
碩士學位論文

細胞融合에 의한 *Brassica oleracea* var. *acephala*와
*B. juncea*의 Heterokaryon의 誘導에 關한 研究

濟州大學校 大學院

農 學 科



1988年 12月

SELECTION OF HETEROKARYON OF *Brassica*
oleracea var. *acephala* AND *B. juncea* BY
PROTOPLAST FUSION

Byong-Kwon, Oh
(Supervised by Professor Hal-Lim, Kim)

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

DEPARTMENT OF AGRONOMY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1988. 12.

細胞融合에 의한 *Brassica oleracea* var. *acephala*와
*B. juncea*의 Heterokaryon의 誘導에 關한 研究

指導教授 金 翰 琳

吳 柄 權

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함.

1988年 12月 日

 제주대학교 중앙도서관
吳柄權의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____

委 員 _____

委 員 _____

濟州大學校 大學院

1988年 12月 日

目 次

Summary	1
I. 緒 論	2
II. 研 究 史	3
III. 材 料 및 方 法	5
IV. 結 果	10
V. 考 察	21
摘 要	24
參 考 文 獻	25
寫 眞	28



Summary

This study was conducted to produce heterokaryon of protoplasts in *Brassica oleracea* var. *acephala* and *B. juncea* fused by PEG(M. W. 6,000) and dextran. Calli exhibiting vigorous growth were selected from the PEG(M. W. 6,000) and dextran treated protoplasts and plantlets were regenerated from after about 3 months of culture.

To identify heterokaryon(interspecific hybrid) was conducted by counting indicated chromosome number of root of heterokaryon plantlet.

The results of obtained were summarized as follows;

The most healthy protoplasts could be obtained when *Brassica oleracea* var. *acephala* was treated with emzymes containing pectolyase Y-23 0.5% and cellulase 0.5%, and *B. juncea* was treated with enzymes containing macerosin R 1.0% and cellulase 2.0%.

Fusion frequency was high in each of 25% PEG(M. W. 6,000) and in 0.2N NaOH of dextran, however, their combined effect was not greater then as it was expected.

First cell division was obtained after cultering the protoplasts in liquid modified MS medium supplemented with 2,4-D 0.2mg/l, NAA 0.3mg/l, mannitol 0.1M and glucose 0.4M.

First cell division was observed 3 days after plating and sustained to produce cell colonies after another 19 days. When microcalli 5 weeks after plating were transferred to MS medium with 2,4-D 1.0mg/l, NAA 0.3mg/l.

Multiple shoots were induced on MS medium supplemented with NAA 0.1mg/l, BA 1.0mg/l.

I. 緒 論

Brassica 屬植物은 地中海沿岸이 原產地인 大部分 一年生植物이나, *B. oleracea* var. *acephala*는 直根을 形成하여 越冬을 하는 多年生 特性을 갖고 있다.

Brassica oleracea var. *acephala*는 Brassica屬栽培種의 Genome分析圖에서 Group III (cc, n=9)에 속하며, Vitamin - C와 Amino acid系 成分을 多量 含有하고 있어 綠汁用으로 많이 利用되고 있으며, *B. juncea*는 Group IV (aabb; *B. compestris* (aa) × *B. nigra* (bb), n=18)에 속하고, Myrosin 등을 含有하고 있어서 香辛料로 使用되고 있다.

그러나, Brassica屬은 屬間交雜이 어려워, 이에 遺傳工學技法인 細胞融合을 利用, 屬間의 形質導入을 誘導하여 Heterokaryon(2n=54)을 育成하고자 本 實驗을 遂行하였다.



II. 研究史

細胞融合에 의한 Heterokaryon의 形成은 種·屬間의 不穩이나 交雜不和合成을 克服할 수 있는 새로운 育種方法으로 擡頭되고 있다.

植物 原形質體의 融合은 Coking(1960)이 Tomato의 뿌리를 酵素的으로 分離하는데 成功하면서 發達하기 시작했다.

Küster(1909)는 양파의 表皮를 高張液에 넣어 原形質 分離를 誘導한 후 低張液으로 옮겨 融合되는 現象을 觀察하였다.

Power(1970)는 各種 鹽을 利用한 融合實驗을 遂行하여 Sodium nitrate가 融合에 効果의임을 報告하였으며, Kao, Michayluk et. al., Wallin(1974) 등은 Polyethylene glycol(PEG)이 原形質體의 吸着과 融合에 比較的 높은 頻度를 보인다고 했다.

한편, Nagata(1978)는 Polyvinylacohol(PVA)이 PEG와 同等한 融合率을 보인다고 했는데, 融合을 誘起하는데 가장 効果的인 組成은 15% PVA(M. W. 500), 0.05M CaCl₂, 0.3M Mannitol이라 報告하고 있다.

Kameya(1975, 1979)는 高分子量의 Dextran Sulfate와 Dextran에 多量의 無機鹽을 加한 溶液으로 原形質體를 凝集시킨 후, 鹽溶液으로 稀釋시켜 融合이 일어남을 觀察했는데, Dextran Sulfate는 原形質體에 毒性作用을 보인다고 했다.

Senda(1979), Zimmermann 및 Scheurich(1980) 등은 電氣刺激에 의해 多量의 原形質體를 同時에 融合할 수 있다고 報告하였다.

Brassica屬植物은 1970年代初까지는 原形質體로부터 Callus와 根 分化만 되었는데, Tomas et. al. (1976)이 *B. napus*의 原形質體에서 植物體의 再分化에 成功하였고, Xu et. al. (1982), Lu et. al. (1982)에 의해 *B. oleracea*의 原形質體로부터 植物體 誘導가 報告되었다.

한편, Brassica 屬間의 Heterokaryon의 誘起는 Gleba와 Hoffmann(1978)에 의해, *B. campestris*와 *Arabidopsis thaliana*間의 融合에 의한 Heterokaryon(Arabido - bra

-ssica) 및 Schenck et. al. (1982)이 *B. oleracea* (cc, $2n=18$)와 *B. campestris* (aa, $2n=20$)의 融合體인 *B. napus*의 (aacc, $2n=38$)의 誘導 등이 報告되고 있다. 그리고, Lee et. al. (1986)은 *B. napus*와 *B. juncea*의 原形質體 融合으로 Colony의 形成을 誘導해냈다.



Ⅲ. 材料 및 方法

1. 實驗材料

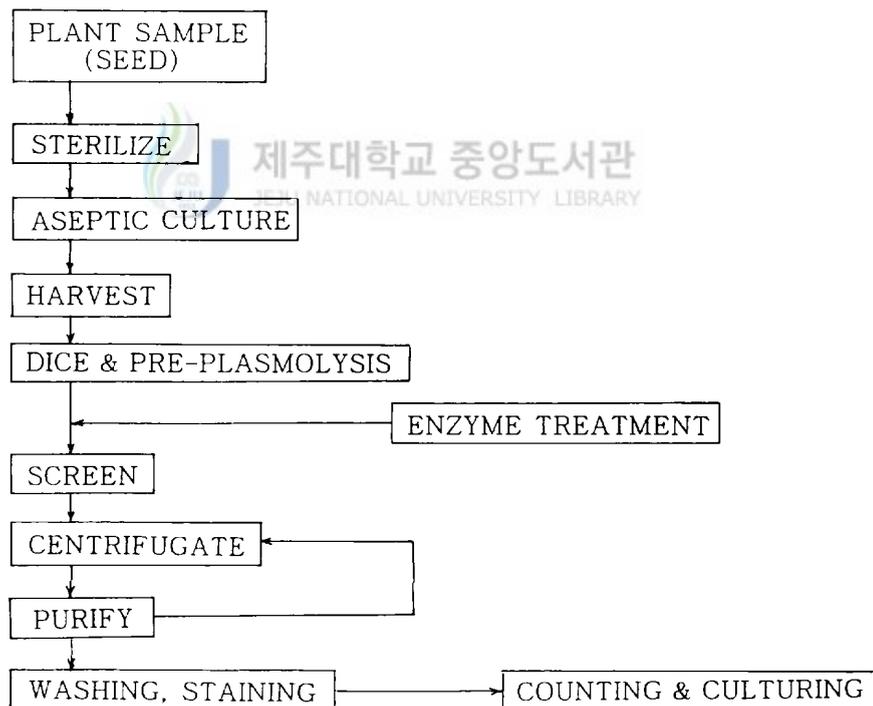
*Brassica oleracea var. acephala*는 市中에서 種子를 購入한 것을, 그리고 *B. juncea*는 濟州大學校 農科大學 附屬農場에서 採種한 것을 選種하여 實驗하였다.

原形質體 分離에 使用한 酵素는 Fluka AG에서 Cellulase를, 그리고 Pectolyase Y-23은 Seishin Pharmaceutical Co.에서, Macerosin R은 Kyowa Chemical Products Co.에서 購入하여 4℃ 暗所에 保管하며 使用했다.

原形質體 融合劑인 Polyethylene Glycol(PEG; M. W. 6, 000)과 Dextran은 Fluka AG에서 購入하여 使用하였다.

2. 原形質體의 分離

PROTOPLAST ISOLATION



Brassica oleracea var. *acephala* 와 *B. juncea* 種子를 70% Ethanol로 30秒間 表面殺菌한 후, 5% Sodium hypochlorite에 20分間 處理하고 滅菌水로 3~4회 씻고 250ml Flask에 5粒씩 播種 하였다. 이때 使用한 培地는 Hormone을 加하지 않은 표 1의 Murashige and Skoog's Medium을 썼다.

葉이 각각 2~3cm 자란 후, 메스로 葉을 1~2mm로 잘게 잘라 0.55M의 Mannitol溶液

Table 1. Composition of the culture media of MS* and modified MS

MS : Murashige and Skoog's medium (mg/l)

	MS Medium	Modified MS Medium
Inorganic salts		
NH ₄ NO ₃	1.650.	200.
KNO ₃	1.900.	950.
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370.	185.
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3	11.15
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6	4.3
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	0.0125
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440.	220.
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	0.0125
KI	0.83	0.415
KH ₂ PO ₄	170.	85.
H ₃ BO ₃	6.2	3.1
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	0.125
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	13.9
Na ₂ · EDTA	37.3	18.65
Organic compounds		
Thiamine HCl	0.1	0.05
Nicotinic acid	0.5	0.25
Pyridoxine HCl	0.5	0.25
myo-Inositol	100.0	50.0
Glycine	2.0	1.0
Sucrose	3%	1%
Agar	0.8%	
Mannitol		0.55 M
pH	5.7 - 5.8	5.7

에서 1時間동안 Plasmolyzing시킨후, 原形質體를 分離하기 위해 酵素를, *B. oleracea* var. *acephala* 에는 Pectolyase Y - 23과 Cellulase를, 그리고 *B. juncea* 에는 Macerosin R과 Cellulase를 混用하였는데, 原形質體의 分離에 알맞는 酵素 濃度를 調査하기 위해 表 2, 3과 같이 處理하였다. 이때의 酵素의 稀釋은 表 4의 Protoplast 洗滌液에 하였다.

酵素處理를 한 다음, 100×g에서 2分間 遠心分離하고 Protoplast 洗滌液으로 洗滌, 反復 遠心分離하면서 Pelletting 시켰다.

Table 2. Composition of enzyme concentrations for protoplast isolation from mesophyll of *B. oleracea* var. *acephala*

Enzyme concentration(%)	Cellulase(C)		
Pectolyase Y-23 (P)	P 0.1+C 0.5	P 0.1+C 1.0	P 0.1+C 2.0
	P 0.5+C 0.5	P 0.5+C 1.0	P 0.5+C 2.0
	P 1.0+C 0.5	P 1.0+C 1.0	P 1.0+C 2.0

Table 3. Composition of enzyme concentrations for protoplast isolation from mesophyll of *B. juncea*

Enzyme concentration(%)	Cellulase(C)		
Macerosin R(M)	M 0.1+C 1.0	M 0.5+C 1.0	M 1.0+C 1.0
	M 0.1+C 2.0	M 0.5+C 2.0	M 1.0+C 2.0
	M 0.1+C 3.0	M 0.5+C 3.0	M 1.0+C 3.0

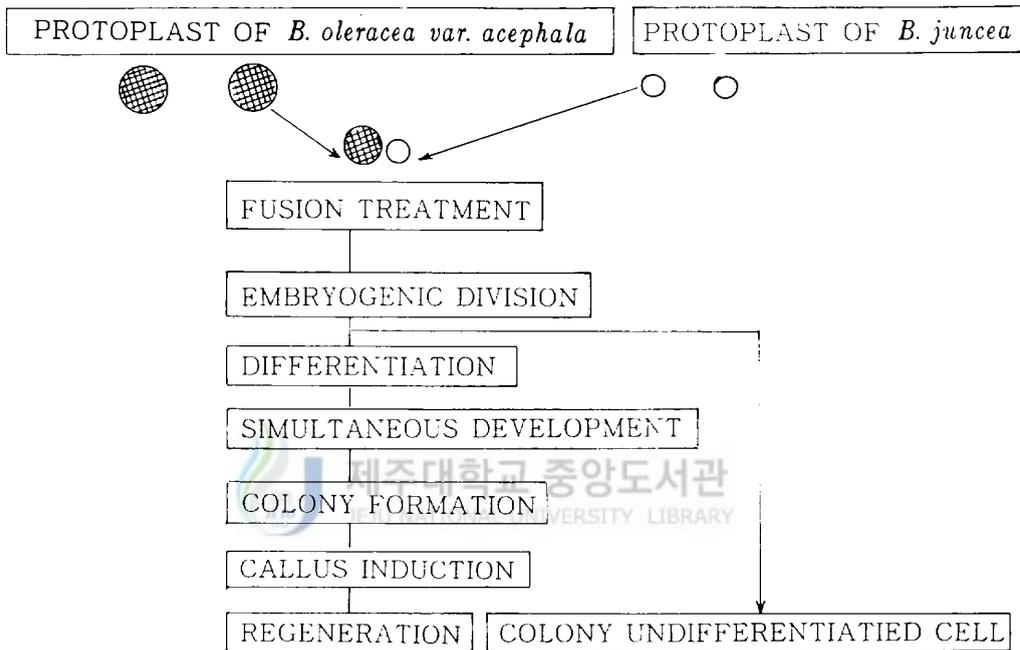
Table 4. Composition of cell and protoplast washing solution (mg/l)

KH ₂ PO ₄	27.2	pH	5.7
KNO ₃	101.0	Mannitol	13.0%
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,480.0		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	240.0		
KI	0.16		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025		

3. 原形質體의 融合

B. oleracea var. *acephala*와 *B. juncea*에서 分離한 原形質體 融合은 Polyethylene Glycol(M. W. 6,000)과 Dextran을 使用하여 實施하였다.

REGENERATION OF HETEROKARYON PLANTLET FROM PROTOPLAST FUSION ON *B. oleracea* var. *acephala* AND *B. juncea*



(1) Polyethylene Glycol에 의한 融合

Polyethylene Glycol(PEG; M. W. 6,000) 25%와 4% Sucrose, 0.01M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 제조하고, 稀釋液으로는 0.05M Glycine을 NaOH를 이용 pH 10.4로 조절하고, 0.74% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 와 0.5M의 Mannitol을 稀釋하여 使用했다.

그리고 洗滌液으로는 表 4의 細胞 및 原形質體 洗滌液을 使用하였다.

B. oleracea var. *acephala*와 *B. juncea*에서 分離한 原形質體를 同一한 2×10^6 Protop-

last/g 密度로 혼합하고 PEG溶液을 2~3ml를 加하여 충분히 섞어 10分間 26±1℃에서 유지시킨 뒤 洗滌液으로 洗滌하면서 光學顯微鏡下에서 融合過程을 관찰하였다.

(2) Dextran을 利用한 融合

15% Dextran(M. W. 50萬), 6% NaCl, pH 5.7의 Dextran溶液을 만들고 稀釋液으로 2% CaCl₂ · 2H₂O, 0.5M Mannitol, pH 5.7의 溶液을 利用하였다.

0.4ml의 Dextran溶液을 Petridish에 넣고, 0.2ml의 原形質體懸濁液을 넣은 후, 다시 Dextran 0.4ml를 加하고 30℃에서 15分間 放置했다. 여기에 8% NaCl과 0.1~0.01N NaOH液을 0.2ml 加하여 混合하고 다시 15分間 放置했다.

그후, 5ml의 稀釋液을 조심스럽게 加하여 30~60分間 放置해가면서 融合過程을 觀察하였다.

4. 融合한 原形質體의 培養

*B. oleracea var. acephala*와 *B. juncea*의 原形質體를 融合한 후 表 1의 變形된 MS Liquid Medium에서 Liquid-agar culture 方法으로 培養하였다.

이때 細胞分裂에 미치는 滲透壓調節劑인 Mannitol과 Glucose의 영향과 Hormone(2,4-D, NAA)의 影响을 觀察하였다.

5. Callus 誘導

原形質體 培養 3주후에 形成된 Colony들을 變形된 MS Medium에 0.8%의 Agar와 Hormone을 加하고 Mannitol 등의 滲透壓調節劑를 加하지 않는 培地로 옮겼다.

이때 Hormone으로는 2,4-D와 NAA를 處理하였다.

6. Heterokaryon 植物體의 誘導

Colony 培養 4주후에 分化된 直莖 1~2mm 크기의 Callus를 MS Medium에 옮겨 Heterokaryon 植物體의 再分化를 誘導하였다.

이때 培地에는 0.8%의 Agar와 Hormone으로 2,4-D와 NAA를 處理하였다.

IV. 結 果

1. 酵素溶液의 濃度에 따른 原形質體의 分離

*B. oleracea var. acephala*의 Mesophyll에서 原形質體 획득량 및 생존율은 表 5와 圖表 1, 2, 3과 같이 觀察되었다.

Pectolyase Y-23의 濃度를 0.1%, 0.5%, 1.0%로 달리하고, Cellulase의 濃度를 0.5%, 1.0%, 2.0%로 달리하여 混用處理하였을 때, 原形質體의 收率은 Pectolyase Y-23 0.5%와 Cellulase 0.5%를 混用했을 때 가장 높았으며, 大部分 Cellulase의 濃度가 높을 수록 급격히 떨어졌다.

生存率은 큰 차이는 없었으나 Pectolyase Y-23 0.1%와 Cellulase 0.5%일 때가 제일 높았다.

Table 5. Effects of enzyme concentrations for protoplast isolation from mesophyll of *B. oleracea var. acephala*

Enzyme concentration(%)	Protoplast yield ($\times 10^5/g \text{ F} \cdot \text{W}$)	Viability (%)
Pectolyase Y-23 0.1		
+Cellulase 0.5	28.6	99.
+Cellulase 1.0	18.8	96.
+Cellulase 2.0	12.3	89.
Pectolyase Y-23 0.5		
+Cellulase 0.5	37.0	98.
+Cellulase 1.0	27.3	97.
+Cellulase 2.0	14.7	92.
Pectolyase Y-23 1.0		
+Cellulase 0.5	14.9	98.
+Cellulase 1.0	11.4	97.
+Cellulase 2.0	9.2	98.

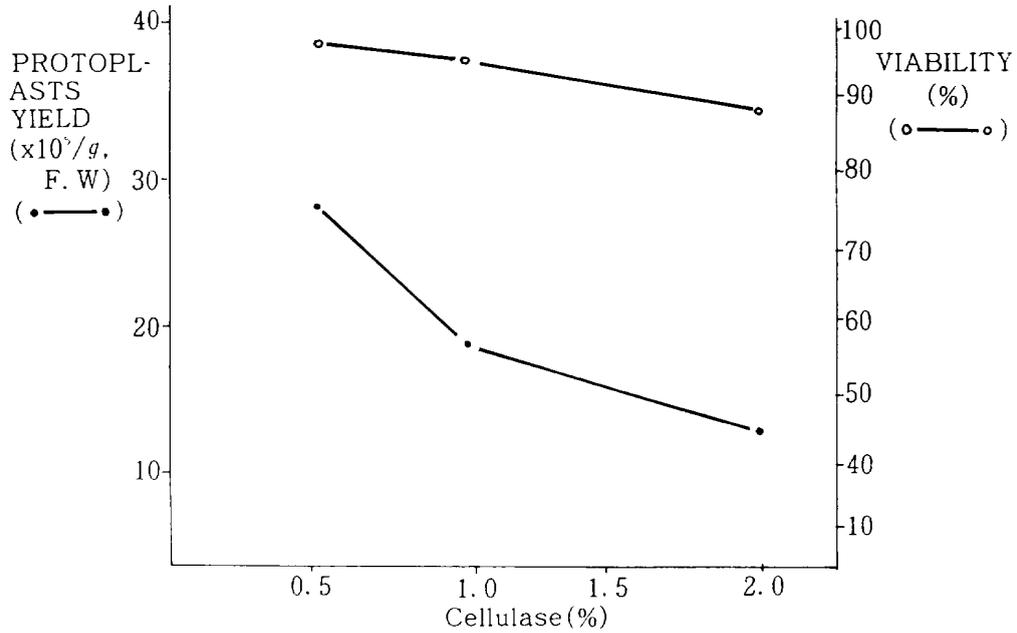


Fig. 1. Effects of enzyme concentration for protoplast isolation from mesophyll of *B. oleracea* var. *acephala* at Pectolyase Y-23 0.1%

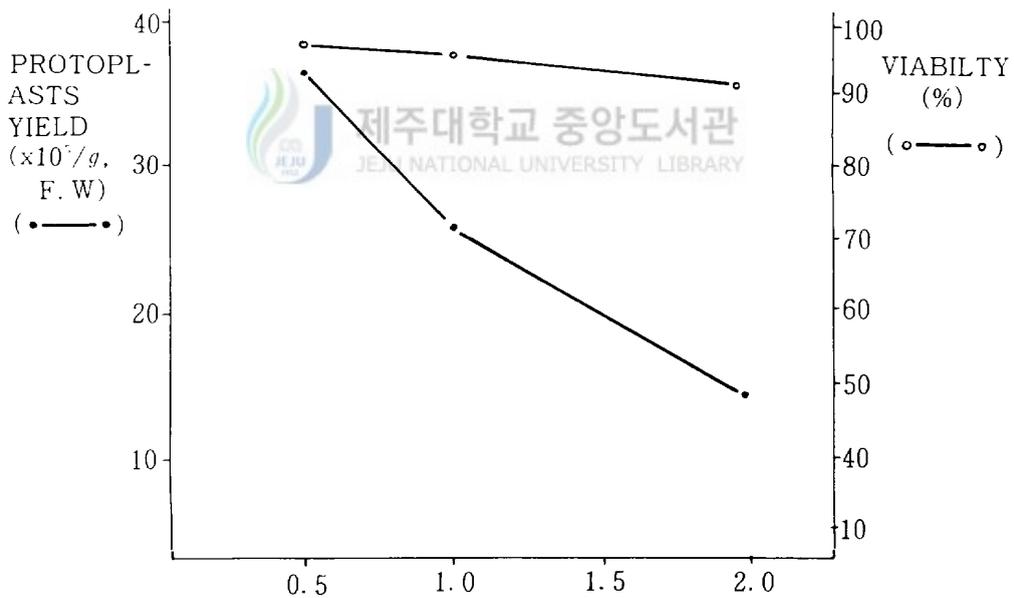


Fig. 2. Effects of enzyme concentration for protoplast isolation from mesophyll of *B. oleracea* var. *acephala* at Pectolyase Y-23 0.5%

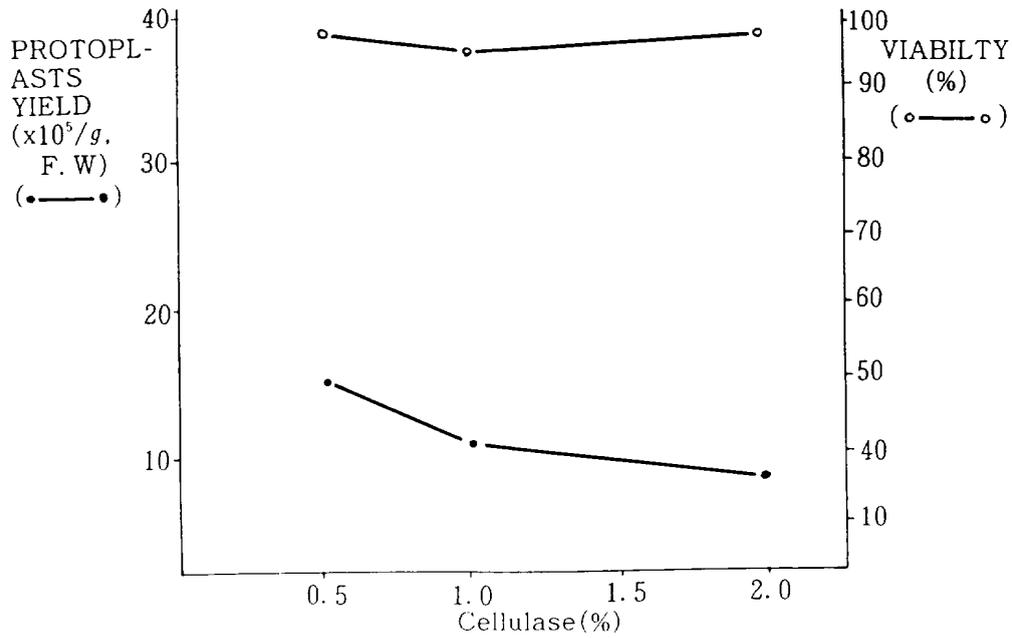


Fig. 3. Effects of enzyme concentration for protoplast isolation from mesophyll of *B. oleracea* var. *acephala* at Pectolyase Y-23 1.0%

*B. juncea*의 Mesophyll에서 原形質體의 分離에는 Macerosin R 0.1%, 0.5%, 1.0% 와, Cellulase 1.0%, 2.0%, 3.0%를 각각 混用 했는데, 分離된 結果는 表 6 및 圖表 4, 5, 6. 과 같이 나타났다.

Table 6. Effects of enzyme concentrations for protoplast isolation from mesophyll of *Brassica juncea*

Enzyme concentration(%)	Protoplast yield (X 10 ⁵ /g F · W)	Viability (%)
Macerosin R 0.1 + Cellulase 1.0	13.7	98.
+ Cellulase 2.0	18.4	95.
+ Cellulase 3.0	21.0	91.
Macerosin R 0.5 + Cellulase 1.0	38.2	98.
+ Cellulase 2.0	32.8	94.
+ Cellulase 3.0	44.6	91.
Macerosin R 1.0 + Cellulase 1.0	69.1	99.
+ Cellulase 2.0	92.2	98.
+ Cellulase 3.0	87.4	90.

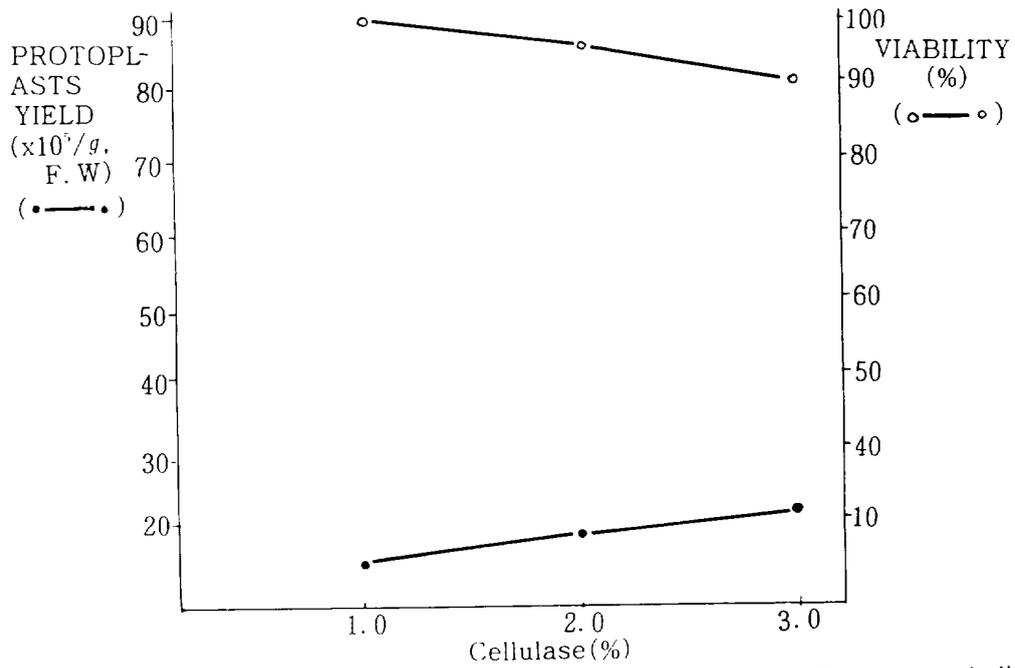


Fig. 4. Effects of enzyme concentration for protoplast isolation from mesophyll of *B. juncea* at Macerosin R 0.1%.

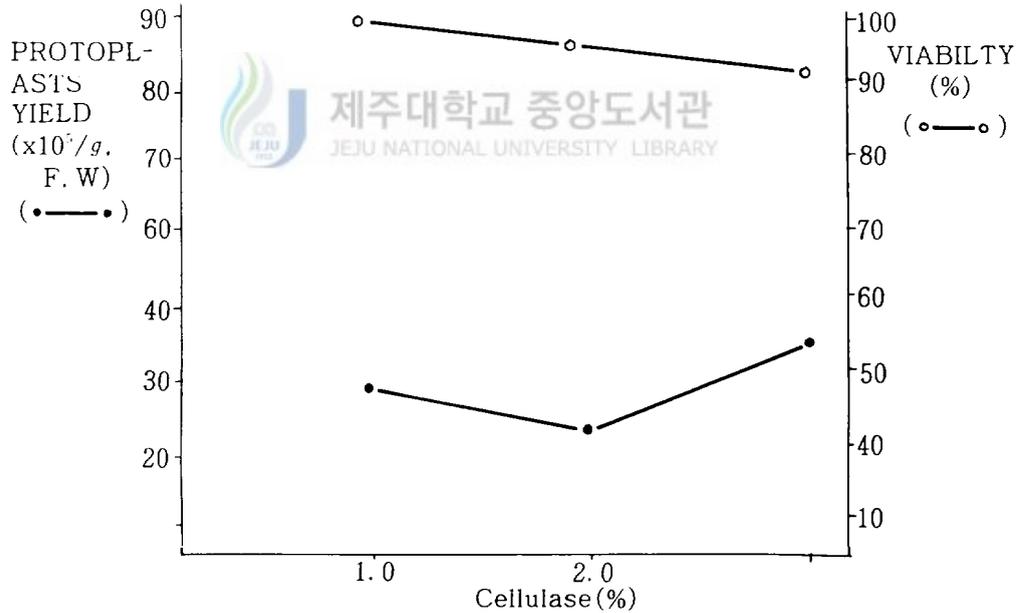


Fig. 5. Effects of enzyme concentration for protoplast isolation from mesophyll *B. juncea* at Macerosin R 0.5%

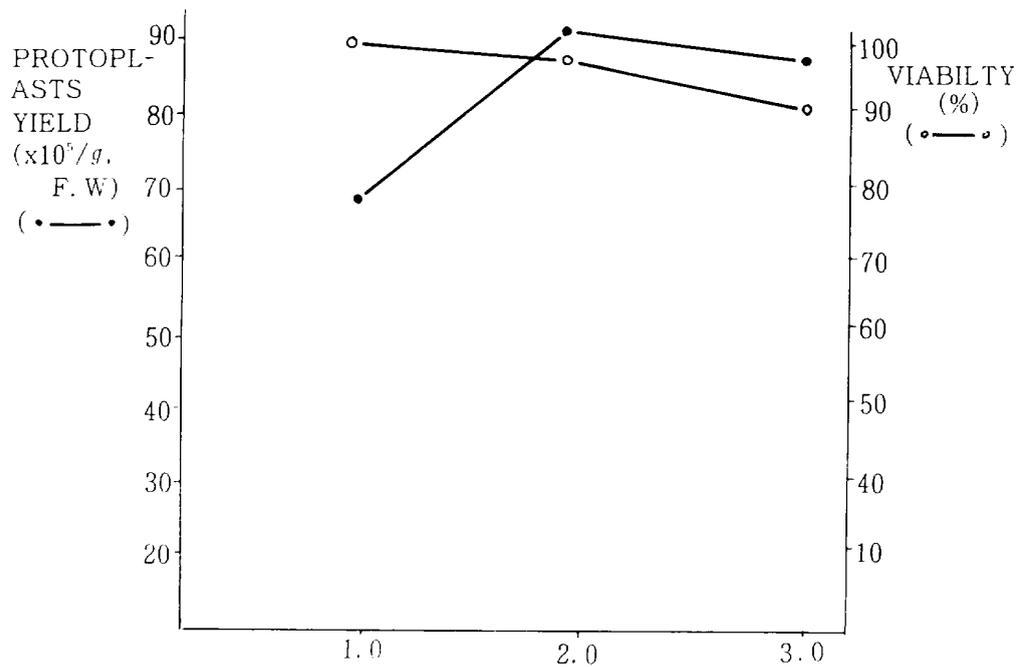


Fig. 6. Effects of enzyme concentration for protoplast isolation from mesophyll *B. juncea* at Macerosin R 1.0%

전반적으로 Macerosin R의 농도가 높을수록 현저하게 原形質體 分離 收率이 증가했으며, Cellulase의 농도가 높음에 따라 原形質體 分離 收率は 다소 증가됐지만 生存率 이 떨어졌다.

Macerosin R 1.0%와 Cellulase 2.0%를 混用 處理했을 때 收率이 $92.2 \times 10^5/g$ 으로 가장 높았고, 生存率은 Macerosin R 1.0%와 Cellulase 1.0%를 混用處理했을 때 가장 높게 나타났다.

2. 原形質體 融合

(1) PEG 處理에 의한 融合

PEG의 조성에 20%, 25%, 30%, 35%의 變化를 주어 融合을 관찰한 結果는 다음과 같았다(도표 7; 사진 3).

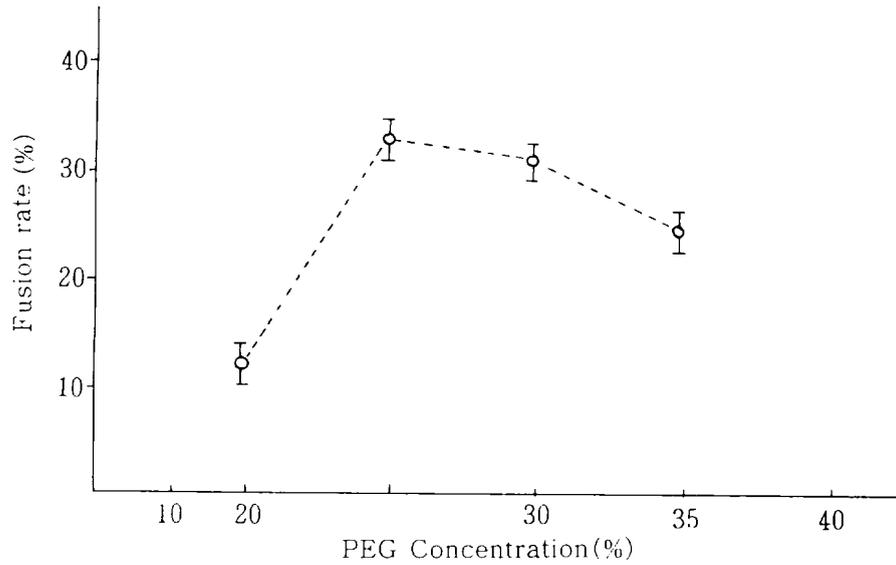


Fig. 7. Effects of PEG (M. W. 6, 000) concentration on the fusion between protoplasts isolated from *B. oleracea* var. *acephala* and *B. juncea*

PEG의 濃度가 25%에서 32.5%의 융합율을 보였는데, 이를 전후한 濃度에서는 融合率在 低濃度에서는 현저히 떨어졌고 高濃度에서는 서서히 감소됨을 알 수 있다.

(2) Dextran 處理에 의한 融合

Dextran溶液을 利用한 *B. oleracea* var. *acephala* 와 *B. juncea* 原形質體 融合에서 NaOH의 濃度差에 의한 融合率 및 殘存率과의 關係는 圖표 8과 같았다.

原形質體間의 응집을 조장하여 融合되게하는 NaOH의 濃度는 pH가 높을 수록 融合率在 높게 나타났다.

pH가 7일때는 融合率在 16%였고, pH가 11.7일때는 23%, pH 12.9일때 47%의 融合率在 보였다.

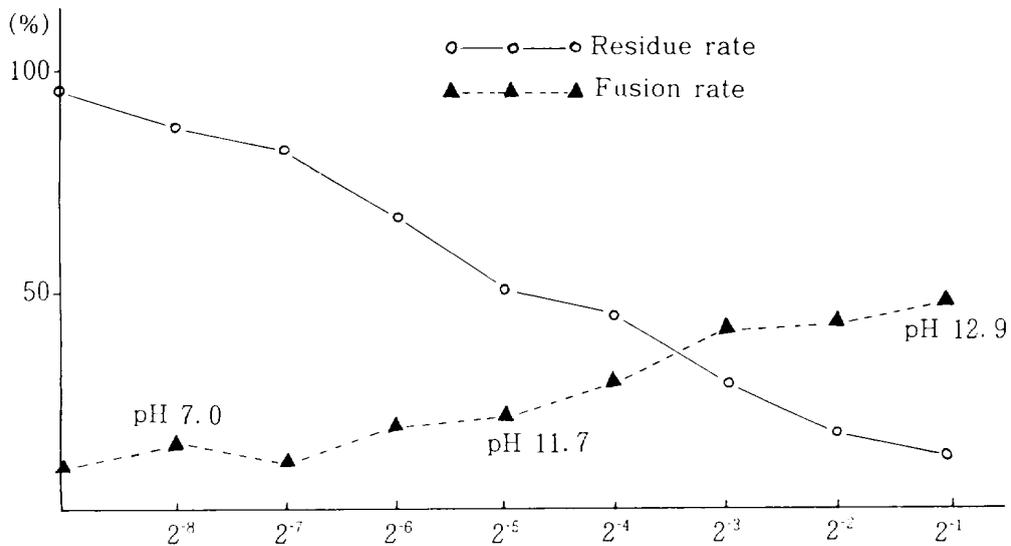


Fig. 8. Effects of NaOH concentration in dextran solution on fusion between protoplasts isolated from *B. oleracea* var. *acephala* and *B. juncea*

3. *B. oleracea* var. *acephala*와 *B. juncea*의 原形質體 融合後의 培養 및 Heterokaryon의 誘導

(1) 融合된 原形質體의 培養日數에 따른 細胞分裂

融合시킨 原形質體 및 *B. oleracea* var. *acephala*와 *B. juncea*의 原形質體를 變形된 MS Medium을 利用 Liquid-agar Layer culture 方法으로 培養시키면서 細胞分裂過程을 관찰한 結果(표 7) 培養 3日부터 細胞分裂(사진 4)이 일어났다.

Table 7. Cell division frequency of protoplasts was presented in next table

Cultivers/Days	3	5	7	10	14	21	colonies
<i>B. juncea</i>	4	-	9	10	7	8	10
<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	0	4	13	5	-	-	7
Heterokaryon	4	2	11	-	8	6	6

融合시킨 原形質體의 細胞分裂은 *B. oleracea var. acephala*와 *B. juncea*에 비해 다소 떨어졌으며, *B. oleracea var. acephala*는 초기분열이 우세하였고, *B. juncea*는 분열이 점진적으로 일어났다.

(2) Mannitol과 Glucose의 濃度가 細胞分裂에 미치는 영향

滲透壓 조절제인 Mannitol과 Glucose는 原形質膜을 보호하며, 原形質體의 호흡작용을 도와 細胞分裂을 촉진하는데, 本實驗에서 Mannitol과 Glucose를 處理 比較한 바 Glucose와 Mannitol을 단일 처리 하였을 때 細胞分裂은 Glucose 0.5M에서 52.4%, Mannitol 0.5M에서는 48.2%로 나타났다(표 8).

Table 8. Effects of sugar concentrations in culture medium on cell division

Sugar concentration(M)	Glucose 0.5M		Mannitol 0.5M	
Cell division frequency (%)	52.4		48.2	

Sugar concentration (M)	Glucose 0.4 Mannitol 0.1	Glucose 0.3 Mannitol 0.2	Glucose 0.2 Mannitol 0.3	Glucose 0.1 Mannitol 0.4
Cell division frequency (%)	63.5	45.4	46.9	35.0

또한, Mannitol과 Glucose를 混合處理하였을 때 Glucose 0.4M, Mannitol 0.1M 稀釋한 處理區에서 63.5%의 細胞分裂이 일어났고, 이와 반면에 Mannitol 0.4M과 Glucose 0.1M를 稀釋 處理한 區에서는 35.0%의 細胞分裂이 일어났다.

즉, Mannitol과 Glucose를 단일 처리 하였을 때 보다는 Glucose 0.4M과 Mannitol 0.1M을 混用하였을 때 細胞分裂은 더욱 조장되었다.

(3) Hormone의 濃度가 培養中인 融合 原形質體의 細胞分裂에 미치는 영향.

培養中에 細胞分裂을 조장하기 위해 Auxin類 Hormone인 2,4-D와 NAA를 처리한 결과는 표 9와 같았다.

Table 9. Effects of phytohormone in culture medium on cell division (%)

Concentration(<i>mg/l</i>) Hormone	0.1	0.2	0.3	0.5	1.0	2.0	5.0	7.0	10.0
2, 4-D	43	54.5	50.1	41.9	41.4	32.0	20.3	11.0	4.7
NAA	41.2	46.1	49.8	50.8	53.0	40.0	22.6	14.1	7.3

2, 4-D는 0.2~0.3 *mg/l*에서 細胞分裂을 効果的으로 촉진시켰으며, NAA는 0.5~1.0 *mg/l*에서 効果的이었으며, Hormone의 濃度가 높아질수록 細胞分裂은 저해됨을 알 수 있었다.

(4) Callus의 誘導

融合된 原形質體를 變形된 MS Medium에서 Liquid-agar Layer culture를 실시하였는데, 3주후부터 Colony가 形成되기 시작했다(사진 5).

Colony를 變形된 MS Medium에서 Mannitol을 제외하고 0.8%의 Agar와 Hormone으로 2, 4-D 0.01 *mg/l*와 NAA 1.0 *mg/l*를 첨가한 培地로 옮겨 培養을 시켰는데, 4~5주 후에 Callus를 誘導해냈다(사진 6).

(5) Heterokaryon Plantlet의 誘導

Colony培養 5주후에 形成된 Calli들을 再分化用 培地에 이식하였다. 이때 使用한 培地는 MS Medium에 Agar를 0.8% 첨가하고, Hormone 2, 4-D와 NAA를 濃度를 달리하여 표 10과 같은 結果를 얻었다.

2, 4-D의 濃度가 증가함에 따라 再分化率은 증가 하였으나, NAA의 處理는 濃度가 증가할 수록 再分化率은 다소 감소하였다.

Calli의 再分化가 가장 좋은 Hormone 處理區는 2, 4-D 1.0 *mg/l*와 NAA 0.3 *mg/l*를 混用한 區였다.

培養 3주후에 우량 개체를 選拔하여 MS Medium에 NAA 0.1 *mg/l*와 BA 1 *mg/l*로 고정시킨 培地로 옮겨 2주 培養후에 Shoot와 Root를 完全히 가진 개체를 育成해냈다(사진 7).

Table 10. Effects of hormone concentration for regeneration of calli in MS medium

Hormone concentration (mg/l)		No. of calli transferred	No. of calli regeneration	Regeneration frequency (%)
2, 4-D	NAA			
0.01	0.3	42	1	2.3
	0.5	42	0	0
	1.0	42	0	0
0.1	0.3	36	4	11.1
	0.5	36	2	5.5
	1.0	36	3	8.3
1.0	0.3	47	17	36.0
	0.5	47	13	27.7
	1.0	47	6	12.8

4. Heterokayon의 染色體 觀察

B. oleracea var. *acephala*와 *B. juncea*의 細胞融合으로 誘起된 Heterokaryon을 검정하기 위해 再分化된 Heterokaryon Plantlet의 根을 採取하여 染色體 觀察을 行하였다(사진 9).

染色法은 Acetocarmin法을 利用했는데, 뿌리 先端을 5~10mm로 切斷하여 0.1% Colchicine에서 4時間동안 Pretreatment를 하고, Acetoalcohol溶液(1:3)에 넣어 4℃에서 12時間 處理한 후, 60℃ IN HCl에서 10秒間 침지시켜 加水分解시키고, Acetocarmin으로 染色시켜 觀察했다.

그리고 다른 방법으로는 採取한 根을 잘게 자른후 Cellulase 0.5%와 Macerosin R 0.1%를 處理, 原形質을 分離한 후, 滲透壓 調節劑인 Mannitol 0.1M 溶液에서 방치한 다음, 原形質膜을 제거시켜, Orceine을 處理하여 染色한 후 光學顯微鏡으로 染色體를 觀察하였다(사진 9, 10).

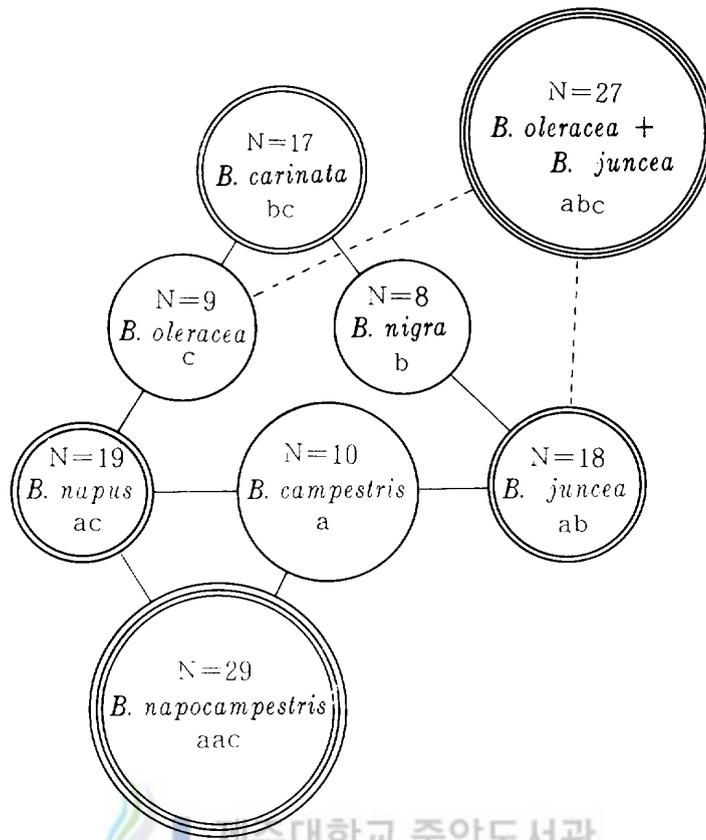


Fig. 9. Diagram of genome in Brassicaceae (U. 1935)

觀察結果 體細胞 (*B. oleracea* var. *acephala*, *B. juncea*)를 가지고 實驗하였기 때문에 Heterokaryon Plantlet의 染色體數는 $2n=54$ 로 나타났다(사진 9). 그러나 같은 개체간에 融合이 일어난 Homokaryon Plantlet (*B. juncea* $4n$)도 觀察되었다(사진 10).

V. 考 察

1. 原形質體의 分離

原形質體 分離 前에 Pre-Plasmolysis를 行하였는데, 이에 關하여 Scott 等(1978)에 의하면 原形質體의 收率이 增加하였다는 報告가 있으며, Cocking(1972)은 原形質體의 安定性을 유지시켜 生存率을 增進시킨다고 報告하고 있는데, 本 研究에서도 安定性 및 生存率에 効果의임이 認定되었다.

酵素濃度가 原形質體 分離에 미치는 영향을 보면, *B. oleracea var. acephala*는 Pectolyase Y-23과 Cellulase를 각각 0.5% 混用했을 때 原形質體의 收率이 높았으며, *B. juncea*는 Macerosin R 1.0와 Cellulase 2.0%를 混用處理하였을 때 收率이 높았다.

酵素濃度を 높였을 때는 각각 分離되는 原形質體의 收率は 높았으나 生存率이 떨어질 수 있었는데, Alan, Martin(1976)等도 이와같이 報告하고 있다.

酵素溶液에 첨가되는 滲透壓 安定劑도 原形質體의 分離에 영향을 미치는데(Power, Cummins;1970, Senda et. al.;1979, 龜谷壽昭;1981), 本 實驗에서는 0.5M의 Mannitol을 使用하였다. Hughes et. al. (1978)에 의하면 Mesophyll에서 原形質體 分離時 0.3M~0.5M Mannitol이 좋은 效果를 보이며, 이 이상의 濃度에서는 分離를 감소시켰다고 報告하였다.

2. 原形質體의 融合

*B. oleracea var. acephala*와 *B. juncea*間의 Heterokaryon을 誘導하기 위한 原形質體 融合에 PEG(M. W. 6,000)과 Dextran을 利用하였던 바, PEG의 處理濃度 25%에서 32.5%의 融合率이 나타났고, Dextran에서는 0.2N NaOH下에서 48%의 融合率을 보였는데, 融合劑인 PEG 및 Dextran의 濃度, pH, 原形質體의 密度 等の 要因으로 融合率이 다소 떨어진 것으로 思料된다.

Kao et. al. (1974)은 原形質體의 融合이 融合劑 處理 後 洗滌中에 일어난다고 하였고, 특히 原形質體 分離에 쓰인 酵素液의 완전 제거가 必要하다고 報告하고 있다.

3. 세포분열 및 Colony 誘起

*B. oleracea var. acephala*와 *B. juncea*의 原形質體 融合 後 變形된 MS Medium에서 Liquid-agar Layer 培養法으로 培養하면서 細胞分裂과 이에 영향을 미치는 滲透安定劑인 Glucose와 Mannitol 및 Hormone(2, 4D, NAA)의 效果를 觀察한 結果 細胞分裂은 培養 3日後부터 일어났으며, 滲透安定劑인 Mannitol과 Glucose는 단일처리구보다 Glucose 0.4M과 Mannitol 0.1M을 混合處理한 것에서 細胞分裂이 많이 助長되었다.

Kartha et. al. (1974), Xu et. al. (1982)에 의하면 Mannitol은 代謝作用에 關여하지 않는 것과는 달리 Glucose를 處理했을때는 滲透壓調節劑로서 뿐만 아니라, 炭素原으로도 作用한다고 報告하고 있다.

Hormone處理時 2, 4-D는 0.2mg/l에서, NAA는 1.0mg/l에서 높은 細胞分裂을 일으켰으며, 濃度가 높아질수록 細胞分裂은 급격히 떨어졌다.

Li, Kohlenbach(1982), Lu et. al. (1982)에 의하면 原形質體 培養에서 2, 4-D는 0.2~0.5mg/l에서, NAA는 0.5~1.0mg/l의 범위에서 効果的인 細胞分裂을 일으켰고, 高濃度에서 組合處理時는 細胞分裂이 停止되었다고 報告하고 있다.

Colony는 原形質體 培養 3주째부터 形成되기 시작했다.

4. Callus 形成 및 Heterokaryon Plantlet 形成

Colony들이 충분히 形成된 後에 Callus分化用 培地로 옮겨 培養 4주째부터 Callus들이 形成되었다.

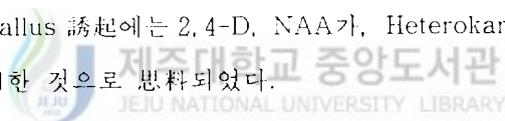
Shenck et. al. (1982), Gleba et. al. (1978), Kartha et. al. (1974)에 의하면 Colony 培養後에 얻어진 Callus에서 器官分化를 위해 NAA와 BAP를 각각 0.1mg/l, BAP 1~3mg/l 混用한 處理區에서는 根分化만 일어났고, NAA 0.01mg/l, BAP 1.0mg/l를 處理한 區에서 正常的인 植物體가 分化되었다고 報告하고 있다. 이를 토대로 本 實驗에

서 器官分化用培地에 NAA 0.1mg/l, BA 1.0mg/l를 處理하였던 바, 再分化를 誘導할 수 있었다(사진 7).

摘 要

植物細胞融合을 利用한 *B. oleracea* var. *acephala*와 *B. juncea*間의 Heterokaryon 誘導實驗에서 原形質體의 分離, 融合, 融合된 原形質體의 培養 및 再分化에 미치는 影響을 研究하였던 바 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 原形質體의 分離時 *B. oleracea* var. *acephala*는 Pectolyase Y-23 0.5%, Cellulase 0.5%를, *B. juncea*는 Macerosin R 1.0%, Cellulase 2.0%를 處理하였을 때 가장 좋은 收率과 生存率을 나타냈다.
2. 두 個體間의 原形質體融合은 PEG(M. W. 6,000) 25%에서 32.5%, Dextran NaOH 0.2N에서 47%의 融合率을 보였다.
3. 細胞分裂은 Mannitol 0.1M, Glucose 0.4M 混用 處理區에서 63.5%의 效率로, 滲透安定劑의 單一處理區보다 效果的이었고, 2,4-D 0.2mg/l와 NAA 1.0mg/l도 細胞分裂에 效果的인 것으로 思料되었다.
4. Colony 및 Callus 誘起에는 2,4-D, NAA가, Heterokaryon Plantlet再分化에는 NAA, BA가 有用한 것으로 思料되었다.



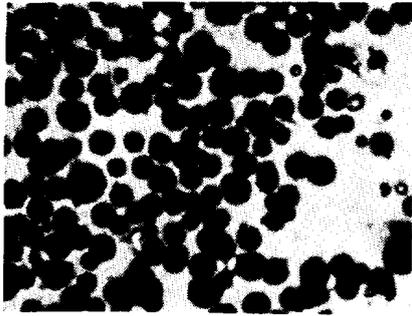
參 考 文 獻

- Cocking, E. C. : A method for the isolation of plant protoplasts and Vacuoles, Nature, 187 : 962~963. 1960.
- 龜谷壽昭 : 植物における細胞融合 - 融合法と雜種選擇法についこ, 組織培養, 7, 9 : 343~349. 1981.
- Power, J. B., Cummins, S. E., Cocking, E. C. : Fusion isolated plant protoplasts, Nature, 225 : 1016~1018. 1970.
- Kameya, T. : The effects of gelatin on agrigation of protoplasts from higher plants, Plants, 115 : 77~82. 1973.
- Kao, K. N., Michayluk, M. R. : A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts, Planta, 115 : 335~367. 1974.
- Wallin, A., Glimelius, K., Eriksson, T. : The induction of aggregation and fusion of *Daucus carota* protoplasts by polyethylene glycol, Z. Pflanzenphysiol., 74 : 64~80. 1974.
- Nagata, T. : A novel cell-fusion method of protoplasts by polyvinyl alcohol, Naturwiss., 65 : 263~264. 1978.
- Kameya, T. : Induction of hybrids through somatic cell fusion with dextran sulfate and gelation, Jap. J. Genetics, 50 : 235~246. 1975.
- Kameya, T. : Studies on plant cell fusion : Effects of dextran and pronase E on fusion, Cytologia, 44 : 449~456. 1979.
- Kameya, T. Horn, M. E., Widholm, J. M. : Hybrid shoot formation from fused *Daucus carota* and *D. capillifolius* protoplasts, Z. Pflanzenphysiol. (in press) 1982.
- Senda, M., Takeda J., Abe, S., Nakamura, T. : Induction of cell fusion of plant protoplasts by electrical stimulation, Plant & cell physiol.

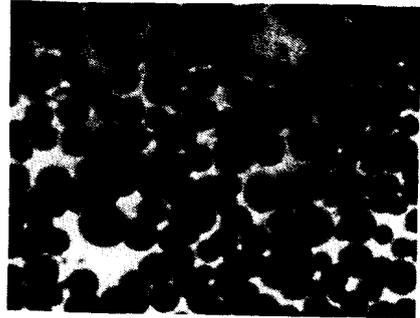
- 20 : 1441~1443. 1979.
- Zimmermann, Scheurich, P : High frequency fusion of plant protoplasts by electric field, *Planta*, 151 : 26~32. 1980.
- Scheurich, P., Zimmermann, U. : Giant human erythrocytes by electric-field-induced cell-to-cell fusion, *Naturwiss.*, 68 : 45~46. 1981.
- Kao, K. N. : Plant tissue culture methods, Prairie Regional Laboratory, Saskatoon, Canada, 22~27. 1976.
- Scheurich, P., Zimmermann, U. : Electrically Stimulated fusion of different plant cell protoplasts, *Plant Physiol.*, 67 : 849~853. 1981.
- Zimmermann, U., Scheurich, P., Pilwat, G., Benz, R. : Cells with manipulated functions : New perspectives for cell biology, medicine, and technology, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 20 : 325~344. 1981
- Nagata, T., Takebe, I. : Planting of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium, *Planta*, 99 : 12~20. 1971.
- Harns, G. T., Potrykus, I. : Enrichment for heterokaryocytes by the use of iso-osmotic density gradients after Plant protoplast fusion, *Theor. Appl. Genet.*, 53 : 49~55. 1978.
- Kao, K. N. : Chromosomal behavior in somatic hybrids of soybean-Nicotiana glauca, *Mol. Gen. Genet.*, 150 : 225~230. 1977.
- Kao, K. N., Constable, F., Michayluk, M. R. G., Gamborg, O. L. : Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cell, *Planta*, 120 : 215~227. 1974.
- Schieder, O. : Somatic hybrids of *Datura innoxia* Mill. + *Datura discolor* Bernh. and of *Datura innoxia* Mill. + *Datura stramonium* L. *Var. tatula* L., *Molec. gen. Genet.*, 162 : 113~119. 1978.
- Alan, C. C. and B. Martin. : Environmentally induced changes in the cell walls

- of tomato leaves in relation to cell and protoplast release, *Physiol. plant.* 37 : 239. 1976.
- Bidney, D. L. , J.F. Shepard and E. Kaleikau. : Regeneration of plants from mesophyll protoplasts of *Brassica oleracea*. *Protoplasma.* 117 : 89~92. 1983.
- Cocking, E. C. : Plant cell protoplasts isolation and development, *Ann. Rev. Plant physiol.* 23 : 29~50. 1972.
- Gatenby, A. A. and E. C. Cocking : Callus formation from protoplasts of marrow stem Kale. *Plant Sci. Lett.* 8 : 275~280. 1977.
- Kartha, K. K. , M. R. Michayluk, K. N. Kao, O. L. Gamborg and F. Constabel. : Callus formation and plant regeneration from mesophyll protoplasts of rape plants *Brassica napus* cultivar Zephyr. *Plant Sci. Lett.* 3 : 265~271. 1974.
- Li, L. C. and H. W. Kohlenbach. : Somatic embryogenesis in quite a direct way in cultures of mesophyll protoplast of *Brassica napus*. *Plant Cell Rep.* 1 : 209~211. 1982.
- 日本育種學會. : 十字花科植物の分化と育種. 育種學最近の進歩 20. p. 41~92. 1978.

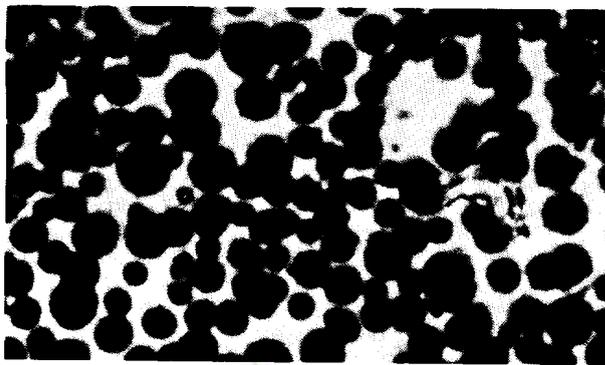
寫 眞



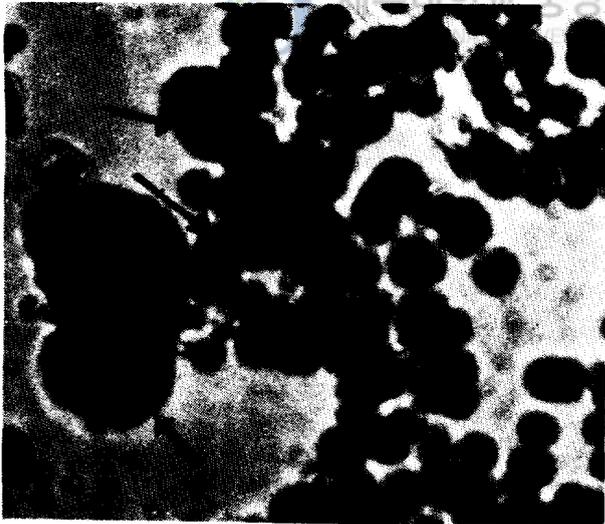
Pic. 1



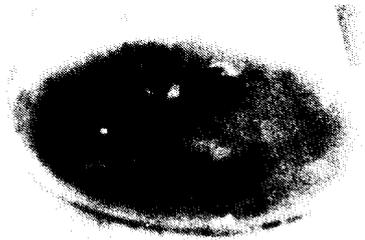
Pic. 2



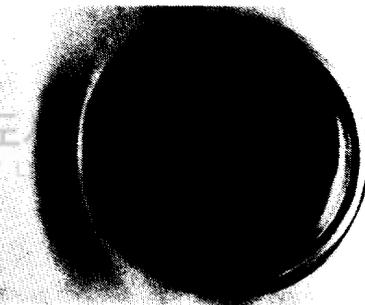
Pic. 3



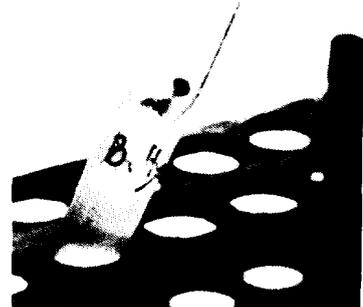
Pic. 4



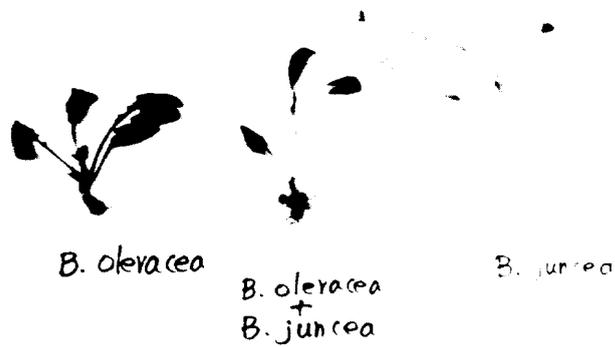
Pic. 5



Pic. 6

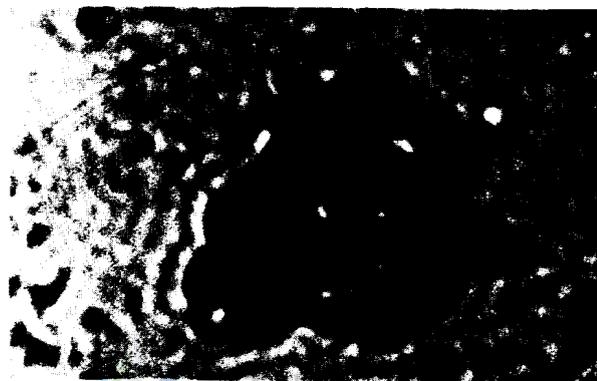


Pic. 7



Pic. 8

Pic. 9



PICTURE EXPLANATION

1. Isolated protoplast of *B. juncea*.
2. Isolated protoplast of *B. oleracea* var. *acephala*.
3. Process of fusion of 1 and 2.
4. Cell division and colony formation.
5. Micro-calli formation.
6. Callus formation.
7. Shoot and root formation.
8. Compared with origin(*B. oleracea* var. *acephala*, *B. juncea*) and heterokaryon.
9. Heterkaryon chromosome($2n=54$) and homokaryon chromosome($2n=72$).

謝 辭

本 研究를 遂行함에 있어 始終 아낌없이 指導하여 주신 金翰琳 教授님과 論文審査에 수고하여 주신 朴良門 教授님, 趙南棋 教授님께 深甚한 謝意를 表하며, 항상 많은 가르침을 주신 權五均 教授님, 吳現道 教授님, 姜榮吉 教授님, 高永友 教授님, 그리고 資料 整理에 助言을 하여주신 康珉秀 教授님, 宋昌吉 先生님께 感謝를 드립니다.

특히 本 研究에 貴重한 文獻를 제공해 주신 日本 東北大學 農學研究所에 李孝淵 先輩님, ISIKAWA PLANT PROTECT OFFICE에 Yabu TetsuO에게 謝意를 表하며 아울러 주위에서 도움을 주신 여러분께도 感謝드립니다.

끝으로 그동안 物心兩面으로 뒷바라지하여 주신 어머님과 형님, 누님들께 이 論文을 드립니다.

