

양배추 protoclone의 변이

이연희* · 조현석 · 김호일 · 나종현¹ · 이인원²

*농촌진흥청 농업과학기술원 생물자원부 세포유전과, ¹홍농종묘주식회사, ²서울대학교 농업생명과학대학

Protoclonal variation in cabbage (*Brassica oleracea* ssp. *capitata*)

LEE, Yeon Hee* · CHO, Hyun Suk · KIM, Ho il · NA, Jong hyun¹ · LEE, Yin-Won²

*Cytogenetics division, National Agricultural Science & Technology Institute, RDA, Suwon, 441-707, Korea: ¹Breeding & Research Station of Hungnong Seed Co.: ²College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Suwon, 441-744, Korea. *Corresponding author

Plants were regenerated from hypocotyl protoplast culture of cabbage (F₁ hybrid Green Challenger) and were transplanted on fields. The ploidy level of regenerated and seed-grown plants was measured by flow cytometry. In total 125 regenerated plants, diploid (2n), tetraploid (4n), and mixoploid (2n+4n) were 72.8%, 25.6%, and 1.6%, respectively. Most of the regenerated plants had normal phenotype, whereas several plants showed abnormal phenotype such as heavy leaf incision, savoy, and wave. The regenerated plants with abnormal phenotype and different ploidy level were analysed by isozyme and RAPD, but no significant difference was found.

Key words: ploidy level, flow cytometry, isozyme, RAPD

기내에서 배양된 캘러스나 원형질체로부터 재분화된 식물체에는 원 식물체에는 없는 변이가 흔히 일어난다. 이러한 현상은 담배(Lutz, 1966)와 사탕수수(Heinz and Mee, 1971)에서 보고된 이래 많은 작물에서 발견되고 있다. 특히 감자에서 식물체 및 괴경모양(Shepard et al., 1980), 역병 저항성(Behnke, 1979; Shepard, 1981)과 수확량 증대(Thomson et al., 1986)같은 특징들이 기내배양에 의한 체세포 변이를 통해서 얻어졌다. *Brassica oleracea*에서도 원형질체로부터 재분화된 식물체의 변이가 보고되었다. 꽃양배추 inbred 계통의 잎 원형질체로부터 재분화된 식물체에서는 curd의 크기, 색깔, 모양 등 농업적으로 유용한 특징을 갖고 있는 개체들이 있어 후대검정을 하였다(Jourdan et al., 1988). 그리고 정상적인 꽃양배추와 Ogura CMS (cytoplasmic male sterility) 세포질을 갖고 있는 꽃양배추 잎 원형질체로부터 재분화된 식물체의 형태적인 변이와 세포질 특성이 분석되었다(Jourdan et al., 1990). 양배추에서는 잎 원형질체로부터 재분화된 식물체의 염색체 수, 공변세포에서의 엽록체 수와 형태적 특징이 조사되었다(Xiong et al., 1988). Rapid cycling *B. oleracea* 잎 원형질체로부터 재분화된 식물체들도 형태적 특징, 개화시간, flow cytometry를 이용한 배수성(ploidy level) 측정으로 변이가 보고되었다(Hansen and Earle, 1994:

Cardi and Earle, 1995).

또한 조직배양을 거친 식물체들의 유전적인 안정성이나 변이를 알아보기 위해서 동위효소(isozyme)나 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 분석방법이 이용되었다. 캘러스 유래 somaclone들의 동위효소 분석에 대한 보고는 다음과 같다. *Solanum tuberosum*의 잎에서 유래된 캘러스로부터 재분화된 식물체(Allicchio et al., 1987), *Festuca arundinacea* (tall fescue)의 성숙배 유래 캘러스에서 재분화된 식물체들(Eizenga and Cornelius, 1991)과 *Allium trifoliatum* basal leaf 유래 캘러스에서 재분화된 식물체들이 여러 가지 동위효소로 분석되었다(Viterbo et al., 1992). 원형질체로부터 재분화된 protoclone의 경우에도 *Pyrus communis* (Ochatt et al., 1992)와 *Juglandifolia* spp. (Kochevenko et al., 1996)의 잎 원형질체로부터 재분화된 식물체들에 대해서 동위효소 분석을 하였다. RAPD 방법으로 Rani 등(1995)은 기내에서 대량증식된 *Populus deltoides*의 유전적인 안정성을 조사하였다.

본 실험에서는 양배추 배측 원형질체로부터 재분화된 식물체들 (R₀ protoclone)에 대한 형태적 특징을 조사하였다. Flow cytometry system을 이용하여 양배추 각 조직의 배수성을 측정하여 이를 토대로 R₀ protoclone들의 배수성을 조

사하였으며, 또한 isozyme과 RAPD 분석도 수행하였다.

재료 및 방법

Protophone의 형태적 특성검정

Lee 등(1995)에 의해 보고된 양배추(*Brassica oleracea* ssp. *capitata* Green Challenger) 배축 원형질체로부터 재분화된 식물체로서 홍농종묘 포장에서 재배하여 잎이 완전히 자라고 결구되기 전, 후로 잎을 중심으로 변이를 조사하였다. 후대종자는 4°C에서 60-90일 정도 저온 처리하여 추대시킨 후 자가 수분 시켜 얻었다.

배수성 분석

Protophone 잎을 채취하여 핵 분리 완충용액에 넣고 면도날을 이용하여 잘게 자른 다음 4 g/L의 DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole)를 포함하고 있는 DNA 염색용액 (Partec, Germany)을 첨가하였다. 현탁액을 30 µm 체로 거른 다음 PAS III flow cytometry (Partec, Germany)로 DNA를 분석하였다. 먼저 표준으로서 2배체 잎을 재료로하여 channel number 100에 peak를 정한 다음 측정할 시료를 투입하였다. 기계에 장착되어 있는 100 W 수은등에서 나오는 빛을 UG 1과 BG 38 filter로 통과시킨 후 TK 420, TK 560, TK 500 및 GG 435 filter를 조합하여 DNA를 분석하였다. Histogram은 PAS III system에 내장된 컴퓨터 분석에 의해 얻었다.

동위효소 분석

채취한 잎을 유발에 넣고 sea sand를 약간 첨가 후 미세하게 분쇄하였다. 증류수 100 µl와 PVP 40,000을 첨가한 다음 4°C, 12,000 rpm에서 20분 원심분리한 후 상등액을 채취하였다. 6% 폴리 아크릴 아마이드젤에 pH 4.0-6.5 pharmlalyte를 pH carrier로 사용하였다. Slab gel에 electrode strip을 사용하여 음극에는 0.8 M ethylene diamine 용액, 양극에는 0.7 M phosphoric acid 용액을 전극 완충용액으로 하였다. 동위효소 염색에 사용된 용액의 조성은 MDH (malate dehydrogenase)는 0.2 M Tris-base (pH 8.0) 90 mL, L-malic acid 0.45 g, 1% NAD (nicotineamide adenine dinucleotide) 2 mL, 0.5 M MgCl₂ 1 mL, 1% PMS (phenazine methosulfate) 0.5 mL, 1% MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-YL]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) 1 mL였다. PGM (phosphoglucomutase)의 경우에는 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) 90 mL, 0.5 M MgCl₂ 1 mL, 1% NADP (nicotineamide adenine dinucleotide phosphate) 1 mL, glucose-

1-phosphate 0.15 g, glucose-6-phosphate dehydrogenase 20 unit, 1% PMS 0.5 mL, 1% MTT 1 mL였다.

RAPD 분석

Protophone 잎으로부터 genomic DNA분리는 Shure 등 (1983)의 방법을 이용하였다. PCR 반응용액은 200 µM dNTP (deoxynucleotide triphosphate), 1.5 mM MgCl₂, template DNA 500 ng, Taq DNA polymerase 2.5 unit를 사용하였다. Primer로는 GC content가 60-70%인 10-mer random primer (Operon kit, OPA 4, 9, 10, 11, 13, 19, OPB 14, OPG 11, 17, OPH 12, 13, 18, 19, OPI 3, 11)를 100 ng 사용하였다. PCR cycle은 95°C에서 5분 동안 DNA를 predenaturation시키고, denaturation 95°C 1분, annealing 35°C 1분, extension 72°C 2분, 이 과정을 1 cycle로 40 cycle을 반복한 후 최종적으로 72°C에서 10분간 안정화시켰다. 반응이 끝난 다음 1.0% agarose gel에서 100 volt로 전기영동하여 DNA 밴드를 확인하였다.

결과 및 고찰

양배추 F₁ 그린첼린저 157개의 R₀ protopclone을 잎 모양을 중심으로 변이를 조사하였다. 대부분의 식물체는 대조구와 같은 특징을 나타냈으나 3개체는 초자, 엽형, 엽색은 같았으나 잎 결각이 심했고 한 개체는 잎 결각은 약간 있으면서 잎 표면의 요철과 잎의 파상이 심한 특징을 나타내었다 (Table 1, Figure 1). 보고된 꽃양배추 재분화 식물체의 경우 잎 원형질체로부터 재분화된 식물체의 curd 크기, 색깔 모양과 단단한 정도에서 변이를 나타낸 개체와 조기성숙을 보이는 계통이 있었다(Jourdan et al., 1988). 이들의 후대검

Table 1. Morphological variation in leaves of R₀ protoclones regenerated from hypocotyl protoplasts of *Brassica oleracea* ssp. *capitata*

	Leaf morphology					
	Leaf angle ^a	Leaf shape	Leaf color	Leaf incision ^b	Savoy ^b	Wave ^b
F ₁ (control)	4	round	blue green	1	1	2
Protophone No. 67,100 117	4	round	blue green	4	1	2
Protophone No. 72	4	round	blue green	2	4	4

^a1 (open) - 5 (erect).

^b1 (light) - 5 (heavy).



Figure 1. Morphological variation of leaves in R_0 protoclones.

- A: normal shape
 B: abnormal shape with leaf incision
 C: abnormal shape with heavy savoy and wave

정 결과 조기 성숙, 임실률 등이 원식물체보다 좋은 계통이 있었다고 하였다. Jourdan 등(1990)은 꽃양배추 Ogura CMS 세포질과 정상적인 세포질을 갖는 계통의 잎 원형질체로부터 재분화된 식물체 약 100개체를 분석하였다. 대부분 원계통과 같은 특징을 갖고 있었으나 일부는 정단액아(apical bud)가 퇴화되어 두꺼운 잎이 하나나 두 개 정도 나온 후 자라지 못한 개체들, 잎이 작고 가늘며 요철이 심한 개체,

Table 2. Ploidy level of different parts of seed-grown plants in *Brassica oleracea* ssp. *capitata*

Parts of plants	Ploidy level
7-day-old hypocotyl	mixoploid ^a
7-day-old cotyledon	mixoploid
4-week-old leaf	diploid ^b
8-week-old leaf	diploid
8-week-old petiole	mixoploid

^amixoploid : $2n + 4n$

^bdiploid : $2n$

잎 주변에 엽록체가 없는 개체, 잎에 노란 반점이 있는 개체들 그리고 많은 식물체에서 잎의 파상의 정도에 변이가 있었다고 하였다. 그러나 미토콘드리아 DNA에는 변이가 나타나지 않았다고 하였다. 브로콜리에서는 배축 원형질체로부터 재분화된 100개 이상의 식물체 중 대부분 형태적으로 정상이었으나 2 개체만이 성장이 저해되었다고 하였다 (Kao et al., 1990). Xiong 등(1988)은 양배추 잎 원형질체로부터 재분화된 식물체 300개체 이상을 염색체 수, 공변세포에서의 엽록체 수와 형태적 특징을 검사하였다. 그 결과 배수성과 형태에서 심한 변이를 나타내었고 원 식물체와는 달리 잎의 wax가 적은 형태도 있었다고 하였다. Rapid cycling *B. oleracea* 잎 원형질체로부터 재분화된 식물체의 변이도 보고되었다(Hansen and Earle, 1994). 그 특징들에는 조기 개화하는 개체, 안토시아닌 색소 생성이 증가되어 보라색 줄기와 엽병을 보이는 개체 그리고 심한 요철이 있는 잎을 가진 개체들이 있었다. 이렇게 원형질체로부터 재분화된 개체들에서는 다양한 형태적 변이를 나타내었다. 이들 변이는 원형질체 배양과정중에 첨가되는 배지조성 물질이나 각종 식물 성장조절제의 영향 그 밖의 기내에서의 미세 환경 등의 영향으로 발생할 수 있는 현상으로 생각된다.

Flow cytometry system을 이용하여 배수성을 측정할 식물체의 적정조직을 선별하기 위하여 먼저 양배추 각 조직의 배수성을 조사하였다. 그 결과 table 2에서와 같이 배축, 자엽과 엽병은 2배체와 4배체 세포가 혼합되어 존재하는 혼합배수체(mixoploid)였고 잎은 정상적인 2배체로 나타났다. 이들 2배체(diploid), 4배체(tetraploid), 혼합배수체는 Figure 2에 나타내었다. 2배체에서는 channel number 100의 peak가 높게 나타나고 200에서는 아주 낮게 나타났다. 이것은 잎 조직의 세포가 거의 2배체로 구성되어 있다는 것을 보여준다(Figure 2, A). 혼합배수체 조직일 경우에는 channel number 100과 200 모두에서 peak가 높게 나타나 2배체, 4배체 세포가 혼합되어 있다는 것을 알 수 있었다(Figure 2, B). 4배체일 때는 channel number 100에는 peak가 없고 200에서 peak가 높았는데 이것은 잎 조직이 4배체로 이루어졌다는 것을 알 수 있었다(Figure 2, C). Chen 등(1994)도 flow cytometry로 유채의 여러 조직의 배수성을 측정하였다. 잎

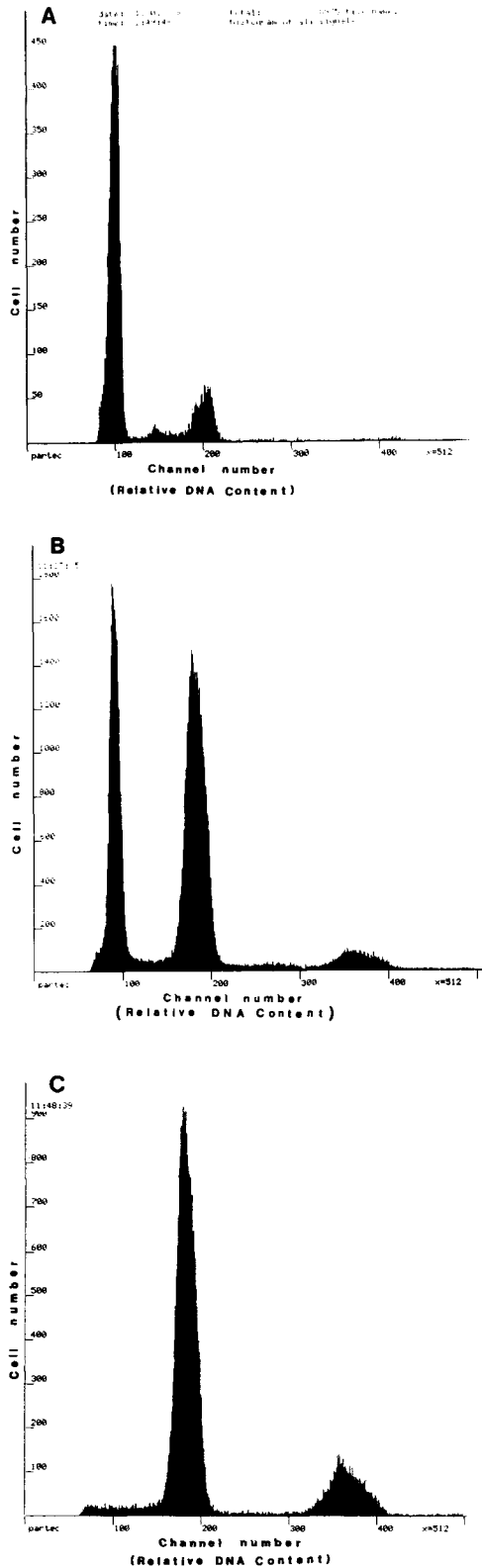


Figure 2. DNA histograms of DAPI-stained nuclear preparations of *Brassica oleracea ssp. capitata*.

A: leaves of 25-day-old seed-grown plantlets (diploid), B: cotyledons and hypocotyls (mixoploid) of 7-day-old seedlings, C: leaf tissues of tetraploid R_0 protoclones.

Table 3. Ploidy level in R_0 protoclones regenerated from hypocotyl protoplasts of *Brassica oleracea ssp. capitata*

No. of protoclones	Diploids	Tetraploids	Mixoploids
125	91 (72.8%)	32 (25.6%)	2 (1.6%)

은 2C, 자엽은 주로 2C와 4C 그리고 약간의 6C와 8C로 구성되어 있고 배측과 캘러스 조직에서는 16C도 존재하는 것으로 나타났다. 엽병은 4C 핵이 있는 세포들의 수가 비교적 많은 것으로 나타났다고 보고하였다. 또한 엽병조직의 나이에 따른 배수성 변화도 조사되었다. 1주된 엽병의 배수성은 주로 2C와 4C였고 4주된 엽병세포의 11%는 8C에 해당한다고 하였다. 이에 비해 온실에서 자란 16주된 식물체의 엽병은 4% 정도의 세포들이 16C였다고 하여 조직이 노화함에 따라 배수성도 증가한다는 것을 보여주었다. 실험 결과 잎이 가장 안정적이고 정상적인 2배체를 나타냈으므로 protoclone의 배수체는 같은 성장단계에 있는 잎을 사용하여 측정하였다. 모두 125개체를 측정된 결과 72.8%에 해당하는 91개체가 정상적인 2배체였고 4배체는 32개체로 25.6%, 혼합배수체는 2개체로 1.6%였다. 혼합배수체는 식물체가 성장하면서 2배체로 되었다(Table 3). 이러한 결과는 Hansen과 Earle (1994)이 rapid cycling *B. oleracea* 일 원형질체로부터 재분화된 protoclone들의 배수성을 flow cytometry로 측정된 결과 2배체 65%, 4배체 33%, 혼합배수체 2.5%였다고 한 것과 유사했다. 또한 Cardi와 Earle (1995)은 재분화 식물체 중 60%는 2배체였고 40%는 4배체였다고 보고하였다. 이렇게 원형질체 배양 후 4배체의 protoclone들이 나오는 이유는 원형질체 분리를 위한 효소처리와 배양 초기 과정에서 일어날 수 있는 일시적인 염색체 배가(doubling)나 융합으로 인한 것이라고 하였다. 그리고 혼합배수체는 원래의 2배체 식물체의 잎에 있는 4배체 세포들이 발달과정에서 나타난 현상이라고 하였다(Hansen and Earle, 1994). 본 실험에서는 2배체와 4배체 세포들이 혼합되어 있는 배측으로부터 원형질체를 분리하였으므로 4배체 세포가 분열하여 식물체로 재분화 되었을 가능성도 있을 것으로 생각된다. 이들 재분화 식물체를 자가 수분시켜 얻은 후대 종자를 받아서 잎, 배측, 자엽 및 엽병의 배수성을 조사한 결과 R_0 에서 4배체로 관찰된 재분화체의 후대 역시 4배체였고, 배측, 자엽과 엽병에서는 4배체와 8배체 세포가 혼합되어 있는 것으로 나타났다.

캘러스나 원형질체로부터 재분화된 식물체들의 변이는 동위효소나 RAPD 방법으로 조사되기도 한다. 본 실험에서는 정상적인 R_0 재분화 식물체, 형태적 변이가 있는 개체와 4배체로 측정된 protoclone들의 잎을 시료로 하여 PGM과 MDH 동위효소 분석을 하였다. PGM의 경우 pH 4.0-6.5 범위에서 이동거리에 따라 5종류의 밴드가 나타났다(Figure 3,

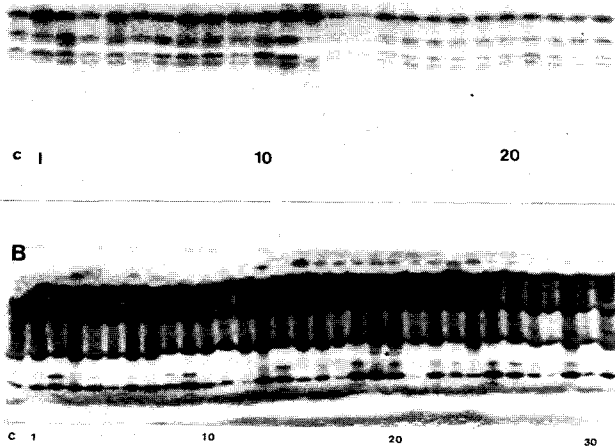


Figure 3. Isozyme patterns of R_0 protoclones from hypocotyl protoplasts of *Brassica oleracea* ssp. *capitata*.
 A: PGM (phosphoglucumutase): c: control F_1 plant, Lanes 1-24: R_0 protoclones, Lanes 1, 2, 4-16, 18-20, and 22-23: diploids, Lanes 3, 17, 21, and 24: tetraploids.
 B: MDH (malate dehydrogenase), c: control F_1 plant, Lanes 1-31: R_0 protoclones, Lanes 1-3, 5-17, 19-21, 23, 24, 26-28, 30, and 31: diploids, Lanes 4, 18, 22, 25, and 29: tetraploids, Lanes 15, 16, and 17: abnormal plants.

A). 2배체(Figure 3, A, lanes 1, 2, 4-16, 18-20, 22, 23)와 4배체 protoclone들(Figure 3, A, lanes 3, 17, 21, 24)의 PGM의 밴드는 종자에서 발아하여 나온 대조구와 같았다. pH 4.0-6.5 범위에서 MDH 동위효소를 종자에서 발아한 잎(control), 2배체(Figure 3, B, lanes 1-3, 5-17, 19-21, 23, 24, 26-28, 30, 31)와 4배체 protoclone들(Figure 3, B, lanes 4, 18, 22, 25, 29), 그리고 잎 결각이 있는 protoclone들(Figure 3, B, lanes 15, 16, 17)에서 분석하였다. 이들 protoclone들의 MDH 주 밴드 형태는 대조구와 동일하게 나타났다. 이렇게 원형질체로부터 재분화된 protoclone들의 동위효소 분석은 다른 식물체들에서도 수행되었는데 본 실험과 유사한 결론을 얻었다. *Pyrus communis* 두 품종의 잎 원형질체로부터 재분화

된 식물체들이 11개의 동위효소로 분석되었다 (Ochatt et al., 1992). 그 결과 원 식물체와 protoclone들 사이에 차이가 없어 재생체들의 유전적인 안정성을 보여주었다. *Juglandifolia* spp.의 잎 원형질체로부터 재분화된 2배체, 4배체 protoclone들도 EST (esterase)와 GOT (glutamate oxaloacetate transaminase) 밴드형태에 변화가 없었다 (Kochevenko et al., 1996).

PCR (polymerase chain reaction)을 이용한 RAPD 방법으로 재분화된 식물체들을 진단하기도 하는데 본 실험에서는 random primer (Operon)를 이용한 RAPD 방법으로 정상적인 R_0 재분화 식물체와 잎 형태에 변이가 있는 protoclone 3 개체를 비교 분석하였다. Primer OPA 9, 10, 11, 13, OPB 14, OPG 11, 17, OPH 18, 19, OPI 3, 11에서는 밴드 형태가 같았다(Figure 4, a-h, j-l, n, o). OPA 4와 OPH 12에서는 잎 형태에 변이가 있는 protoclone에서 밴드 형태가 다르게 나타났다(Figure 4, i, m). OPA 4에서 정상 식물체에는 없는 0.65 kb 밴드가 나타났고, OPH12에서는 정상 식물체에 있는 2.0 kb 밴드가 나타나지 않았다. 이것이 진정한 유전적인 변이인가를 확인하기 위해서 양배추 F_1 그린첼린저의 부계와 모계의 genomic DNA에 Southern blotting을 하였다. 그 결과 부계와 모계 밴드형태와 동일하게 나타나 유전적인 변이는 아닌 것으로 생각된다(data not shown). 또한 정상적인 2배체 재분화 식물체들과 4배체 재분화 식물체들에 대한 RAPD 분석을 하였다. 사용된 primer OPA 9, 13, OPH 13, 18에서 대조구와 DNA 밴드 형태가 같았다(Figure 5). 이러한 재분화 식물체들의 변이를 분자 생물학적으로 구분할 수 없었던 이유중의 하나는 적합한 선택 표지 인자가 없기 때문인 것으로 생각된다.

양배추 배축 원형질체로부터 얻어진 protoclone들은 일부 몇 개체를 제외한 대부분이 형태적으로 정상이었고 본 실험에서 조사된 동위효소와 RAPD 분석에서도 정상적인 것으로 나타났다. 특히 원형질체 배양과정 중에 일어나는 일시적인 융합 등으로 나타나는 4배체 식물체는 유전적으로 균일한 개체로 생각된다. Protoclone들의 배수성은 flow

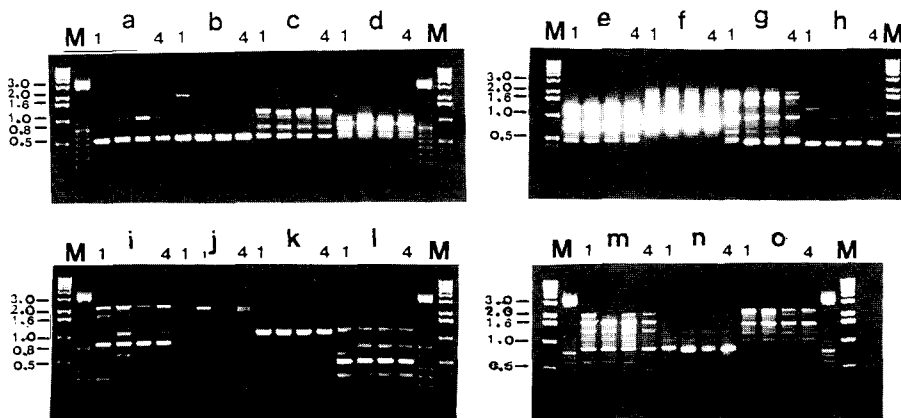


Figure 4. RAPD analysis of R_0 protoclones from hypocotyl protoplasts of *Brassica oleracea* ssp. *capitata* using random primers. M: DNA size marker, a: OPA 9, b: OPA 10, c: OPA 11, d: OPA 13, e: OPH 13, f: OPH 18, g: OPH 19, h: OPG 11, i: OPA 4, j: OPA 19, k: OPB 14, l: OPG 17, m: OPH 12, n: OPI 3, o: OPI 11, Lane 1: R_0 protoclone having normal leaf morphology, Lanes 2, 3, and 4: R_0 protoclones having abnormal leaf morphology.

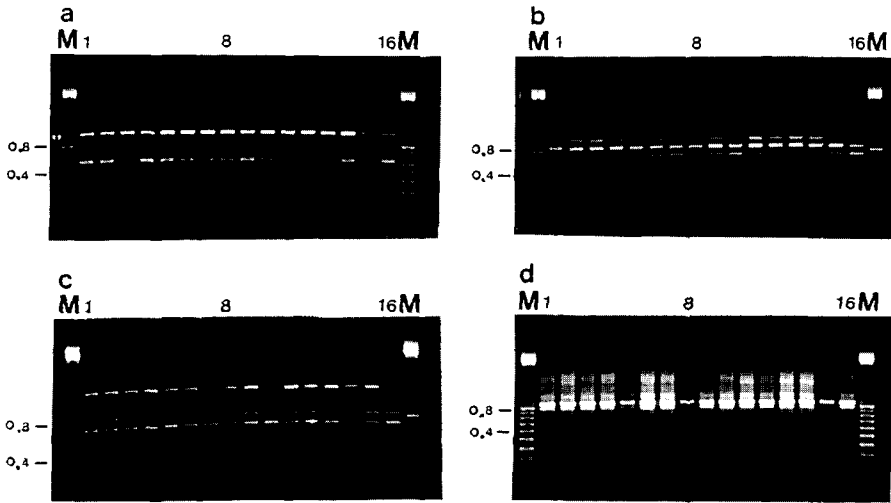


Figure 5. RAPD analysis of R_0 protoclones from hypocotyl protoplasts of *Brassica oleracea* ssp. *capitata* using random primers. a: OPA 9, b: OPA 13, c: OPH 13, d: OPH 18, M: 100bp DNA ladder marker, Lane 1: control, Lanes 2-16: R_0 protoclones, Lanes 2-5, and 7-14: diploids, Lanes 6, 15, and 16: tetraploids.

cytometry system을 이용하여 측정되었다. 또한 각 조직 세포들의 배수성을 토대로 세포들의 배수성과 세포분열 사이의 관계도 연구 할 수 있을 것으로 생각된다.

적 요

양배추 F_1 종자 그린 셀린저 배축으로부터 분리된 원형질 체로부터 재분화된 protoclone들에 대한 형태적 특성, 배수성, 동위효소, RAPD 분석으로 변이 양상을 살펴보았다. 형태적 특성은 초자(草姿), 엽형, 엽색, 엽결각, savoy, wave 등을 조사한 결과 대부분이 형태적으로 원식물체와 같았으나 3개체는 잎의 결각이 뚜렷하고 1개체는 savoy와 wave가 심하게 나타났다. Flow cytometry system으로 종자에서 정상적으로 발아한 배축, 자엽과 잎의 배수성을 측정한 결과 배축과 자엽에서는 2배체와 4배체 세포가 혼합되어 있었으나 잎에서는 일정하게 정상적인 2배체로 측정되었다. 잎을 재료로 하여 125개체 protoclone들의 배수성을 본 결과 2배체 91개체(72.8%), 4배체 32개체(25.6%), 혼합배수체 2개체(1.6%)로 나타났다. 또한 4배체를 나타내는 R_0 protoclone 개체를 자가수분시켜 얻은 종자를 발아시켜 배축, 자엽과 잎의 배수성을 측정한 결과 잎에서 4배체, 배축과 자엽에서는 4배체, 8배체 세포가 혼합되어 있었다. PGM과 MDH 동위효소 분석 결과 R_0 정상개체 그리고 변이를 나타낸 개체, 배수성이 다른 개체들간의 밴드양상은 같았으며 15종류의 random primer를 사용한 RAPD에서도 차이는 없었다.

인용 문헌

- Allicchio R, Antonioli C, Graziani L, Roncarati R, Vannini C (1987) Isozyme variation in leaf-callus regenerated plants of *Solanum tuberosum*. Plant Science Irish Republic 53: 1, 81-86
- Behnke M (1979) Selection of potato callus for resistance to culture filtrates of *Phytophthora infestans* and regeneration of resistant plants. Theor Appl Genet 55: 69-71
- Cardi T, Earle ED (1995) Plant regeneration from mesophyll protoplasts of 'rapid cycling' *Brassica oleracea* with 'Chiang' cytoplasm. Cruciferae Newsletter No 17: 24-25
- Chen Z, Hsiao KE-C, Borman CH (1994) Ploidy and division efficiency of petiolar protoplasts of *Brassica napus*. Hereditas 120: 41-46
- Eizenga GC, Cornelius PL (1991) Comparison of the isozyme variation in tall fescue parents and their somaclones. Euphytica 51: 249-256
- Hansen LH, Earle ED (1994) Regeneration of plants from protoplasts of rapid cycling *Brassica oleracea* L. Plant Cell Reports 13: 335-339
- Heinz DJ, Mee GWP (1971) Morphologic, cytogenetic, and enzymatic variation in *Saccharum* species hybrid clones derived from callus tissue. Amer J Bot 58: 257-262
- Jourdan PS, Dickson MH, Walters T, Mutschler MA, Earle ED (1988) Improvement of a cauliflower inbred through protoplast regeneration. Cruciferae Newsletter No 13: 80
- Jourdan PS, Earle ED (1986) Influence of genotype on the regeneration of plants from seedling mesophyll protoplasts of three *Brassica* species. Crucifer Genetics Workshop III, Proceedings, University of Guelph, Canada
- Jourdan PS, Earle ED, Mutschler MA (1990) Improved protoplast culture and stability of cytoplasmic traits in plants regenerated from leaf protoplasts of cauliflower (*Brassica oleracea* ssp. *botrytis*). Plant Cell Tissue and Organ Culture 21: 227-236
- Kao HN, Keller WA, Gleddie S, Brown GG (1990) Efficient plant regeneration from hypocotyl protoplasts broccoli (*Brassica oleracea* L. ssp. *italica* Plenck). Plant Cell Reports 9: 311-315
- Kochevenko AS, Ratushnyak YI, Gleba YY (1996) Protoplast culture and somaclonal variability of species of series *Juglandifolia*. Plant Cell

Tissue and Organ Culture **44**: 103-110

- Lee YH, Cho HS, Suh SC, Kim Ho il** (1995) Plant regeneration from hypocotyl-derived protoplasts of *Brassica oleracea* var. *capitata*. Korean J Plant Tissue Culture **22**: 7-11
- Lutz A** (1966) Obtention de plantes de tabac a partir de cultures unicellulaires provenant d'une souche énergiee. C R Acad Sc Paris **262**: 1856-1858
- Ochatt SJ, Chevreau E, Gallet M** (1992) Organogenesis from 'Passe Crassane' and 'Old Home' pear (*Pyrus communis* L) protoplasts and isozymatic trueness-to-type of the regenerated plants. Theor Appl Genet **83**: 1013-1018
- Rani V, Parida A, Raina SN** (1995) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. Plant Cell Reports **14**: 459-462
- Shepard JF** (1981) Protoplasts as source of disease resistance in plants. Ann Rev Phytopathol **19**: 145-166
- Shepard JF, Bidney D, Shalin E** (1980) Potato protoplasts in crop improvement. Science **208**: 17-24
- Shure M, Wessler S, Federoff N** (1983) Molecular identification of the waxy locus in maize. Cell **35**: 225-233
- Thomson AJ, Gunn RE, Jellis GI, Boulton RE, Lacey CND** (1986) The evaluation of potato somaclones, In J Semal, eds, Symposium "somaclonal variations and crop improvement", Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht/Boston/Lancaster, pp 236-243
- Viterbo A, Rabinowitch HD, Altman A** (1992) Plant regeneration from callus cultures of *Allium trifoliatum* subsp. *hirsutum* and assessment of genetic stability by isozyme polymorphism. Plant Breeding **108**: 265-273
- Xiong X, Jia S, Fu Y** (1988) Protoclonal variation in cabbage(*Brassica oleracea* L. var *capitata*). Acta Horticulturae Sinica **15**: 120-124

(1997년 4월 1일 접수)