

엽조직에서 나출된 원형질체의 재생 가능 세포판별

소인섭* · 유장걸

제주대학교 방사능 이용 연구소

Identification of Regenerable Cells in Mesophyll Protoplast Cultures

In-Sup SO* and Zang-Kual U.

Cheju Applied Radioisotope Research Institute Cheju National Univ. Cheju-do, 690-756. *Corresponding author.

This study was carried out to examine the difference in the cell vitality between mesophyll protoplast (MP) and paraveinal mesophyll protoplast (PVMP) of *Nicotiana tabacum* 'Xanti', *Petunia hybrida* 'Blue Star' and *Chrysanthemum morifolium* 'Baekkwang' by using urea permeability technique. The effects of various enzyme solutions and incubation time, NAA and thidiazuron on plant regeneration from isolated protoplasts were also investigated. The vibratome technique was used for protoplast isolation and urea permeability test because the fresh, living, thin tissue stripes (50 μ m of thickness) could be obtained with minimal damage with the vibratome. For the three plants examined, the urea permeability on the tested tissue stripes was relatively higher in PVMP than in MP by about $K_s = 2.0 \times 10^5$ cm/sec. The treatment of an enzyme mixture of 1.5% cellulase R-10, 1% Driselase, 0.5% Macerozyme R-10, and 0.5% Pectinase for 4 to 8 h was effective on the isolation of PVMP. The highest frequency of callus formation and plant regeneration from the isolated protoplasts was obtained with NAA 2 mg/L and thidiazuron 0.01 mg/L. Furthermore, the results demonstrated that cell division and plantlet regeneration was more frequent in the PVMP than in the MP of the same leaf or plant. We, therefore, conclude that PVM is an excellent experimental material for the callus formation and regeneration from isolated protoplasts.

Key word: *Chrysanthemum morifolium*, paraveinal mesophyll cell, *Petunia hybrida*, protoplast isolation, *Nicotiana tabacum*, urea permeability

신종 유용식물을 창출하기 위한 방법으로서 최근까지 크게 발전되어 왔던 것으로 이중속간식물의 원형질체 융합기술을 들 수 있으나 지금까지의 연구 결과들은 대부분 잡종 식물 생산 그 자체에만 역점을 두었고 조직, 세포특성 및 재생력이나 원형질체의 생리 등 세포 융합을 하기 위해 필수적으로 검토되어야 할 사항에 대한 연구는 미흡한 실정에 있다. 그 중에서도 대상 식물체를 구성하고 있는 개개의 조직들에 대한 재생력의 검토에 대하여는 오직 재료 식물체의 노약 정도(Horst, 1990) 혹은 각각의 실험대상 식물체

의 획득방법에 대한 재생력 검토에 약간의 성과를 얻는데 그치고 있다(Power et al., 1976, So et al., 1989). 일반적으로 작물의 원형질체를 나출하기 위하여 사용되는 재료인 엽조직을 효소 용액에 처리할 때에 엽맥과 같이 분해가 더딘 조직은 폐기되었다. 그러나 엽조직에서도 형성층으로서의 역할을 수행하는 세포층이 있다는 사실이 알려져 있으며 (Vincent et al., 1984), 특히 paraveinal 엽육 세포가 재생능력이 크다고 보고하고 있다(Lee-Stadelmann et al., 1989). 따라서 본 연구는 식물 엽조직에서 줄기조직 가까이에 분포

하고 있는 paraveinal mesophyll 세포의 재생능력을 조사하기 위하여 원형질체로부터 재생이 잘 된다고 알려진 담배, *Petunia*, *Chrysanthemum*을 식물재료로 하여 paraveinal 엽육세포와 일반 엽육세포를 분리하고 이들의 세포 활성 및 재생력을 비교함으로써 재생가능 세포군을 판별하였으며, 부가적으로 미세하고 균일한 두께의 세포층을 얻는데 있어 절단세포의 상해를 최소화할 수 있는 vibratome을 이용하여 이들 세포군들만을 집약적으로 생산해 낼 수 있는 방법을 확립하는데 목적을 두었다.

재료 및 방법

공시식물 재료 준비

공시 재료로서 담배(*Nicotiana tabacum* cv Xanti)와 *Petunia hybrida* cv Blue Star 종자를 10% NaClO-용액에서 10분간 살균하고 멸균수로 5회 세척한 후 MS 기본배지에 파종하여 4주간 재배한 유묘의 잎을 사용하였다. *Chrysanthemum morifolium* cv Baekkwang은 성장점 배양으로 얻어진 무균 상태의 유묘에서 엽장이 2 cm정도 발육된 것을 채취하여 재료로 사용하였으며 배양실의 조건은 일반 배양 조건에 준하도록 조정하였다.

Urea 투과성(permeability) 측정기술을 이용한 vitality 측정

식물잎을 가로 1cm×세로 2cm의 크기로 절단하고 infiltration하여 세포간극사이의 기포를 제거한 뒤 Lee-Stadelmann 등(1989)의 방법에 의해서 vibratome(Series 1000, American Scientific Product)으로 잎조직 절편이 100 μm되도록 수직 절단하면서 paraveinal 엽육세포층이 있는 엽맥주위와 엽맥이 거의 없는 조직편으로 나누어 취하였다(Fig. 1). 절단된 조직편은 0.3, 0.5, 0.7 M mannitol+CPW series 용액에 각각 10분씩 침적하여(So et al, 1991) 원형질을 분리시켰다. 그런 다음 조직편을 perfusion chamber에 넣고 0.7 M urea 용액을 흘려보내면서 10분 간격으로 원형질 복구정도를 micrometer가 부착된 현미경하에서 측정하였고 Stadelmann(1966)의 공식에 의거하여 Ks값을 구하였다. 한편, 원형질 복구정도를 측정할 때에는 한번에 3개의 세포를 관찰하였으며 5회 반복의 평균치를 얻어 도표로 나타내었다.

원형질체 나출과 배양

Figure 1과 같이 100 μm 두께로 수직절단된 엽육조직과

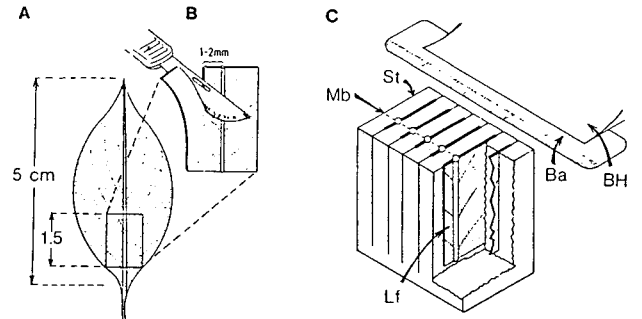


Figure 1. Procedures for microsectioning using a vibratome (A) Leaf segments (1.5×1.0 cm) from the basal portion of the leaf, 1cm above the petiole attachment point with the lamina; (B) on both sides of the midvein removed except for 1-2 mm remnant; (C) leaf segments placed into incisions of the styrofoam block (2×2 mm), with the alignment of the midveins (Mb) in the center of the block. In order to obtain longitudinal tissue stripes insert leaf tissue into the styrofoam horizontally. Lf, leaf segments; St, styrofoam block; Mb, midvein; Bh, blade holder; Ba, lade.

paraveinal 엽육 조직편을 각각 1 g씩 얻은 뒤 0.3, 0.5, 0.7 M mannitol 용액에 차례로 10분씩 침적한 후 담배는 A 효소용액(Horst, 1990), *Chrysanthemum*는 B효소용액(Watts, 1974) 그리고 *Petunia*는 C효소용액(Hayward and Power, 1975)을 기본으로 하여 이를 약간 변형처리 한 후 2 종류의 조직 절편에 대한 적정 나출 시간과 원형질체 나출 수율을 관찰하였다(Table 1). 각 효소 용액에 처리한 실험구는 10 회 반복으로 하여 30°C의 상온에서 암조건으로 교반(60 rpm) 하였으며 매시간 효소처리에 대한 나출 정도를 관찰하였는데 이상의 처리는 모두 무균 재료를 사용하여 무균 조건하에서 실행하였다.

나출된 원형질체는 80 μm nylon mesh에서 거른 뒤 10 ml의 mannitol buffer medium [0.4 M mannitol+2 mM

Table 1. Enzyme mixtures for protoplast isolation from *Nicotiana tabacum* 'xanti', *Chrysanthemum morifolium* 'Baekkwang' and *Petunia hybrida* 'Blue Star'

Enzyme	Mixture(%:w/v)		
	A	B	C(%)
Cellulase R-10	1.5	1.0	1.5
Driselase	1.0	0.25	
Rhozyme		0.25	
Macerozyme R-10	0.5	0.8	
Pectolyase Y-23 in	0.05	0.01	0.05
13%(w/v) mannitol			

CaCl₂ + 0.1 % (w/m) bovine serum albumin (BSA) + 5 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane-sulfonic acid (HEPES)-KOH (pH 7.0)]으로 2회 세척하였다. 특히 paraveinal mesophyll 조직에서 원형질체를 나출시킬 경우 paraveinal mesophyll protoplast(이하 PVMP)이외에도 mesophyll protoplast(이하 MP)가 다소 혼입되어 있기 때문에 이를 제거하기 위해 Vincent(1984)의 방법을 이용하였다

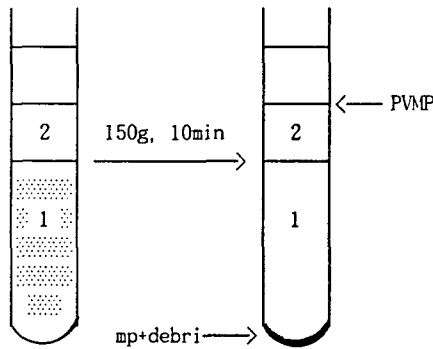


Figure 2. Schematic illustration of step gradient for purification of *Tobacco* PVMP. Steps consisted of (1) a mixture of 1.5 ml crude PVMP suspension in mannitol-buffer medium (containing 0.4 M mannitol, 2 mM CaCl₂, 0.1% BSA and 5 mM HEPES-KOH, pH 7.0). (2) 0.5 ml of a mixture of 1.5 parts mannitol-buffer medium and 2.5 parts sucrose-buffer medium. and (3) 0.5 ml mannitol-NaCl-buffer medium (containing 0.15 M mannitol, 75 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 0.1% BSA, and 100 mM HEPES-KOH, pH 7.0). After centrifugation at 150 xg for 10 min. PVMP bander at the upper interface while MP and cellular debris pelleted.

(Fig. 2). 즉, 원형질체를 4 ml의 0.4 M sucrose, 2 mM CaCl₂, 0.1% BSA, 5 mM HEPES-KOH (pH 7.0), 13% (w/v) Dextran T 35-50 (Sigma) 용액에 현탁시키고 그위에 상기 현탁용액 조성중에 Dextran만 9.1%로 조절된 용액 2 ml과 1 ml의 mannitol-buffer medium을 차례로 가하고 5분간 원심 분리(300xg)한 후 sucrose-dextran층과 mannitol 완충액층 사이에서 순수한 MP를 얻었다. 그후 haemocytometer (1 mm×1 mm×1 mm; L×D XH, America Optical, U.S.A)를 이용하여 나출된 원형질체의 밀도를 측정하였으며 원형질체 배양밀도는 모든 처리에서 모두 1.5×10⁴/ml로 조절하였다.

한편, 사용한 배양배지는 0.6% Difco agar를 첨가한 MS고체배지였으며, 성장조절물질의 농도를 적정화시키기 위하여 auxin으로는 NAA를 0-2.0 mg/L 수준으로 그리고 cytokinin으로는 thidiazuron을 0-0.01 mg/L 수준으로 단용 혹은 혼용 처리하였다. 또한 관찰되는 callus나 유식물체는 필요에 따라 계대 배양하였다.

결과 및 고찰

일반적으로 urea 투과성 측정이 세포의 활성을 검정하는데 가장 정확한 방법으로 알려져 있다(Larkin, 1976). 이와 같은 측정은 vibratome의 존재로 가능하게 되며 조직의 두께도 최소 50 μm까지 절단할 수 있으므로 다양한 환경요건이나 물질 처리 후에도 살아있는 세포를 관찰할 수 있기 때문에 (So et al., 1989) 앞으로 이에 대한 적용시험을 기대할 수 있다.

Figure 3에서 보는 바와 같이 담배, *Chrysanthemum*, 그리

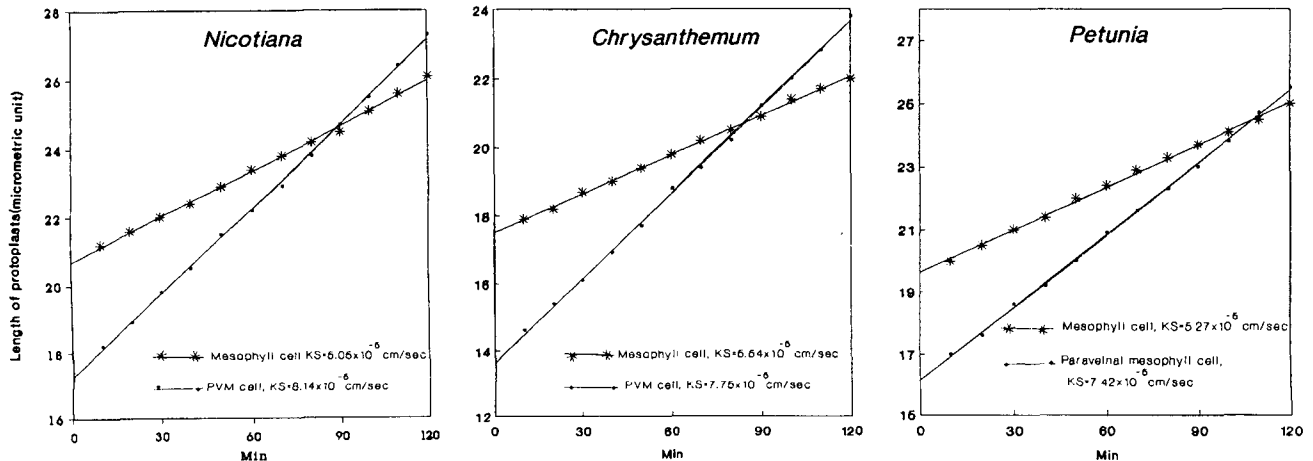


Figure 3. Time course of sample graph for urea permeability in mesophyll and paraveinal mesophyll cell of *Nicotiana tabacum* 'Xanti', *Chrysanthemum morifolium* 'Baekwang' and *Petunia hybrida* 'Blue Star'.

Table 2. Enzyme mixtures and incubation times for protoplast isolation from *Nicotiana tabaccum* 'Xanti', *Chrysanthemum morifolium* 'Baekwang' and *Petunia hybrida* 'Blue Star'

Plant material	Mixture		
	A	B	C
Suitable for tobacco leaf mesophyll tissue		+++	
Suitable for tobacco leaf PVM ^{a)}	+++		
<i>Chrysanthemum</i> leaf mesophyll			+++
<i>Chrysanthemum</i> leaf PVM	+++		
<i>Petunia</i> leaf mesophyll			+++
<i>Petunia</i> leaf PVM	+++	+++	
Incubation time(h)	4-8	2-4	3-6

^{a)} Paraveinal mesophyll tissues were sectioned to 100 μm thickness with the vibratome. Plus sign indicates the best result for protoplast isolation.

고 *Petunia*의 엽육세포와 paraveinal 엽육세포간의 urea 투과성을 비교할 때 공시한 식물 모두 엽육세포보다 paraveinal 엽육세포에서 Ks 값이 더 높은 것으로 나타났다. 동일한 엽조직내에서도 분화의 정도에 따라 수분의 투과성이나 원형질체를 구성하는 세포질이 다르다는 사실이 알려져 있으며 (Stadelmann, 1966), 특히 같은 몸체를 구성하는 세포들간에도 투과성이 상대적으로 높다는 것은 비정상적인 상황에서도 세포 분열 능력이나 생존을 위한 자율 반응이 강하여 각각 다른 competence를 갖고 있음을 나타낸다(Lee-Stadelmann et al., 1989). 또한 So와 Lee(unpublished)의 경험

으로 보아 4종의 populus 교잡종을 조직배양하게 되면 개체 발생이 용이한 종일수록 urea 투과성이 높다는 사실과 엽조직을 cross-section하여 neutral red로 염색한 후의 관찰에서도 주엽맥 양측 즉 paraveinal 엽육조직에서 초기 분열이 시작된다는 사실은 위의 결과와 일치하고 있다.

Table 2는 각종 효소용액에 대한 식물 조직의 원형질체 나출 정도와 적정 소요 시간에 대한 결과를 나타낸 것이다. 담배, *Chrysanthemum*, *Petunia*에서 PVM의 경우에는 A용액에서 좋은 나출 성적을 보이고 있으며 나출에 소요된 시간은 4-8시간이었다. 한편, 담배의 MP와 *Chrysanthemum*, *Petunia* MP의 경우에는 B와 C효소용액이 적당했으며 나출에 소요된 시간도 2-6시간이었다. 원형질체 나출을 위한 각종 효소제의 적용과 조합에 대하여는 많은 연구자들이 서로 다른 결과들을 보고하고 있는데, Watt 등(1974)은 담배의 엽조직에서 안정된 원형질체를 얻기 위하여는 효소의 종류보다 오히려 재료 식물의 활성도가 중요하며 1%의 Meicelase만으로도 2시간 내에 양질의 원형질체를 생산할 수 있다고 하였다. *Petunia*의 경우에도 Ford-Logan과 Sink (1988)는 원형질체 융합을 위한 재료로서 엽조직 이용의 우수성을 강조하고 0.5%의 Macerozyme과 3%의 Cellulase Onozuka R-10과 같은 효소 조합이 유효했으며 분리에 소요되는 시간은 2-5시간 이라고 하였다. *Chrysanthemum*의 경우에 나출 원형질체로부터 식물체의 재생은 아직까지 성공 사례가 없지만 1%의 Macerozyme과 3%의 Cellulase의 조합이 유효하며 특히 0.1 mM의 CaCl₂의 첨가로 좋은 결과를 얻을 수 있었다고 하였다(Horst, 1990).

Table 3. Callus formation and plant regeneration from different combination of plant growth regulators in *Nicotiana tabaccum* 'Xanti', *Chrysanthemum morifolium* 'Baekwang' and *Petunia hybrida* 'Blue Star'.

Growth regulator(mg/L)		Callus formation(%)						Plant regeneration(%)					
		Paraveinal mesophyll			Mesophyll			Paraveinal mesophyll			Mesophyll		
		N ^{a)}	C ^{b)}	P ^{c)}	N	C	P	N	C	P	N	C	P
0	0.005	0	0-20	0-10	0	0	0	0-10	0	0-10	0-10	0	0
	0.010	10-30	0-30	0-30	0	0	0	10-30	0	0-20	0-10	0	0
0.5	0	20-40	20-40	30-50	0-10	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.005	20-60	40-60	0-20	10-20	0-10	0-20	20-40	0	0-10	0-10	0	0-5
	0.010	20-60	40-60	10-30	20-40	0-10	0-20	20-40	0-20	0-30	0-20	0	0
2.0	0	60-70	20-40	40-60	0	0	10-30	0	0	0-10	0	0	0
	0.005	60-85	30-50	60-80	10-30	0	20-40	30-60	0-10	10-30	0-10	0	0-20
	0.010	60-100	50-80	60-80	10-30	0-20	20-40	40-70	10-30	10-50	0-20	0	0-20

^{a)}*Nicotiana tabaccum* 'Xanti', ^{b)}*Chrysanthemum morifolium* 'Baekwang', ^{c)}*Petunia hybrida* 'Blue Star'

Each value is the mean frequency of 10 replicates.

Protoplast density in petri dish was about 1.5×10⁴ protoplast/mL.

일반적으로 MP의 경우 Driselase와 Rhozyme이 부가적으로 사용되어 높은 수율의 원형질체를 생산할 수 있다는 사실을 확인할 수 있는데, 이러한 결과는 Frearson 등(1973)과 Potrykus와 Durand(1972)의 실험에서와 일치한다. 특히 주엽맥 주위에 존재하는 PM의 경우에는 타세포와 비교하여 pectin질의 발달이 많기 때문에 (Handro et al., 1973) 오히려 많은 종류의 pectinase 사용이 요망된다.

담배의 엽육세포에서 분리된 MP와 PVMP간의 캘러스 유기와 식물체 재생력을 비교해 보면 일반적으로 MP에서 보다 PVMP에서 양호한 결과를 나타내고 있는데 특히 MP에서는 30%정도였던 캘러스 발생률이 PVMP에서는 거의 100%까지 도달하며 식물체의 재생률도 MP보다 약 4배(40-70%) 높게 나타났다. 이러한 현상은 cytokinin의 일종인 thidiazuron을(0.01 mg/L) NAA(2.0 mg/L)와 혼용처리할 때 캘러스의 유기와 식물체 재생력에 월등한 효과를 가지는 것으로 나타났다.

*Chrysanthemum*의 경우에도 담배와 마찬가지로 캘러스 유기는 되지만 식물체의 재생률은 빈약하게 나타났고 캘러스 유기율도 MP 20%보다 PVMP에서 50-80%가량으로 높았으며 2 mg/L NAA와 0.01 mg/L thidiazuron 처리구에서 좋았다(Table 3). 식물체 재생률에 대한 관찰은 현미경 검경을 통한 확인은 하지 못하였으나 이전의 BA 처리구에서 볼 수 없었던 연록색의 단단한 캘러스가 형성되었고 체세포배와 유사한 미세 돌기가 형성된 것을 체세포배의 원기로 보고 10-30%의 식물체 재생률로 수치화한 것이지만 앞으로 thidiazuron의 농도를 증가시키에 따라 식물체 재생률이 높아지지 않을까 사료된다. Horst(1990)와 Langhan 등(1977)은 바이러스 무병 개체의 생산으로서 *Chrysanthemum*의 원형질체 배양은 추천될 일이지만 재생력이 빈약하여 실용적이지 못하다고 하였는데 본 연구의 결과를 고찰해 볼 때 PVMP를 대상으로한 thidiazuron의 처리 효과에 대한 폭넓은 연구가 이루어진다면 결코 전망이 없다고는 볼 수 없겠다.

*Petunia*의 경우에도 MP보다는 PVMP에서 월등한 캘러스유기와 식물체 재생률을 보이고 있고 캘러스 발생과 식물체 재생률의 경우도 0.01 mg/L thidiazuron과 2.0 mg/L NAA 처리구에서 가장 좋은 결과를 보인다(Fig. 4). Hayward와 Power(1975) 그리고 Power 등(1976)은 *Petunia*속 식물들의 신품종육성을 위한 원형질체 융합에서 엽조직으로부터 나출 원형질체를 획득할 수 있고 고농도의 auxin류 존재하에서 캘러스 유기로부터 cytokinin의 첨가에 의한 식물체 발생에 관하여 보고한 바 있다. 일반적으로 *Petunia*의 엽조직을 재료로한 원형질체로부터 식물체 재생에 대해서는 여러가지 생장조절제의 조합에 대한 많은 보고가 있지만 특히 coconut milk가 첨가되었을 때 캘러스의 유기와 식물체 재생이 잘 되었다고 하였다(Binding and Nehls, 1977). 본 실험

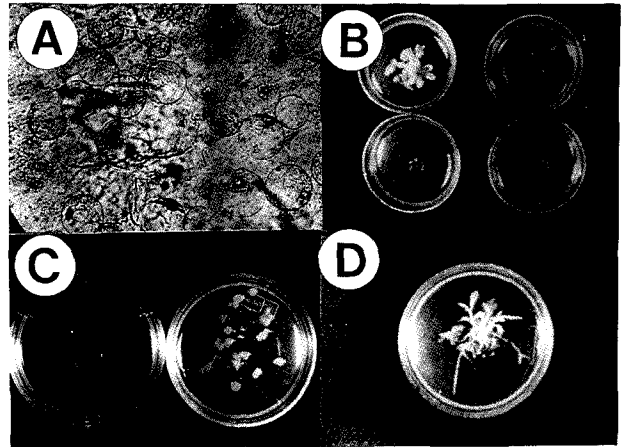


Figure 4. Typical paraveinal mesophyll protoplasts from *Petunia* (A), various developmental stage from Tobacco paraveinal mesophyll protoplasts(B), comparison of mesophyll of protoplasts (leaf of C) and paraveinal mesophyll protoplasts(right of C), plantlet formation of *Petunia* after 3 months in culture(D).

험에서와 같이 신품 cytokinin인 thidiazuron의 처리 효과가 우수하다는 사실은 재생이 어려웠던 식물에 다양한 처리 실험이 수행되어야 하겠으며 *Chrysanthemum*의 경우에도 thidiazuron의 농도 증가에 따른 반응 역시 검토해 보아야 할 것이다. 또한 공시한 3종의 식물에서 모두 PVMP가 MP보다 캘러스 유거나 식물체 재생률이 높다고 하는 사실(Table 3)은 urea 투과성 측정 결과와 일치하고 있다. 현미경적인 검경에서도 투명도나 윤곽도가 높든지, 세포질의 내용물 중에서 엽록체의 양이 전체의 20% 미만 정도 밖에 함유하고 있지 않든지 FDA나 neutral red 같은 생체 염색에서 나타나는 높은 세포활성도가 이와 같은 사실을 증명한다고 할 수 있다(Palta and Stadelmann, 1978). Vincent 등(1984)은 대두의 잎에서 얻어진 MP와 PVMP세포를 비교하는 과정에서 MP는 광합성에서 탄소대사과정에 주력하는 세포이고 PVMP는 질소 대사나 MP에서 합성된 동화물질의 임시 저장고와 같은 역할을 한다고 한 바, PVM 세포는 연결 부위로서 MP와 주엽맥간의 연결 역할은 물론이고 비상시에는 높은 재생력을 갖는 세포임을 짐작할 수 있다.

이와같은 실험 결과를 종합해 볼 때 엽조직을 재료로 하는 원형질체 나출과 재생에 관한 연구에 있어서는 수확되는 원형질체의 수율이 높다는 사실만으로 최종의 결과가 좋다는 막연한 사실보다 본 연구 결과에서 밝혀진 바와 같이 재생 가능성이 높은 세포군이 PVMP라는 사실에 입각하여 종래에는 잔사로 취급되어 미처 분리도 되기전에 폐기되던 주엽맥 주변 조직을 vibratome으로 집약분리해서 사용하면 재생가능 원형질체만을 배양하게 되며 아울러 식

물체의 재생효과도 높일 수 있을 것으로 사료되는 바이다. 또한 이러한 연구가 식물조직을 종적 혹은 횡적으로 생체 절단할 수 있는 vibratome 절단기술에 의하여 가능하게 되었다는 사실을 감안할 때 앞으로 vibratome의 폭넓은 이용성 역시 기대 된다.

적 요

Nicotiana tabacum 'xanti', *Petunia hybrida 'Blue Star'* 그리고 *Chrysanthemum morifolium 'Baekwang'*을 공시하여 엽조직 유래의 mesophyll protoplast(MP)와 paraveinal mesophyll protoplasts(PVMP)간의 세포 활성을 조사하기 위하여 urea 투과성을 측정하였다. 아울러 엽육 조직에서 원형질체 나출을 위한 각종 효소제를 처리하고 경과 시간별로 관찰했으며, 나출 원형질체로부터 식물체 재생을 위한 NAA와 thidiazuron의 효과를 조사하였다. Vibratome을 이용한 엽육조직 절단방법은 엽조직의 상해를 최소화하고 조직 절편도 최소 50 μm 까지 절단할 수 있기 때문에 urea 투과성 검정과 원형질체 나출을 위한 필수적인 기술이다. 세포 활성에 대한 urea 투과성 측정은 공시한 3종 식물의 PVMP에서 모두 $K_s=2.0 \times 10^{-5} \text{cm/sec}$ 정도가 MP보다 높았다. 효소혼합 용액(1.5% Cellulase R-10, 1% Driselase, 0.5% Macerozyme R-10, 0.05% Pectolyase)을 4-8 시간 처리하는 것이 PVMP의 나출에 유효하였다. 나출 원형체로부터의 캘러스 유기와 식물체 재생에는 2 mg/L NAA + 0.01 mg/L thidiazuron 처리구에서 가장 양호하였으며 조직별로는 PVMP에서 월등한 결과를 나타내었다. 따라서 엽조직을 대상으로한 원형질체 배양에 있어서 엽록소의 함량이 많은 MP보다는 재생력이나 세포 활성이 강한 paraveinal 엽육조직 유래의 세포를 집약적으로 나출시켜 실험재료로 이용한다면 더 높은 식물체 재생률을 얻을 수 있을 것으로 사료 된다.

사 사

본 논문은 1990년 교육부 학술연구조성비(유전공학)에 의하여 수행된 연구 결과임.

인 용 문 헌

- Binding H, Nehls R (1977) Regeneration of isolated protoplasts to plants in *Solanum dulcamara* L. Z Pflanzenphysiologie 85 : 279-282
- Ford-Logan J, Sink KC (1988) Plantlet regeneration from protoplasts of *Petunia alpicola*. HortScience 23 : 393-395
- Frearson EM, Power JB, Cocking EC (1973) The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. Dev Biol 33 : 130-137
- Handro W, Rav PS, Harada H (1973) A historical study of the development buds, roots, and embryo in organ cultures of *Petunia inflata*. R. Fries. Ann Bot 37 : 817-821
- Hayward C, Power JB (1975) Plant production from leaf protoplasts of *Petunia parodii*. Plant Sci Lett 4 : 407-410
- Horst RK (1990) *Chrysanthemum*. In PV Amirato, DA Evans, WR Sharp, Y Yamada, eds, Handbook of Plant Cell Culture. McGraw-Hill, Inc. U.S.A. pp 319-336
- Langhans RW, Horst RK, Earle ED (1977) Disease free plants via tissue culture propagation. HortScience 12 : 149-150
- Larkin PJ, (1976) Purification and viability determinations of plant Protoplasts. Planta(Berl.) 128 : 213-216
- Lee-Stadelman OY, Lee SW, Hackett WP, Reed PE (1989) The formation of adventitious buds in vitro micro-cross section of hybrid *populus* leaf midveins. Plant Sci 61 : 263-272
- Palta JP, Levitt J, Stadelman Ed J (1978) Plant viability assay. Cryobiology 15 : 249-255
- Potrykus I, Durand J (1972) Callus formation from single protoplasts of *Petunia*. Nature New Biol 237-287
- Power JB, Frearson EM, George D, Evans PK, Berry SF, Hayward C, Cocking EC (1976) The isolation, culture and regeneration of leaf protoplasts in the genus *Petunia*. Plant Sci Lett 7 : 51-55
- So IS, Chung IS, Lee-Stadelman OY (1989) Re-evaluation of FDA as a vital staining for plant cells. Suptrop Agric Cheju Nat Univ 6 : 49-58
- So Is, Oh SK, U ZK (1991) Improving vitality of protoplast isolated from *Soybean (Glycine max L.)* leaf. Korean J Plant Tissue Culture 18 : 255-261
- Stadelman Ed J (1966) Evaluation of turgidity, plasmolysis, and deplasmolysis of plant cells, In DM Prescott, eds, Methods in cell physiology. Vol 2. New York, Academic Press, 143-216
- Vincent RE, Maurice SB, Ku, Wittenbach VA (1984) Isolation of mesophyll and paraveinal mesophyll protoplasts from Soybean leaves. Plant Sci Lett 36 : 181-186
- Watts JW, Motoyoshi E, King JM (1974) Problems associated the production of stable protoplasts of cells of tobacco mesophyll. Ann Bot 38 : 667-671

(1993년 12월 22일 접수)