

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

金翰琳 · 吳柄權

Selection of Heterokaryon of *Brassica oleracea* var.
acephala and *B. juncea* by Protoplast Fusion

Kim, Hal-lim · Oh, Byong-kwon

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 obtained were summarized as follows:

The most healthy protoplasts could be obtained when *Brassica oleracea* var. *acephala* was treated with enzymes 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 than as it was expected.

First cell division was obtained after culturing 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. campestris* (aa) × *B. nigra*(bb), n=18)에 속하고, myrosin 等を 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. 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 播種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

Brassica oleracea var. *acephala*와 *B. juncea* 種子를 70% ethanol로 30抄間 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 使用하였으며 나출 원형질체의 나출과 세포활성을 상법에 의하여 처리하였다.

葉이 각각 2~3cm 자란 후, 메스로 葉을 1~2mm로 잘게 잘라 0.55M의 mannitol溶液에서 1時間동안 plasmolying시킨후, 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 濃度を 調査하기 위해 표 2, 3과 같이 處理하였다. 이때의 酵素의 稀釋은 표 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 1. Composition of the culture media of MS* and modified MS

(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		0.55M
pH	5.7-5.8	5.7

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)		
Macerocin 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.

(1) Polyethylene glycol에 의한 融合
polyethylene glycol (PEG; M. W. 6,000) 25%와 4% sucrose, 0.01M CaCl₂·2H₂O를 製 造하고, 稀釋液으로는 0.05M glycine을 NaOH 를 이용 pH 10.4로 調整하고, 0.74% CaCl₂·2H₂O와 0.5M의 mannitol을 稀釋하여 使用했 다.

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 2×10⁶ protoplast/g 密度로 혼합하고 PEG溶液을 2~3ml를 加하여 充分히

섞어 10分間 26±1°C에서 유지시킨 뒤 洗滌液으 로 洗滌하면서 光學顯微鏡下에서 融合過程을 觀察하였다.

(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°C에서 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했 다.

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

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 영향을 관찰하였다.

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

6. Heterokaryon 植物體의 誘導

Colony 培養 4주후에 分化된 直徑 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.

Ⅲ. 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.

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

Enzyme concentration (%)	Protoplast yield (X 10 ⁵ /g F · 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.

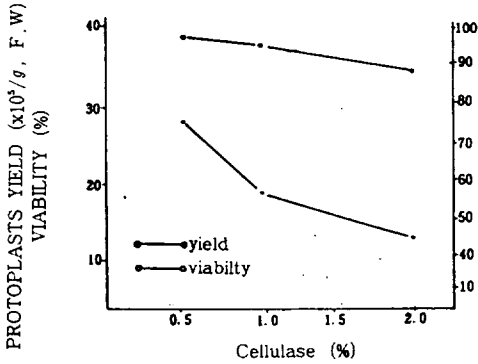


Fig. 1. Effects of cellulase concentration on protoplast yield and viability from mesophyll of *B. oleracea var. acephala* at Pectolyase Y-23 0.1%.

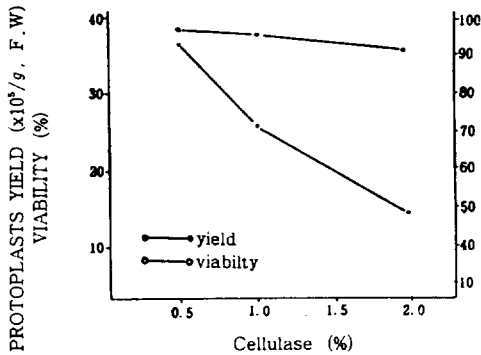


Fig. 2. Effects of cellulase concentration on protoplast yield and viability from mesophyll of *B. oleracea var. acephala* at Pectolyase Y-23 0.5%.

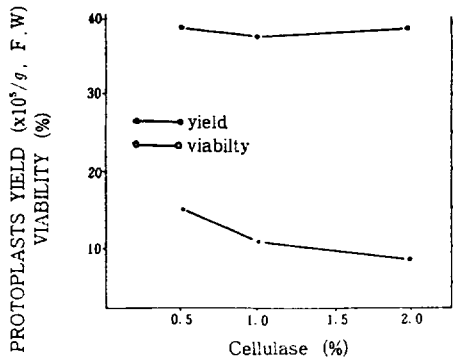


Fig. 3. Effects of enzyme concentration for protoplast isolation from mesophyll of *B. oleracea var. acephala* at Pectolyase Y-23 1.0%.

Pectolyase Y-23의 농도를 0.1%, 0.5%, 1.0%로 달리하고, cellulase의 농도를 0.5%, 1.0%, 2.0%로 달리하여 혼용處理하였을 때, 原形質體의 收率は pectolyase Y-23 0.5%와 cellulase 0.5%를 혼용했을 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.

*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 혼용 했는데, 分離된 結果는 表 6 및 圖表 4, 5, 6과 같이 나타났다.

전반적으로 macerosin R의 농도가 높을수록 현저하게 原形質體 分離 收率が 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 혼용處理했을 때 收率が 92.2×10⁵/g으로 가장 높았고, 生存率은 macerosin R 1.0%와 cellulase 1.0%를 혼용處理했을 때 가장 높게 나타났다.

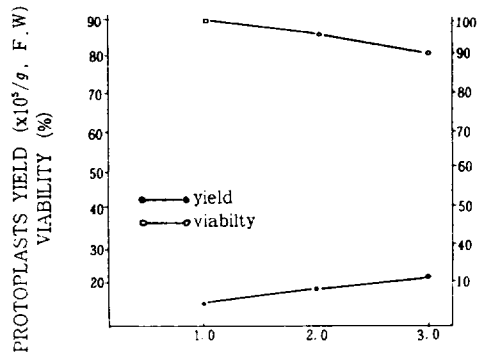


Fig. 4. Effects of enzyme concentration for protoplast isolation from mesophyll of *B. juncea* at Macerosin R 0.1%.

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.

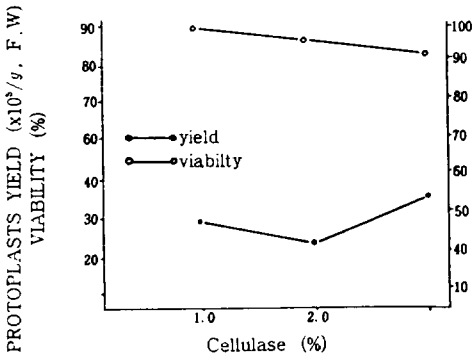


Fig. 5. Effects of enzyme concentration for protoplast isolation from mesophyll *B. juncea* at Macerosin R 0.5%.

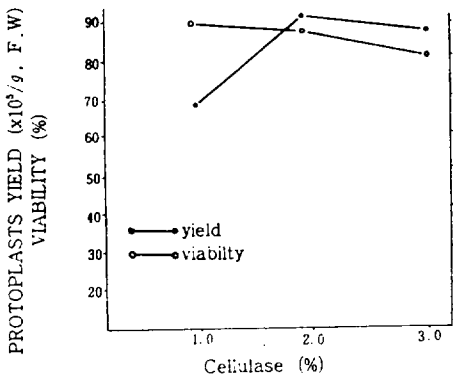


Fig. 6. Effects of enzyme concentration for protoplast isolation from mesophyll *B. juncea* at Macerosin R 1.0%.

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).

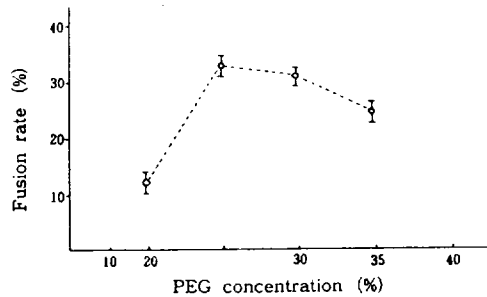


Fig. 7. Effects of PEG (M. W. 6,000) concentration on the protoplasts fusion rate between *B. oleracea* var. *acephala* and *B. juncea*

PEG의 濃度가 25%에서 32.5%의 融合율을 보였는데, 이를 전후한 濃度에서는 融合率이 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 도표 8과 같았다.

原形質體間的 융집을 조장하여 融合되게 하는 NaOH의 濃度는 pH가 높을수록 融合率이 높게 나타났다.

pH가 7일때는 融合率이 16%였고, pH가 11.7 일때는 23%, pH 12.9일때 47%의 融合率을 보 였다.

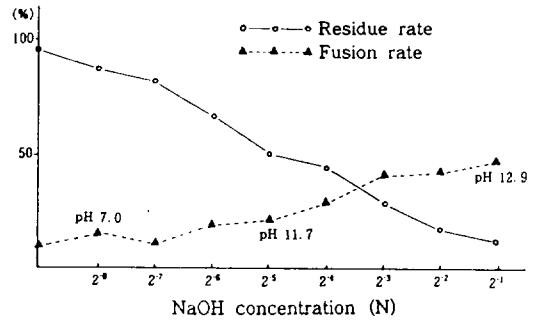


Fig. 8. Effects of NaOH concentration in dextran solution on fusion between protoplasts isolated from *B. oleracea* var. *acephala* and *B. juncea*

Table 7. Cell division frequency of isolated protoplasts at 3 to 21 days after culture

Cultivers	Days after culture						colonies
	3	5	7	10	14	21	
<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

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 medium 을 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.

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 mannitol 과 glucose를 處理 比較한 바 glucose와 mannitol을 단일 처리하였을때 細胞分裂은 glucose 0.5M에서 52.4%, mannitol 0.5M에서는 48.2%로 나타났다(표 8).

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 0.1M을 稀釋 處理한 區에서는 35.0%의 細胞分裂이 일어났다.

즉, mannitol과 glucose를 단일 처리하였을

때 보다는 glucose 0.4M과 mannitol 0.1M을 混用하였을 때 細胞分裂을 더욱 尙장되었다.

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

Sugar concentration (M)	Glucose 0.5		Mannitol 0.5	
Gell 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
Gell division frequency (%)	63.5	45.4	46.9	35.0

9와 같았다.

(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 尙장하기 위해 auxin類 hormone인 2,4-D와 NAA를 處理한 結果는 표

2,4-D는 0.2~0.3mg/ℓ에서 細胞分裂을 效果의므로 尙進시켰으며, NAA는 0.5~1.0mg/ℓ에서 效果的이었으며, hormone의 濃度가 높아질 수록 細胞分裂은 尙해됨을 알 수 있었다.

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

Hormone	Concentration (mg/ℓ)								
	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

(4) Callus의 誘導

融合된 原形質體를 變形된 MS medium에서 liquid-agar layer culture를 실시하였는데, 3주 후부터 Colony가 形成되기 시작했다(사진 5).

Colony를 變形된 MS medium에서 mannitol을 제외하고 0.8%의 agar와 hormone으로 2,4-D 0.01mg/ℓ와 NAA 1.0mg/ℓ를 첨가한 培地로 옮겨 培養을 시켰는데, 4~5주후에 callus를 誘導해 냈다(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 증가하였으나, NAA의 處理는 濃度가 증가할 수록 再分化率은 다소 감소하였다.

Table 10. Effects of hormone concentration on 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	41	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

Calli의 再分化가 가장 좋은 hormone 處理區는 2,4-D 1.0mg/l와 NAA 0.3mg/l를 混用한 區이었다.

培養 3주후에 우량 개체를 選拔하여 MS medium에 NAA 0.1mg/l와 BA 1mg/l로 고정시킨 培地로 옮겨 2주 培養후에 shoot와 root를 完全히 가진 개체를 育成해었다(사진 7).

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 收率에 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 效果의임이 認定되었다.

酵素濃度가 原形質體 分離에 미치는 影響을 보면, *B. oleracea var. acephala*는 pectolyase Y-23

과 cellulase를 각각 0.5% 混用했을 때 原形質體의 收率에 높았으며, *B. juncea*는 macerosin R 1.0와 cellulase 2.0%를 混用處理하였을 때 收率에 높았다.

酵素濃度를 높였을 때는 각각 分離되는 原形質體의 收率은 높았으나 生存率에 떨어짐을 알 수 있었는데, Alan, Martin (1976) 等도 이와 같이 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 影響을 미치는데 (Power, Cummins; 1970, Senda et. al.; 1979), 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 完全 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)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 效果의인 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.

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에서 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*間的 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 영향을 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 0.2N 에서 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-A, NAA 가 heterokaryon plantlet 再分化에는 NAA, BA가 有用한 것으로 思料되었다.

參 考 文 獻

Alan, C. C. and B. Matin. 1976.

Enviromentally induced changes in the cell walls of tomato leaves in relation to cell and protoplast release, Phisiol, plant, 37 : 239.

Cocking, E. C. 1972. Plant cell protoplasts isolation and development, Ann. Rev. Plant physiol, 23 : 29~50.

Kao, K. N., Michayluk, M. R. 1974. A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts, Planta, 115 : 335~367.

Kao, K. N., Constable, F., Michayluk, M. R. Gamborg, O. L. 1974. Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cell, Planta, 120 : 215~227.

Kartha, K. K., M. R. Michayluk, K. N. Kao, O. L. Gamborg and F.

Constabel. 1974. Callus formation and plant regeneration from mesophyll protoplasts of rape plants *Brassica napus* cultivar Zephyr, Plant Sci. Lett. 3 : 265~271.

Li, L. C. and H. W. Kohlenbach. 1982. Somatic embryogenesis in quite a direct way in cultures of mesophyll protoplast of *Brassica napus*. Plant Cell Rep. 1 : 209~211.

Power, J. B., Cummins, S. E., Cocking, E. C. 1970. Fusion isolated plant protoplasts, Nature, 225 : 1016~1018.

Senda, M., Takeda J., Abe, S., Nakamura, T 1979. Induction of cell fusion of plant protoplasts by electrical stimulation, Plant & cell physiol, 20 : 1441~1443.

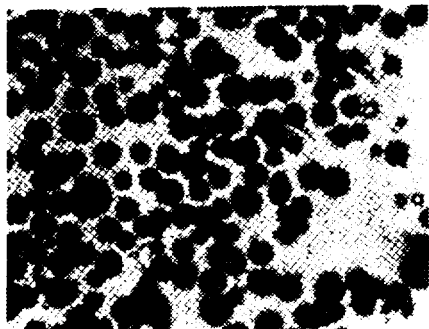


Photo.1

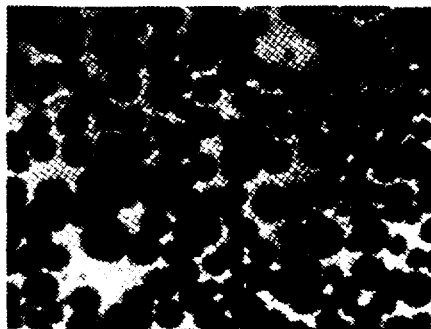


Photo.2



Photo.3

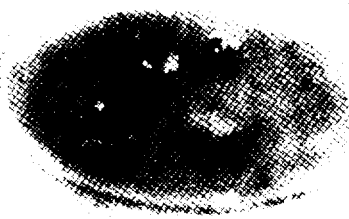


Photo.5



Photo.6

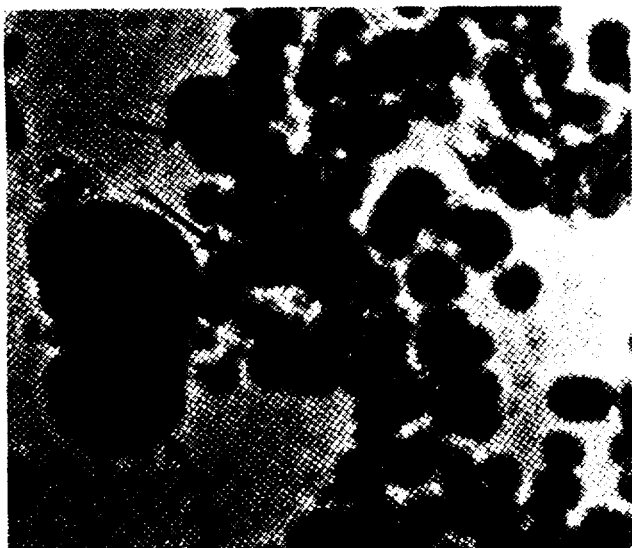


Photo.4

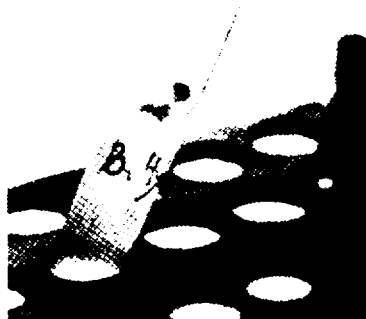


Photo.7

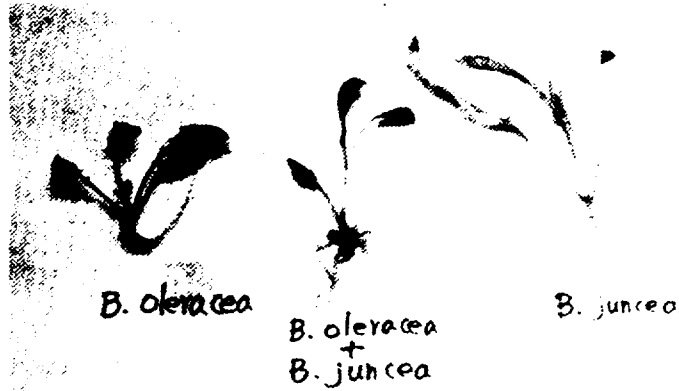


Photo.8

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.