for Regeneration", *Plant Cell Reports*, 6 : 105-108
12. David, A., David, H. (1979) "Isolation and Callus Formation from Cotyledon Protoplasts of Pine (*Pinus pinaster*)", *Z.Pflanzenphysid.Bd.* P4. S. : 173-177
13. Davies, D.J. (1987) *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*, Martinus Nijhoff Publishers : 4-7
14. Gautheret, R.J. (1985) *History of Plant tissue and Cell Culture, A Personal Account in Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, I.K. Vasil (ed). Academic Press, Inc : 1-50
15. Gerd Krssmann (1985) *Cultivated Broadleaved Trees and Shrubs*, Timber Press, Vol : 259
16. Hain, R., Steinbib, H.H. and Schell, J. (1984) "Fusion of *Agrobacterium* and *E.coli* Spherplasts with *Nicotiana tabacum* protoplasts", *Plant Cell Reports*, 3 : 60-64
17. Hammerschlag, F.A. (1989) "*Agrobacterium*-mediated Transformation of Peach Cells Derived from Mature Plants that were propagated *in vitro*", *J.Amer.Soc.Hort.Sci.*, 114(3) : 508-510
18. Hayashi, M., Nakajima, T. (1984) "Genetic Stability in Regenerated Plants derived from Tobacco Mesophyll Protoplasts through Three-step Culture", *Japan J.Breed*, 34 : 409-415
19. Hchimiya, H., Ohgawara, T., Kobayashi, S., Ohgawara, E., Ishii, s. (1983) *Bioscience Research Laboratory, Kikkoman Corporation*, Nodashi Chiba 278, Japan : Akitsu Branch, Fruit Tree Research Station, Akitsu. Hiroshima 729-24. Japan.Institute of Biological Science,

University of Tsukuba, Sakura-mura, Ibaraki, Japan : 1-13

20. Hiroshi Kamada(1986) "Alkaloid Production by hairy root Cultures in *Atropa elladomna*", *Plant Cell Reports*, 5 : 239-242
21. Holbrook, L.A., Miki, B.L. (1985) "*Brassica* grown Gall Tumourigensis and *in vitro* of transformed Tissue", *Plant Cell Reports*, 4 : 329-332
22. Hurwitz, C.D., Agrios, G.N. (1984) "Isolation and Culture of Protoplasts from Apple Callus and Cell Suspension Cultures", *J.Amer.Co.Hort. Sc.*, 109(3) : 348-350
23. Imannishi, S., Sato, Y. (1987) "Plant regeneration from cotyledon Protoplasts of *Cycopersicon pinpinellifolium*", *Japan J.Breed.*, 37 : 199-202
24. John Draper, Roderick Scott (1988) *Plant Genetic Transformation and Gene Expression*, Black Scientic Publications : 3-5
25. Jorgensen, J., Binding, H. (1984) "Callus Regeneration with protoplasts of *Sorbus aucuparia* L.", *Z.pflanzenphysioL. Bd.* 113, S : 371-372
26. Karen, P.D., Susan, J.R. (1985) "Transformation of protoplast derived cell colonies and suspension culture by *A.tumefaciens*", *Plant Cell Reports*, 4 : 202-205
27. Kirby, E.G., Cheng, T. (1979) "Colony formation from protoplasts derived from Douglus Fir Cotyledons", *Plant Science Letters*, 14 : 155-156
28. Kobayashi, S, Uchimiya, H. and Tkeda, T. (1983) "Plant Regeneration from Trovita Orange protoplasts", *Japan J.Breed.*, 33(2) : 119-122
29. Koyama, M., Hose, I. Y. and Saito, A. (1988) "Isolation, Culture and Division of protoplast from Konara (*Quercus serrata*) Callus cultures", *J.Jpn.For.Soc.*, 70(5) : 1-36
30. Melchers, G., Sacristan, M.D. and Holder, A.A. (1978) "Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts", *Carlberg Res. Commun.*, 43 : 203-218
31. Merkle, S.A. and Sommer, H.E. (1987) "Regeneration of Yellow-poplar from protoplast culture", *19th Southern Forest Tree Improvement Conference College Station.* Taxas : 45-49
32. Murashige, T. (1974) "Plant propagation through tissue culture", Ann.Rev.Plant Physiol, 25 : 148
33. Nagata, T. and Takebe, I. (1970) "Cell Regeneration and Cell division in isolated Tabacco Mesophyll protoplasts", *21 Plant (Berl)*, Bd : 2
34. Nehls, R. (1978) "Isolation and Regeneration of protoplasts from *Solanum nigrum* L.", *Plant Science Letter*, 12 : 183-187
35. Nhzeki, M., Yutaka, H, Dano and Kenichi, saito (1983) "Callus Formation from Isolated protoplasts of APPLE, *Malus pumila* Mill", *Japan J. Breed.*, 33(4) : 369-374
36. Nirmalya Banerjee (1985) "A tissue culture technique for rapid Clonal propagation and storage under minimal growth condition of *Musa*", *Plant Cell Reports*, 4 : 351-354
37. Nishio, T., Sato, T., Kenji, T. (1987) "Efficient plant regeneration from hypocotyl protoplasts in eggplant (*Solanum melongene* L. and *Solanum insanum* L.)", *Jap.J.Breed.*, 37 : 389-396
38. Nobukazu Tanaka(1985) "Infection of turnip and radish storge roots with *Agrobacterium rhizogenes*", *Plant Cell Reports*, 4 : 74-77
39. Oka, S. and Ohyama, K. (1985) "Plant Regeneration from Leaf Mesophyll Protoplasts of *Broussoneria kazinoki* S.", *J.Plant Physiol*, 119 : 455-460
40. Rao, P.S. (1973) "Hormonal control of Differentiation of Shoots, Roots and embryos in leaf and stem culture of *Petunia inflata* and *Petunia hybrida*", *Physiol Plant*, 28 : 458-463
41. Russell, J.A. and Mccown, B.H. (1986) "Culture and Regeneration of *Populus* Leaf Protoplasts isolated from nonseedly Tissue", *Plant Science*, 46 : 133-142
42. Russell, J.A. and Mccown, B.H. (1988) "Re-

covery of Plants from Leaf Protoplasts of hybrid popular and aspen clones", *Plant Cell Reports*, : 59-62

43. Saito, A., Hosoi, Y., Ishii, K. and Sato, T. (1988) "Protoplast Isolation, Somatic Hybidization and Eye visible Colony Formation in Different *Populus* species", *Jap.For.*, 70(3) : 119-126
44. Sink, K.C. (1984) "Protoplast Fusion for plant improvement", *Hortscience*, Vol. 19(1) : 5-130
45. Sticklen, M.R., Linberger, R.D. and Donir, S.C. (1985) "Isolation and Culture of Protoplasts of *Ulmus*", *Plant Science*, 41 : 117-120
46. Tremblay, F.M., Power, J.B. and Lalonde, M. (1985) "Callus Regeneration from *Alnus incana* Protoplasts isolated From Cell Suspensions", *Plant Science*, 41 : 211-216
47. 加島功一 (1989)「木本植物의 增殖과 育種」, 農業圖書株式會社 : 187
48. 金圭元 外 4人(1989)「植物組織培養技術」, 鄕文社 : 27-28, 264-265
49. 金眞嬉, 朴權瑀(1988) "고추냉이의 器內培養時 器官分化에 미치는 NAA 및 BA의 效果",「韓園誌」, 29(4) : 272-282
50. 朴在仁, 朴敎秀(1988) "느티나무의 芽培養, Callus 培養, 原形質體 培養 및 形質轉換에 關한 生物工學的 基礎硏究",「東國大學敎 農林科學」, (88) : 33-35
51. 朴龍求, 申東源, 金貞姬(1990) "*Agrobac-terium tumefaciens*에 依한 양황철나무의 形質轉換要因",「韓林誌」, 79(3) : 278-284
52. 朴龍求, 孫聖鎬(1988) "현사시나무 器內培養 葉肉組織에서 分離된 原形質體 培養 및 植物體 再分化",「韓園誌」, 77(2) : 208-215
53. 安奬淳, 鄭淳柱, 高甲千, 朴錫勳(1986) "도라지와 더덕의 原形質體 裸出 및 培養에 관한 硏究",「韓園誌」, 27(3) : 205-212
54. 李淵台, 鄭元一(1983)「遺傳子工學」, 執文堂 : 361
55. 李載順, 李錫求, 張錫成, 李延周(1987) "*Populus nigra*의 Callus 由來原形質體로부터 植物體分化",「林育硏報」, 23 : 143-148
56. 張錫成, 李延周, 李載順, 李錫求(1987) "수원사시나무의 原形質體分離培養 및 融合",「林育硏報」, 23 : 137-142
57. 鄭載東 外 2人(1985) "*Petunia hybrida*의 葉肉組織으로부터 原形質體遊離 및 培養後 Callus 形成에 미치는 因子",「韓園誌」, 26(3) : 289-298
58. 鄭載東(1986) "觀賞用 토마토(*Lycopersicon esculentum X L.pinpine lifolium* c.v. Ting Tin)의 原形質體遊離와 培養",「韓園誌」, 27(3) : 298-303
59. 朱明七(1990)「*Lycium chinense*의 芽培養, Callus培養, 原形質體分離, 培養, 融合 및 形質轉換에 關한 硏究」, 東國大學校 大學院 博士學位論文 : 3-32
60. 竹內正幸中島哲夫古谷力(1984)「新植物組織培養」, 朝倉圖書 : 130
61. 崔相鎭(1989)「植物細胞培養」, 아카데미書籍 : 47
62. 韓昶烈(1984)「植物組織培養」, 日潮閣 : 221