

細胞工學을 利用한 植物改良

尹 義 洙 · 李 鍾 一

順 天 大 學

Improvement of Plants by Biotechnology

Eui Soo Yoon , Jong Il Lee

Dept. of Oriental Medicine Resources, Suncheon National University,

315 Maegok-dong, Suncheon 540-070 Korea

Abstract

The traditional plant improvement methods consisted of pure line selection, cross breeding, heterosis breeding, polyploid breeding, mutation breeding, ect. Biotechnology is divided into gene splicing, monoclonal antibodies, protein engineering, agricultural research, and microbiological engineering. Of these, high plants deal with agricultural research, and the important part of which is tissue culture and cell culture. Tissue culture and cell culture are again divided into embryo culture, test tube fertilization, anther and pollen culture, somatic hybridization, transformation, recombination, recombinant DNA molecule, hybrid plasmid, ect. For these haploid production, protoplast culture, protoplast fusion, selection and propagation, ect., the technical settlement is needed.

諸 言

生物이 가지고 있는 여러가지 機能을 人間의 欲求에 맞도록 利用 하기도 하고, 改造 하기도 하는 것이 Biotechnology이다. 맛있는 쌀이나, 아름다운 백합, 채소나, 과일도 전부 育種에 의하여 생겨나고 改良 되어 졌다.

現在の 植物 育種은 대개 다음과 같은 過程에 의하여 행하여 지고 있다.

- 1) 育種 目標와 育種法의 決定
- 2) 遺傳子源의 探索, 道入, 選定
- 3) 遺傳變異의 作出 (交雜 및 突然變異)
- 4) 有望系統의 選拔과 固定
5. 新品種의 維持, 增植

그러나, 現在 행하여 지고 있는 育種의 基本은 近緣植物間에 存在하는 形質의 組合이나 微小한 變異의 果積으로 限界가 있다.

따라서, 細胞·組織培養에 의한 育種을 中核으로 하여, DNA 組換技術, T₁ plasmid, cauliflower mosaic virus(CaMV) 등을 이용한 直接的인 遺傳子 導入 技術開發 및 細胞融合등이 새로운 育種의 可能性을 시사하고 있다.

實際로 in vitro selection 技術 및 protoclone으로 부터 감자, 사탕수수, 토마토 등의 優良系統이 作出되어졌다. 또한 somatic embryogenesis의 유발에 의한 벼, 보리, 콩등의 育種과, 藥培養을 利用한 半數體 育種法, 細胞融合에 의한 細胞質

雄性 不稔性的 作出 등이 注目을 받고 있으며, 今後, 細胞·組織培養을 基盤으로 하여 細胞融合 및 DNA 組換 技術에 의한 遺傳子 道入技術의 急速한 進歩가 있을 것이다.

보통, 細胞工學에 의한 育種은

- 1) 組織培養을 主로한 somatic embryogenesis, somaclonal variation, induced mutation.
- 2) 莖頂培養
- 3) 藥 및 花粉培養
- 4) 遺傳子의 道入 (細胞融合, 遺傳工學 microinjection, razor 光線法)

등을 들 수 있다. DNA 組換, 細胞融合技術 및 培養過程에 있어서의 突然變異의 誘發은, 細胞의 遺傳質을 바꾸어, 새로운 細胞質-核의 相互關係를 통하여, 變異의 擴大를 꾀한다. 또한 microinjection의 手法은 染色體의 一部, 葉綠體, DNA, TMV, 色素등을 細胞로 道入하게 되었다.

본 논문에서는 이러한 細胞工學的 技術과 品種 개량과의 關係를 문헌적 조사를 통하여 고찰해 보고자 하였다.

器官培養의 利用

培養細胞를 이용한 試驗管 育種技術은, 變異의 擴大, 選拔, 遺傳的 固定등을 細胞 Level에서 행한다. 기존의 個體 Level에서의 育種 System과 비교하여 變異의 幅을 擴大하거나, 有用形質을 選拔하거나, 遺傳形質의 固定을 短期間에 행할 수 있는 효율

적인 技術로서 확립될 수 있다. 表1은 각종 組織培養을 이용한 試驗管育種 體系를 나타 내었다.

遠緣의 植物間의 支配에서는, 花粉의 發芽抑制, 花粉管의 伸長抑制, 雜種胚의 發育不全, 崩壞等の 現象에 의해 雜種 個體의 育成이 困難하였다. 이러한 不和合性 또는 不親和性을 克服하기 위하여 test-tube fertilization (表2)과 雜種胚를 摘出培養하는 技術이 擴大, 發展되었다. (表3).

組織培養은 變異의 폭의 擴大에는 도움이 되지만, 그중에서 選拔培地를 利用하는 것에 의해 細胞 Level에서의 選拔을 통하여, 有用物質을 갖는 變異 細胞系를 얻을 수가 있다. in vitro selection 에서는 positive selection 또는 negative selection을 이용하지만, 직접 圃場에서 選拔하는 경우도 많다. (Negrutiu *et al* and Chaleff)^{29,30)}

세포 Level에서의 選拔은, 病害 (病原菌의 toxin-analogue, elicitor), 不良環境, 除草劑, 抗生物質, 核酸 analogue, 鹽素酸鹽, Allyl alcohol 등에 抵抗성을 갖는 變異細胞系가 作出되었다 (表4).

그러나, Amino acid 過剩產出을 위시하여 培養細胞에 있어서의 유용한 變異가 遺傳的인가, 단순한 epigenetic change 인가는 매우 重要하다. 또한 invitro selection에 의해 目的形質의 變異體가 作出되더라도 다른 중요한 量的形質에 바람직스럽지 못한 形質이 發現하는 경우가

많다. 현재로 除草劑耐性^{31,32)}, 病害toxin耐性 植物^{33,34)}이 protoplast를 이용하여 얻어졌으며 표 5,6에서 처럼 많은 種類에서 再生이 가능하게 되어졌다.

培養細胞에 생긴 染色體 變異는 榮養繁殖作物에서는 實用성이 높지만, 種子繁殖作物에서는 種子 稔性이 低下하는 것이 많아 별로 有用성이 없다. 또한 特定の 形質에 관련된 遺傳子 突然變異도 특별한 造發 처리를 하지 않아도 매우 높은 頻度로 나타난다. (表7).

또한 asparagus에 있어서는 雌雄異株로써 숫컷이 씩이 잘트고 Vitamin도 풍부하다. 따라서 숫컷만이 莖頂培養에 의해 우수한 형질의 숫컷만을 大量增殖시킬 수 있다. 이와같이 生長點培養에 의해 Virus free株나 우수한 품질의 苗의 大量增殖이 異樹, 蔬菜, 鑑賞用植物에서 行하여 질수 있는 점에서 매우 중요한 育種 方法의 하나이다.

Table 1. Comparison of conventional breeding and test tube breeding

	Breeding process				
	Variation	Fixation	Selection	Propagat- ion	Gene pres- ervation
Conventional breeding	Mutation	Pedigree	Genotype	Seed	Low temper- ature stor- age
(Intact plant)	Hybridiza- tion Recombination Ploidy	Bulk	Phenotype	Vegetative propagat- ion	Conservati- ve cultivat- ion
Organ	Embryo culture		Meristem culture (virus free)	Clonal multipli- cation	
	Test-tube fertiliza- tion				
Tissue and Cell	Mutation	Anther and pollen culture	Cultural environm- ent Genotype	Clonal multipli- cation	Freeze stoage in super-low temperature
	Somatic hybridiza- tion				
Test tube breeding	Transform- ation		Phenotype		
Organelle	Mutation			Organelle culture	
	Recombina- ion(Upta- king)				
Molecule	Recombina- nt DNA molecule	Gene cloning	Colony hybridizat- ion	Gene amplifi- cation	Freezing
	Hybrid plasmid		Hybridizat- ion		Lyophiliz- ing bacteria

Table 2. List of test-tube fertilization have been Successfully cultured

Plant species	Reference
<i>Eschscholizia californica</i>	Kanta and P.Maheshwari, 1963
<i>Petunia violacea</i>	Shivanna, 1965
<i>Nicotiana tabacum</i>	Dulieu, 1966
<i>Brassica oleracea</i>	Kameya, Hinata and Mizushima, 1966
<i>Petunia axillaris</i>	Rangaswamy and Shivanna, 1967
<i>Papaver orientale</i>	Nakashima, 1968

Table 3. List of Breeding by embryo culture

Genus name	References
embryo of interspecies	
<i>Phaseolus</i>	Honma, 1955
<i>Brassica</i>	Nisi, 1959
<i>Linum perrenne</i>	Laibach, 1925
× <i>L. austriacum</i>	
<i>Iris</i>	Lenz, 1954, Werckmeister, 1936
<i>Oryza</i>	Nakasima <i>et al.</i> 1958, Liet <i>et al.</i> 1961, Bouhermont, 1961, Lyer <i>et al.</i> 1964
<i>Hordeum satium</i>	Konzak <i>et al.</i> 1959, Morrison <i>et al.</i> 1959,
× <i>H. bulbosum</i>	Davies, 1960, Schooler, 1962
<i>Cucurbita pepo</i>	Wall, 1954
× <i>C. moschata</i>	
<i>Chrysan themum</i>	Kaneko, 1957
<i>Melilotus alba</i>	Webster, 1955, Schlosser-Szigat, 1962
× <i>M. officinalie</i>	
<i>Trifolium</i>	Keim, 1953., Evans, 1962
<i>Datura</i>	Blakeslee <i>et al.</i> 1944., McLean, 1946

Genus name	References
<i>Lycopersicum esculentum</i>	Smith, 1944., Emsweller <i>et al</i> .1968
× <i>L. peurianum</i>	
<i>Solanum nigrum</i>	Jørgensen, 1928
× <i>S. luteum</i>	
<i>Hibiscus</i>	Patil, 1966., Gadwal <i>et al</i> .1968
<i>Pinus</i>	Stone <i>et al</i> .1950
<i>Lotus</i>	Grant <i>et al</i> .1962
<i>Lilium</i>	Skirum, 1942., Emsweller <i>et al</i> .1962
<i>Lathyrus</i>	Pecket <i>et al</i> .1965
<i>Gossypium davidsonii</i>	Skovsted, 1935., Beasley, 1940
× <i>G. sturtii</i>	
embryo of intergeneric hybrid	
<i>Hordeum</i> × <i>Triticum</i>	Islam <i>et al</i> , 1975, Fedak, 1977
<i>Hordeum jubatum</i>	Brink <i>et al</i> .1944, Morrison <i>et al</i> , 1959.
× <i>Secale cereale</i>	
<i>Triticum timophevi</i>	Hall, 1954, 1956, Rédei, 1955., Watanabe <i>et al</i> .1959
× <i>Secale cereale</i>	
<i>Triticum durum</i>	Iwanovskaya, 1946, 1962
× <i>Elymus arenarius</i>	
<i>Tripsacum</i> × <i>Zea</i>	Farguharson 1957
<i>Ribes</i> × <i>Grossularia</i>	Kravtson, 1968
dormant embryo	
Fruit tree of Rosaceae	Von Veh, 1936., Tukey, 1933, 1938, 1944, Skirum, 1942, Nickell, 1951, Zámíikovskaja, 1954
<i>Rosa</i>	Lammerts, 1946., Asen, 1948
<i>Iris</i>	Randolph <i>et al</i> , 1943
<i>Avena</i>	Simpson, 1965
<i>Drosophyllum</i>	DoreSwamy <i>et al</i> , 1967
<i>Elais</i>	Rabéchault, 1967
<i>Musa</i>	Cox <i>et al</i> .1960

Table 4. Mutant cell lines with economic value.

Plant species	Selection	References
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AEC	Negrutiu <i>et al.</i> (1978)
<i>Capsicum annuum</i>	Chilling	Dix <i>et al.</i> (1976)
	NaCl	Dix <i>et al.</i> (1975)
<i>Daucus carota</i>	2,4- D	Widholm (1977)
	Hydroxyproline	Widholm (1976)
	5MT	Widholm (1974)
	Lysine + threonine	Cattoir <i>et al.</i> (1983)
<i>Datura innoxia</i>	Aminopterin	Mastrangelo <i>et al.</i> (1977)
	5MT	Ranch <i>et al.</i> (1983)
<i>Glycine max</i>	2,4-D	Davidnis <i>et al.</i> (1982)
<i>Haplopappus gracilis</i>	6-Azauracil	Jones <i>et al.</i> (1979)
<i>Hyoscyamus muticus</i>	Temperature	Kings <i>et al.</i> (1982)
	Histidine requ- iring	Shimamoto <i>et al.</i> (1983)
<i>Hordeum vulgare</i>	NaCl	Orton (1980)
<i>Hordeum jubatum</i>		
<i>Lotus corniculatus</i>	2,4-D	Swanson <i>et al.</i> (1980)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Alminum	Meredith (1978)
<i>Medicago sativa</i>	Ethionine	Reisch <i>et al.</i> (1978)
	NaCl	Groughan <i>et al.</i> (1978)
<i>Nicotiana tabacum</i>	AEC	Chalef <i>et al.</i> (1975), Widholm (1976)
	Amitrole	Singer <i>et al.</i> (1984)
	8-Azaguanine	Lescure (1973)
	Carboxin	Polacco <i>et al.</i> (1977)
	Chlorate	Evola (1983), Muller <i>et al.</i> (1978)
	Deltahydroxy- lysine	Widholm (1976)

Plant species	Selection	References
	Hydroxyurea	Chaleff <i>et al.</i> (1982), Keil <i>et al.</i> (1983)
	Isonicotinic acid hydrazide	Berlyn(1980)
	Methotrexate	White(1982)
	5MT	Widholm(1978)
	NaCl	Nabors <i>et al.</i> (1975)
	PFP	Flick <i>et al.</i> (1981)
	Picloram	Chaleff <i>et.</i> (1978)
	Selenocystine	Flashman <i>et al.</i> (1981)
	Selenomethio- nine	Flashman <i>et al.</i> (1978)
	Streptomycine	Maliga <i>et al.</i> (1973,1981)
<i>Nicotiana sylvestris</i>	Chilling	Dix <i>et al.</i> (1976,1977)
	2,4-D	Zenk(1974)
	Kanamycine	
	AEC,5MT	White <i>et al.</i> (1979)
	NaCl	Dix <i>et al.</i> (1975)
<i>Oryza sativa</i>	AEC	Chaleff <i>et al.</i> (1975), Schaeffer <i>et al.</i> (1981,1984)
<i>Saccharum officinarum</i>	Helminthospo- roside	Heinz <i>et al.</i> (1977)
	NaCl	Liu <i>et al.</i> (1982)
<i>Solanum tuberosum</i>	5MT	Widholm(1977)
<i>S. nigrum</i>	Atrazine	Binding <i>et al.</i> (1982)
<i>Triforium repens</i>	Phenoxy analogue(2,4-D; 2,4,5,T;2,4,DB)	Oswald <i>et al.</i> (1977)
<i>Triticum aestivum</i>	5MT	Widholm(1977)

Plant species	Selection	References
<i>Zea mays</i>	Azatidine carboxylic acid	King <i>et al.</i> (1978)
	AEC	King <i>et al.</i> (1978)
	Lysine + threonine	Hibberd <i>et al.</i> (1982)

AEC: S-Aminoethyl-L-cysteine, 5MT: 5-Methyltryptophan
 PEP: P-Fluorophenylalanine.

Table 5. Species from which protoplasts were isolated and cultured to form plant.

Plant species	References
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Xunal <i>et al.</i> (1980), Binding <i>et al.</i> (1981)
<i>Asparagus officinalis</i>	Bui-Dang-Ha <i>et al.</i> (1975)
<i>Atropa belladonna</i>	Lôrz <i>et al.</i> (1979)
<i>Brassica napus</i>	Kartha <i>et al.</i> (1974) Thomas <i>et al.</i> (1976), Kohlenbach <i>et al.</i> (1982)
<i>Bromus inermis</i>	Kao <i>et al.</i> (1973)
<i>Capsicum annuum</i>	Saxena <i>et al.</i> (1981)
<i>Cichorium intybus</i>	Crepy <i>et al.</i> (1982)
<i>Crotalaria juncea</i>	Rao <i>et al.</i> (1982)
<i>Citrus sinensis</i>	Vardi(1978)
<i>Datura innoxia</i>	Schieder(1977)
<i>Daucus carota</i>	Dudits <i>et al.</i> (1976)
<i>Gaillardia grandiflora</i>	Binding <i>et al.</i> (1981)
<i>Helianthus annuus</i>	Binding <i>et al.</i> (1981)
<i>Hyoscyamus musticus</i>	Wernicke <i>et al.</i> (1980)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Morgan <i>et al.</i> (1982)
<i>Lycopersicon peruuiantum</i>	Mühlbach(1980), Imanishi <i>et al.</i> (1983)
<i>Medicago coerulea</i>	Arcioni <i>et al.</i> (1982)
<i>Medicago glutinosa</i>	Arcioni <i>et al.</i> (1982)
<i>Medicago sativa</i>	Dos Santos <i>et al.</i> (1980), Kao <i>et al.</i> (1980), Johnson <i>et al.</i> (1981), Lu <i>et al.</i> (1982)
<i>Nemesia strumosa</i>	Hess <i>et al.</i> (1979)
<i>Nicotiana acuminata</i>	Bourgin <i>et al.</i> (1979)
<i>Nicotiana alata</i>	Bourgin <i>et al.</i> (1979), Nagao(1979)
<i>Nicotiana debneyi</i>	Piven(1981)
<i>Nicotiana forgettiana</i>	Passiatore <i>et al.</i> (1981)
<i>Nicotiana glauca</i>	Bourgin <i>et al.</i> (1979)
<i>Nicotiana glutinosa</i>	Nagao(1983)

Plant species	References
<i>Nicotiana langsdorffii</i>	Bourgin <i>et al.</i> (1979)
<i>Nicotiana longiflora</i>	Bourgin <i>et al.</i> (1979)
<i>Nicotiana nesophila</i>	Evans(1979)
<i>Nicotiana otophora</i>	Banks <i>et al.</i> (1976)
<i>Nicotiana paniculata</i>	Bourgin <i>et al.</i> (1979)
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	Gill <i>et al.</i> (1979)
<i>Nicotiana repanda</i>	Evans(1979)
<i>Nicotiana rustica</i>	Gill <i>et al.</i> (1979)
<i>Nicotiana sanderae</i>	Passiatore <i>et al.</i> (1981)
<i>Nicotiana stocktonii</i>	Evans(1979)
<i>Nicotiana sylvestris</i>	Banks <i>et al.</i> (1976)
<i>Nicotiana sylvestris</i> (haploid)	Facciotti <i>et al.</i> (1979)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Nagata <i>et al.</i> (1971)
<i>Nicotiana tabacum</i> (haploid)	Nitsch <i>et al.</i> (1971)
<i>Nigella arvensis</i>	Binding <i>et al.</i> (1981)
<i>Panicum maximum</i> Jacq.	Binding <i>et al.</i> (1981)
<i>Pennisetum americanum</i>	Vasil <i>et al.</i> (1980)
<i>Petunia parodii</i>	Hayward <i>et al.</i> (1975)
<i>Petunia hybrida</i>	Durand <i>et al.</i> (1973), Wen-pin <i>et al.</i> (1978)
<i>Ranunculus scleratus</i>	Dorion <i>et al.</i> (1975)
<i>Raseda luteola</i>	Binding <i>et al.</i> (1981)
<i>Salpiglossis sinuata</i>	Boyes <i>et al.</i> (1980)
<i>Senecio vulgaris</i>	Binding <i>et al.</i> (1980)
<i>Solanum dukcamara</i>	Binding <i>et al.</i> (1977)
<i>Solanum melongena</i>	Jing-fen Jia <i>et al.</i> (1981), Saxena <i>et al.</i> (1981)
<i>Solanum nigrum</i>	Nehls(1978)
<i>Solanum tuberosum</i>	Shepard <i>et al.</i> (1977), Binding <i>et al.</i> (1978), Thomas <i>et al.</i> (1982), Wenzel <i>et al.</i> (1979)
<i>Solanum xanthocarpum</i>	Saxena <i>et al.</i> (1982)
<i>Trifolium repens</i>	Gresshoff(1980)
<i>Digitalis lanata</i>	Li(1982)
<i>Digitalis meteloides</i>	Schieder(1977)

Plant species	References
<i>Digitalis metal</i>	Schider(1977)
<i>Daucus carota</i>	Grambow <i>et al.</i> (1972)
<i>Lycopersicon peruvianum</i>	Zapata(1980,1981)
<i>Marchantia polymorpha</i>	Ono(1979)
<i>Medicago coerulea, glutinosa</i>	Arcioni <i>et al.</i> (1982)
<i>Nicotiana varia, borealis</i>	Mezentseu(1982)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Li <i>et al.</i> (1981)
<i>Nicotiana tabacum</i> su/su	Flick(1981)
<i>Nicotiana</i> SPP.	Bourgin <i>et al.</i> (1979)
<i>Pelargonium hortorum</i>	Kameya(1975)
<i>Pennisetum americanus</i>	Vasil <i>et al.</i> (1980)
<i>Petunia axillaris</i>	Power <i>et al.</i> (1976)
<i>Petunia parviflora</i>	Sink <i>et al.</i> (1977)
<i>Petunia violacea</i>	Power <i>et al.</i> (1976)
<i>Sinapis alba</i>	Xu <i>et al.</i> (1982)
<i>Solanum tuberosum</i>	Bokelmann <i>et al.</i> (1982)
<i>Solanum tuberosum</i>	Thomas(1982)
<i>Nicotiana glauca</i> × <i>N. longsdorfii</i>	Carlson <i>et al.</i> (1972)
<i>N. rustica</i> × <i>N. tabacum</i>	Douglas(1981)
<i>N. tabacum</i> × <i>N. glauca</i>	Banks <i>et al.</i> (1976)
<i>N. sylvestris</i> × <i>N. glauca</i>	Banks <i>et al.</i> (1976)
<i>Petunia hybrida</i> × <i>P. parodii</i>	Power <i>et al.</i> (1977)
<i>Solanum phytolaja</i> × <i>S. chacoense</i>	Grun <i>et al.</i> (1978)

Table 6. Species in which adventitious buds, embryoids or whole plants were produced by means of tissue culture in gramineous plants.

Plant species	References
<i>Avena sativa</i>	Cummings <i>et al.</i> (1976), Heysey <i>et al.</i> (1982)
<i>Dactylis glomerata</i>	McDaniel <i>et al.</i> (1982), Hanning <i>et al.</i> (1982)
<i>Oryza sativa</i>	Nishi <i>et al.</i> (1968), Kawata <i>et al.</i> (1968), Bhattacharya <i>et al.</i> (1980), Wernicke <i>et al.</i> (1981), Yan <i>et al.</i> (1982)
<i>Hordeum vulgare</i>	Cheng <i>et al.</i> (1975), Dale <i>et al.</i> (1979)
<i>Panicum maximum</i>	Lu <i>et al.</i> (1981)
<i>Panicum miliaceum</i>	Heyser <i>et al.</i> (1982)
<i>Pennisetum americanum</i>	Vasil <i>et al.</i> (1981)
<i>Pennisetum purpureum</i>	Haydu <i>et al.</i> (1981)
<i>Sorghum bicolor</i>	Thomas <i>et al.</i> (1977), Wernicke <i>et al.</i> (1980), Brettell <i>et al.</i> (1980)
<i>Triticum aestivum</i>	Shimada(1978), Shimada <i>et al.</i> (1979), Sears <i>et al.</i> (1982), Ozias-Akins <i>et al.</i> (1982), Karp <i>et al.</i> (1984)
<i>Zea mays</i>	Green <i>et al.</i> (1975), Lu <i>et al.</i> (1982)

Somatic embryogenesis의 利用

Steward(1958)⁷⁵⁾가 Somatic embryo의 形成을 最初로 發見한 以來 많은 植物의 體細胞에서 Somatic embryo의 形成에 대한 報告가 증가되어 왔다 (表8). 또한 液體培養에서의 不定胚는 再生態力이 높은 protoplast의 作出에도 좋은 材料이며⁷⁶⁾ 人工種子의 개발에 있어서 重要的

構成因子的 하나이다.¹²⁸⁾ 人工重子の 構造에는 大量으로, 또한 同調的으로 Somatic embryo를 作出해야 할 필요가 있으나, 90% 以上の 높은 빈도로 somatic embryo를 分化하는 實驗系가 確立되어져 있다.⁷⁷⁾

植物의 組織으로 부터, 直接的으로 somatic embryo를 形成하는 것과, embryogenic callus를 거쳐 somatic embryo를 形成, 植物體로 發達하는 것도 있다.

Table 7. Changes of characters of mutants in D_2 line derived from panicles of D_1 plants regenerated from rice calluses^{a)}

Mutated characters ^{b)}	No. of lines	%
Normal	214	28.1
Ploidy (4x)	12	1.6
Fer.	273	35.8
Ht.	19	2.5
Hd.	3	0.4
Mor.	1	0.1
Ch.	27	3.5
Fer. & Ht.	74	9.7
Fer. & Hd.	14	1.8
Fer. & Mor.	7	0.9
Fer. & Ch.	59	7.7
Ht. & Ch.	3	0.4
Hd. & Ch.	1	0.1
Mor. & Ch.	1	0.1
Fer., Ht. & Hd.	11	1.4
Fer., Ht. & Mor.	2	0.3
Fer., Ht. & Ch.	27	3.5
Fer., Hd. & Ch.	2	0.3
Fer., Mor. & Ch.	1	0.1
Fer., Ht., Hd. & Mor.	1	0.1
Fer., Ht., Hd. & Ch.	9	1.2
Fer., Ht., Mor. & Ch.	1	0.1
Total	762	100

a) After cono et al.

b) Abbreviations for the mutated characters are as follows: Fer; seed fertility, Ht.; plant height, Hd.; heading date, Mor.; morphological traits, ch.; Chlorophyll deficiency.

Table 8. Somatic embryo plants obtained by somatic embryogenesis

Plant species	Reference
<i>Apium graveolense</i>	Zee <i>et al.</i> (1979)
<i>Asparagus officinalis</i>	Reuther (1977)
<i>Avena sativa</i>	Heyser <i>et al.</i> (1982)
<i>Brassica oleracea</i>	Pareek <i>et al.</i> (1978)
<i>Carica papaya</i>	de Bruijne <i>et al.</i> (1974)
<i>Carum carvi</i>	Furmanova <i>et al.</i> (1984)
<i>Citrus sinensis</i>	Kochba <i>et al.</i> (1973) Vardi <i>et al.</i> (1975) Kobayashi <i>et al.</i> (1965)
<i>Coffea arabica</i>	Sondahal <i>et al.</i> (1977)
<i>Cucurbita pepo</i>	Jelaska (1974)
<i>Cyamopsis tetragonoloba</i>	McHughen <i>et al.</i> (1984)
<i>Daucus carota</i>	Reinert (1958) ; Halperine (1967) Ichikawa <i>et al.</i> (1985) Saga <i>et al.</i> (1985)
<i>Foeniculum vulgare</i>	Maheshwari <i>et al.</i> (1965) Miura <i>et al.</i> (1985)
<i>Glycine</i> spp.	Gamborg <i>et al.</i> (1983)
<i>Lolium multiflorum</i>	Dale <i>et al.</i> (1981)
<i>Medicago sativa</i>	Dos santos <i>et al.</i> (1980) Kao <i>et al.</i> (1980) Meijer <i>et al.</i> (1985)
<i>Oryza sativa</i>	Wernicke <i>et al.</i> (1981) Gernovesi <i>et al.</i> (1982) Heyser <i>et al.</i> (1982) ; Sir- wardana <i>et al.</i> (1983) Tsung-Hsien Chen <i>et al.</i> (1985) Abe <i>et al.</i> (1985)
<i>Panicum maximum</i>	Lu <i>et al.</i> (1982)
<i>Panicum miliaceum</i>	Heyser (1984)
<i>Pennisetum americanum</i>	Vasil <i>et al.</i> (1980, 1981)
<i>Pennisetum purpureum</i>	Haydu <i>et al.</i> (1981) Wang <i>et al.</i> (1982) Chan- dler <i>et al.</i> (1984)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Martins <i>et al.</i> (1984)
<i>Phoenix dactylifera</i>	Reyolds <i>et al.</i> (1979)
<i>Saccharum officinarum</i>	Ho <i>et al.</i> (1983)
<i>Secale cereale</i>	Lu <i>et al.</i> (1984)
<i>Sorghum bicolor</i>	Brettel <i>et al.</i> (1980)
<i>Theobroma cacao</i>	Pence <i>et al.</i> (1979)
<i>Triticum aestivum</i>	Ozias-Akind <i>et al.</i> (1982) Heyser <i>et al.</i> (1985)
<i>Trifolium pratense</i>	Phillips <i>et al.</i> (1980) White (1984)
<i>Vitis</i> spp.	Kruhl <i>et al.</i> (1977)
<i>Zea mays</i>	Green <i>et al.</i> (1982) Lu <i>et</i> <i>al.</i> (1982, 1983) Am- strong <i>et al.</i> (1985)

일반적으로, embryogenic callus는 생장이 늦고 somatic embryo 形成能力이 長期間 保技되지 않는 경향이 있다. 따라서 생장이 빠르고, friable한 embryogenic callus 만이 증식하는 培養條件의 確立이 필요하다. 또한 somatic embryo 形成能力을 保持하는 期間과 培養하는 동안에 形成된 再生植物이 遺傳적으로 同一한가는 Somatic embryo를 增殖에 利用한다고 하는 점에서 重要な 問題이다. somatic embryogenesis에 의한 再生植物이 核學的으로나 表現型에 있어서 親植物과 類似하다고 하는 보고도 많지만¹⁰⁶⁾¹¹⁰⁾¹¹¹⁾¹¹⁹⁾¹²²⁻¹²⁵⁾ 밑에서 처럼 遺傳的 變異를 나타내는 報告¹²⁶⁾도 있어 somatic embryogenesis를 clonal propagation에 이용하는데 注意가 필요하다.

Somatic embryogenesis에 의한 人工 種子를 形成하는데 있어서는 胚樣體를 同調적으로 大量 作出하고, 目的으로 하는 發達時期의 胚樣體를 分離 採集하는 技術과 아울러 發芽能을 保持하기 위한 條件등의 검토도 되어지지 않으면 안된다. 이러한 문제들이 있음에도 불구하고, 人工 種子는 다음과 같은 利益이 있다.

① 種子 檢性이 없거나 있어도, 種子量이 적은것의 大量 增殖, 특히 DNA 組換 또는 細胞融合에 의해 作出되어진 檢性的 낮은 有用開體의 增殖.

② F_1 雜種의 大量 增殖.

③ 機械化에 의한 從來의 採種方式이 不必要

④ 遺傳子型的 固定操作이 不必要

⑤ 液體培養에서 形成된 不定胚를 寒天培地에 移植하는 복잡함이 생략될 수 있다.

約 · 花粉培養의 利用

約 · 花粉培養은 半數體의 作出이 중요한 目的이다. 半數體는 그 染色體數를 倍加함으로써 固定系統이 얻어진다. 또 突然變異 誘發 處理에 의해 變異體를 만들 수 있으며, 半數體는 양친에 비하여 크기가 작고, 꽃의 數도 많으므로 鑑賞用植物으로써도 重要하다. 또한 F_1 의 約培養으로 부터 F_1 와 比較할 수 있는 系統이 만들어졌다.³⁵⁾ 즉, F_1 雜種의 固定化라고 하는 重要的 意義를 期待할 수가 있다.³⁶⁾ 은행의 花粉을 Tullecke(1953)³⁷⁾가 처음 실시하였으며 이 어 많은 식물에서 約 또는 花粉培養에 의한 半數體가 作出되었다.⁴³⁻⁴⁵⁾ (표 9) 버나 밑에서 約培養의 경우 albino의 出現이 問題⁴⁶⁾⁴⁷⁾로 되어 있는데, 이는 長期間의 低溫處理, 設糖濃度, ammonia, 植物의 Hetero性 등이 影響을 미치고 있는 것으로 생각되어 지고있다. 따라서 배우자 形成에서 孢子體形成으로의 mechanism의 解明과, 花粉培養의 技術確立 등이 필요하다. 또한 未熟한 胚珠 또는 子房의 培養에 의한 半數體의 作出에도 關心이 기울여 지고 있다. 또한 방사선 처리를 한 페츄니아의 花粉에서 半數體가 얻어졌으며⁴⁸⁾ 이는 育種에 있어서의 egg transformation^{49,50)}으로써 劃期的인 技術이다.

Table 9. List of haploid plants obtained by anther culture

Plant species	References
<i>Aegilops caudata</i> X <i>A. umbwellulata</i>	Kimata <i>et al.</i> (1972)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gresshoff <i>et al.</i> (1972)
<i>Asparagus officinalis</i>	Pelletier <i>et al.</i> (1972)
<i>Atropa belladonna</i>	Narayanaswamy <i>et al.</i> (1972) Zenkteler (1971)
<i>Beta vulgaris</i>	Atanasov (1976)
<i>Brassica campestris</i>	Keller <i>et al.</i> (1975)
<i>B. juncea</i>	George <i>et al.</i> (1982)
<i>B. napus</i>	Wenzel <i>et al.</i> ((1977) Keller <i>et al.</i> (1977)
<i>B. oleracea</i>	Kameya <i>et al.</i> (1970)
<i>Capsicum annum</i>	Wang <i>et al.</i> (1973)
<i>Datura innoxia</i>	Guha <i>et al.</i> (1964, 1966)
<i>D. metel</i>	Narayanaswamy <i>et al.</i> (1971)
<i>D. meteloides</i>	Nisch (1972)
<i>D. muricata</i>	Nisch (1972)
<i>Digitalis purpurea</i>	Corduan <i>et al.</i> (1975)
<i>Gerbera jamesonii</i>	Preil <i>et al.</i> (1977)
<i>Havea brasiliensis</i>	Chen <i>et al.</i> (1978)
<i>Hordeum vulgare</i>	Clapham (1971)
<i>Hyoscyamus albus</i>	Raghavan (1975)
<i>H. pusillus</i>	Raghavan (1975)
<i>Lilium longiflorum</i>	Sharp <i>et al.</i> (1971)
<i>Linum usitatissimum</i>	Sun <i>et al.</i> (1981)
<i>Lolium multiflorum</i>	Clapham (1971)
<i>L. multiflorum</i> X <i>Festuca arundinacea</i>	Nitzsche (1970)
<i>Lycium halimifolium</i>	Zenkteler (1972)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Gresshoff <i>et al.</i> (1972)

Plant species	Refesences
<i>Nicotina alata</i>	Nitsch(1969)
<i>N. clevelandii</i>	Vyskot <i>et al.</i> (1974)
<i>N. glutinosa</i>	Nitsch(1972)
<i>N. otophora</i>	Collins <i>et al.</i> (1972)
<i>N. paniculata</i>	Nakamura <i>et al.</i> (1973)
<i>N. rustica</i>	Nitsch(1969)
<i>N. sanderae</i>	Vyskot <i>et al.</i> (1974)
<i>N. sylvestris</i>	Nitsch(1969)
<i>N. tabacum</i>	Bourgin <i>et al.</i> (1969) Nakata <i>et al.</i> (1968)
<i>Oryza perennis</i>	Wakasa <i>et al.</i> (1979)
<i>O. Sativa</i>	Niizeki <i>et al.</i> (1968) Guha-Mukherjee(1973)
<i>Pelargonium hortorum</i>	Abo El-Nil <i>et al.</i> (1973)
<i>Physalis ixocarpa</i>	Bapat <i>et al.</i> (1982)
<i>Poncirus trifoliata</i>	Hidaka <i>et al.</i> (1979)
<i>Populus berolinensis</i>	Group of tree breeding(1977)
<i>P. canadensis</i> × <i>P. koreana</i>	Group of tree breeding(1977)
<i>P. harbinensis</i> × <i>P. pyramidalis</i>	Group of tree breeding(1977)
<i>P. nigra</i>	Wang <i>et al.</i> (1975)
<i>P. simonii</i> × <i>P. nigra</i>	Group of tree Breeding(1977)
<i>Saintpaulia ionantha</i>	Hughe <i>et al.</i> (1975)
<i>Secale cereale</i>	Thomas <i>et al.</i> (1975)
<i>Setaria italica</i>	Ban <i>et al.</i> (1971)
<i>Solanum bulbocastanum</i>	Irikura (1975)
<i>S. demissum</i>	Irikura (1975)
<i>S. dulcamara</i>	Zenkteller(1973)
<i>S. fendleri</i>	Irikura (1975)
<i>S. hjertingii</i>	Irikura (1975)
<i>S. nigrum</i>	Harn (1971)

Plant species	References
<i>S. phureja</i>	Irikura (1975)
<i>S. polytrichon</i>	Irikura (1975)
<i>S. stenotomum</i>	Irikura (1975)
<i>S. stoloniferum</i>	Irikura (1975)
<i>S. tuberosum</i>	Irikura (1975)
<i>S. verrucosum</i>	Irikura <i>et al.</i> (1972)
<i>S. verrucosum</i> × <i>S. chacoense</i>	Irikura (1975)
<i>Trifolium alexandrinum</i>	Mokhtarzadeh <i>et al.</i> (1978)
<i>Triticale</i>	Wang <i>et al.</i> (1973)
	Chu <i>et al.</i> (1973)
	Ouyang <i>et al.</i> (1973)
<i>Triticum aestivum</i>	Wang <i>et al.</i> (1973)
<i>T. vulgare</i> × <i>Agropyron glaucum</i>	Wang <i>et al.</i> (1975)
<i>vitis vinifera</i>	Zou <i>et al.</i> (1981)
<i>Zea mays</i>	Laboratory of plant cell and tissue culture (1975)

細胞 融合法

細胞融合에 의해, 細胞質의 混合이 일어나고, 따라서 通常의 方法으로는 交雜不可能한 種間에서는 얻어질수 없는 細胞質雜種의 作出이 期待되었다.

그러나, 最近 細胞融合 細胞內에서의 染色體의 脫落 및 兩親의 어느쪽인가 一方의 細胞質이 排除되는 現象 등이 밝혀짐에 따라, 遺傳質의 一部의 導入이나 細胞質의 置換에 주로 利用하여지게 되었다. 또한 new-nuclearcytoplasmic combinations'에 起因하는 遺傳情報의 發現과 그 育種的 效果가 크게 期待되어지고 있다. 더 나아가 somatic incompatibility, 細胞內 小器官間에서의 融合, 核과 細胞質과의 相互關係의 解明 등 體細胞 遺傳學의 發展에도 貢獻하고 있다. 1972年 Carlson *et al*⁶¹⁾가 細胞融合을 實證한 이후 많은 體細胞 雜種이 만들어졌다.⁶²⁾⁶⁴⁾⁶⁵⁾ (表 10) 1974年 PEG(polyethyleneglycol)가 細胞融合劑로써 Kao *et al*¹²⁹⁾ 등에 의해 발견된 후 最近 電氣融合法^{67~71)}, X-線處理¹³⁰⁾, miniprotoplast나 核이 없는 Cytoplasm의 利用 등 急速한 進歩를 보이고 있다.

細胞融合을 利用하여 Chromosome/gene transfer에 의한 育種, 細胞質雄性不稔性(Cytoplasmic male sterility), 藥劑耐性⁷²⁾⁷³⁾ 등 細胞質 遺傳子의 導入에 이용되어 지고 있다.

Cocking¹³¹⁾는 兩親의 어느쪽인가 一方의 核을 갖고, 細胞質의 置還되어진 것을

細胞質 雜種이라고 설명하고 있다(그림1). 이것은 細胞融合에 의해 混合된 細胞質이 heterokaryon의 後代에 있어서 分離하는 것에 의해 새로운 核·細胞質 關係가 만들어진 결과, 형성되어진다. 兩親의 어느쪽인가 한쪽의 葉綠體를 核이 參與함 없이 다른 쪽으로 옮기는, 말하자면 chloroplast transfer도 heterokaryon의 後代에서의 細胞質分離의 結果에 의한 것이다. 그러나 Izhar *et al*¹³²⁾은 兩親의 어느쪽인가의 核을 갖고, 細胞는 兩親으로부터 받은 雜種을 細胞質雜種 "Cybrid"로써 취급하고 있다. Glimelius도 葉綠體에 관하여, 兩親으로부터의 a mixture of chloroplasts를 포함한 體細胞雜種을 cybrid로써 취급하였다.

細胞質 雜種의 作出法은 Glimelius *et al*.¹³³⁾¹³⁴⁾의 硝酸還元酵素 欠損株와 albino變異株를 이용하는법, Maliga *et al*¹³⁵⁾의 Cytoplasm-protoplast fusion에 의한 方法, Zelcer *et al*¹³⁶⁾ 등의 X-線 照射에 의한 方法 등이 있다. 그림 2는 細胞質 및 體細胞 雜種의 作出過程을 圖로 나타냈다.

그러나 아직 細胞融合技術과 育種面에 利用되고 있지 못하다. 그 理由는 少量의 試料를 生化學的으로 分析하는 手法이 確立되어 있지 않고, a transfer of cytoplasmic male sterility에 있어서 遺傳的으로 不安定하여 固定되어 있지 못하다. 또한 細胞融合에 의한 mitochondria DNA의 組換^{140~142)}의 問題도 雄性不稔性과의 關係와 未解決이다.

Table 10. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion

Hybrid plant	References	Hybrid plant	References
<i>Nicotiana glauca</i> + <i>Nicotiana langsdorffii</i>	Carlson et al. (1972)	<i>Datura innoxia</i> + <i>Datura candida</i>	Schiefer (1980)
<i>Nicotiana tabacum</i> "v" + "s"	Melchers et al. (1974)	<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>Nicotiana glauca</i>	Evans et al. (1980)
<i>Sphaerocarpos donnellii</i> "nic 2" + "pal 2"	Schiefer (1974)	<i>Solanum tuberosum</i> + <i>Solanum chacoense</i>	Butenko et al. (1980)
<i>Nicotiana tabacum</i> "albino" + "Ws ₁ Ws ₂	Kameya (1975)	<i>Nicotiana tabacum</i> "SRI" + <i>Nicotiana sylvestris</i>	Medgyesy et al. (1980)
<i>Nicotiana tabacum</i> "albino" + "SUSU"	Gleba et al. (1975)	<i>Nicotiana tabacum</i> "CMS" + <i>Nicotiana sylvestris</i>	Schiefer (1981)
<i>Nicotiana glauca</i> + <i>Nicotiana langsdorffii</i>	Smith et al. (1976)	<i>Datura innoxia</i> + <i>Datura quer. cifolia</i>	Schiefer (1981)
<i>Petunia hybrida</i> + <i>Petunia Parodii</i>	Power et al. (1976, 1977)	<i>Nicotiana rusica</i> + <i>Nicotiana tabacum</i>	Douglas et al. (1981)
<i>Daucus carota</i> + <i>Daucus capifolius</i>	Dudits et al. (1977)	<i>Nicotiana debneyi</i> "TS233" + "TS287"	Scowcroft et al. (1981)
<i>Datura innoxia</i> "A1/5a" + "A7/1s"	Schiefer (1977)	<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>Nicotiana knightiana</i>	Menczei et al. (1981)
<i>Nicotiana tabacum</i> "CMS" + "fertile"	Belliard et al. (1977, 1978)	<i>Nicotiana stocktonii</i> + <i>Nicotiana tabacum</i>	Evans et al. (1981)
<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>Nicotiana sylvestris</i>	Melchers (1977)	<i>Nicotiana nesophila</i> + <i>Nicotiana tabacum</i>	Evans et al. (1981)
<i>Nicotiana sylvestris</i> + <i>Nicotiana knightiana</i>	Maliga et al. (1977)	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i> + <i>Nicotiana tabacum</i>	Sidorov et al. (1981)
<i>Petunia hybrida</i> + <i>Petunia parodii</i>	Cocking et al. (1977)	<i>Daucus carota</i> + <i>Daucus capifolius</i>	Kameya et al. (1981)
<i>Physcomitrella patens</i> aux mutants	Grimsley et al. (1977)	<i>Nicotiana tabacum</i> "albino" + "NR -"	Glimelius et al. (1981)
<i>Arabidopsis thaliana</i> + <i>Brassica campestris</i>	Gleba et al. (1978)	<i>Nicotiana tabacum</i> "NR -" + "CMS"	Glimelius et al. (1981)
<i>Datura innoxia</i> + <i>Datura discolor</i>	Schiefer (1978)	<i>Nicotiana tabacum</i> (N. debneys cyt.) + <i>Nicotiana glutinosa</i>	Uchimiya (1982)
<i>Datura innoxia</i> + <i>Datura sanguinea</i>	Schiefer (1978)	<i>Atropa belladonna</i> + <i>Nicotiana chinensis</i>	Gleba et al. (1982)
<i>Datura innoxia</i> + <i>Datura stramonium</i>	Schiefer (1978)	<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>Nicotiana panda</i>	Nagao (1982)
<i>Nicotiana tabacum</i> "nia" + "cnx"	Glimelius et al. (1978)	<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>Salpiglossis sinuata</i>	Nagao (1982)
<i>Nicotiana glauca</i> + <i>Nicotiana langsdorffii</i>	Chupeau et al. (1978)	<i>Nicotiana tabacum</i> "albino" + "wild"	Nakata (1982)
<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>Nicotiana glauca</i>	Evans et al. (1978)	<i>Nicotiana glauca</i> + <i>Petunia hybrida</i>	Yongru et al. (1982)
<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>Nicotiana knightiana</i>	Maliga et al. (1978)	<i>Tobacco tumor B6S3</i> + <i>Petunia hybrida</i> W43	Xianghui et al. (1982)
<i>Nicotiana rustica</i> + <i>Nicotiana tabacum</i>	Nagao (1978)	<i>Solanum nigrum</i> + <i>Solanum tuberosum</i>	Binding et al. (1982)
<i>Petunia parodii</i> + <i>Petunia inflata</i>	Power et al. (1979)	<i>Brassica oleracea</i> + <i>Brassica campestris</i>	Schenck et al. (1982)
<i>Solanum tuberosum</i> + <i>Lycopersicon esculentum</i>	Melchers et al. (1978)	<i>Medicago sativa</i> + <i>Medicago falcata</i>	Teoule et al. (1983)
<i>Aegopodium podagraria</i> + <i>Daucus carota</i>	Dudits et al. (1979)	<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>Hyoscyamus muticus</i>	Potrykus et al. (1983)
<i>Datura innoxia</i> + <i>Atropa belladonna</i>	Krumbiegel et al. (1979)	<i>Nicotiana tabacum</i> cnxA1 + cnxA2	Grate et al. (1983)
<i>Nicotiana tabacum</i> "nia" + "cnx"	Wallin et al. (1979)	<i>Petunia hybrida</i> + <i>Petunia parodii</i>	Ito et al. (1983)
<i>Nicotiana tabacum</i> "albino" + "CMS"	Gleba (1979)	<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	Menczei et al. (1983)
<i>Nicotiana tabacum</i> "tumor"	Wullems et al. (1979)	<i>Solanum tuberosum</i> + <i>Lycopersicon esculentum</i>	Shepard et al. (1983)
<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>Nicotiana alata</i>	Nagao (1979)	<i>Solanum tuberosum</i> + <i>Solanum brevidens</i>	Barsby et al. (1984)
<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>Nicotiana glutinosa</i>	Nagao (1979)	<i>Lycopersicon pennellii</i> + <i>Lycopersicon esculentum</i>	O'Connell et al. (1985)
<i>Petunia hybrida</i> "CMS" + <i>Petunia axillaris</i>	Izhar et al. (1979)	<i>Solanum sisymbriifolium</i> + <i>Solanum meiongena</i>	Gleditsie et al. (1985)
<i>Daucus carota</i> + <i>Petroselinum hortense</i>	Dudits et al. (1980)		

Genome mutation	Genome	{ Polyploid Aneuploid	Rice (Nishi <i>et al.</i> 1969)
			{ Haploid Deletion Duplication Inversion Translocation
Chromosome mutation	Chromosome	{ Deletion Duplication Inversion Translocation	Rice
			{ Flameshift Base pair substitution Codon Base pare (Muton, Recon)
Gene mutation	Operon	{ Flameshift Base pair substitution Codon Base pare (Muton, Recon)	Rice (Oono 1975)
			{ Transversion Transision Nonsense mutation Missense mutation
Plasmon mutation	Plasom (Plastid)		Tobacco (Maliqa <i>et al.</i> 1975)
	Cytoplasmon (Cnondoriome)		Maize (Gengenbach <i>et al.</i> 1977)

Fig.1. Mutation in plant tissue culture
 - Obserbed in regenerated plants -

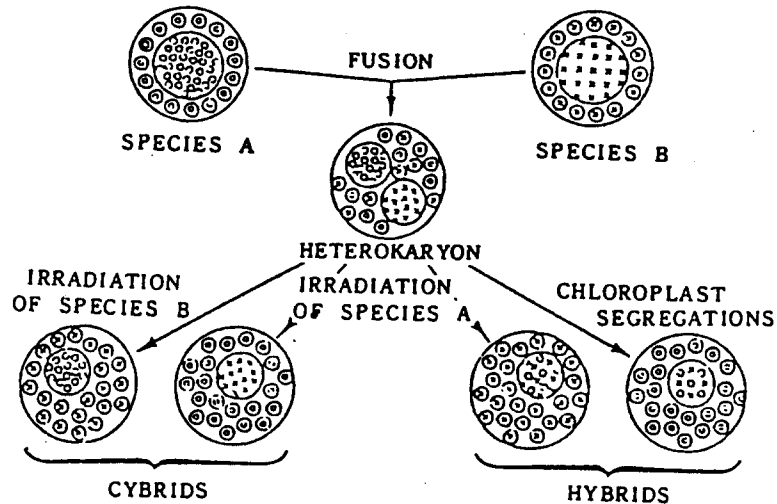


Fig.2. Cell fusion and chloroplast segregations

遺傳子 工學의 手法

土壤細菌의 1種인 *Agrobacterium tumefaciens* A가 갖는 Ti plasmid와 Cauliflower mosaic virus(CaMV) DNA의 vector로써의 利用法이다. *Agrobacterium tumefaciens*의 接種에 의해 感染部位에 crown gall을 形成하는데 그 原因이 Ti-plasmid에 의한 것임이 Schell et al⁵¹)에 의해 發見 되어졌다. 이 Ti plasmid를 利用하여 目的 遺傳子를 植物 genome 內에 導入하는 方法을 Binary vector⁵²)라고 한다. 이것은 Ti plasmid에서 T-DNA 領域을 分離하고, 거기에 目的 遺傳子를 넣어 大腸菌의 vector에 導入, 中間 vector를 만든다. 한편, 남은 部分에 T-DNA가 植物細胞에 導入되어 지는데에 必要한 vir 領域이 存在하는데, 이 vir 領域을 포함하는 小型의 Plasmid를 *Agrobacterium tumefaciens* 內에 導入한다. 그 細胞內에 目的 遺傳子가 導入 되어진 大腸菌으로 부터 中間 vector를 導入한다. 細胞內에서 中間 vector로부터 Ti plasmid에 目的 遺傳子가 옮겨지고, 植物 Genome 內에 導入 되어진다.

또한 CaMV의 promoter를 利用하여, 外來 遺傳子가 安定되게 植物體의 染色體에 導入되어져, 形質轉換이 일어난 細胞로부터의 再生 個體에서는 異常이 보여지지 않고 稔性を 나타내며, Mendelian 樣式을 나타내는 것도 밝혀졌다.⁵⁴) 또한 T₁ plasmid와 CaMV DNA外에 葉綠體 DNA 및

1本鎖 DNA인 gemini virus의 vector로써의 開發도 되어지고 있다. 또한, *Agrobacterium rhizogenes*는 毛根病의 病原體 인데, R₁(root inducing) plasmid를 가지며, 感染部位에 發根하는데 당근에 처리하여 發根力의 왕성한 개체가 얻어졌다.⁵⁵) 根에서 生成 되어지는 alkaloid 生産의 증가⁵⁶) 감자의 形質轉換 또는 分化能이 없는 植物에의 分化能의 付與 등에 利用되어 진다.^{59,60})

組換 DNA(recombinant DNA)의 植物體로서 導入의 效率向上 및 leaf disk transformation-regeneration method⁶⁰) 등의 簡易한 導入法의 開發, 最大限의 遺傳情報를 發現 시키는 것 등이 中間 vector의 開發과 아울러 연구해야 할 과제 들이다. 圖 3은 遺傳子 操作技術에 의한 育種 system을 나타내었다.

要 約

기존의 作物 育種法은 選拔法(pure line selection), 交雜育種法(cross breeding), 雜種強勢 育種法(heterosis breeding), 倍數性 育種法(polyploid breeding), 또는 突然變異 育種法(mutation breeding) 등이 었다. 그것이 最近에 試驗管育種 技術에 의한 細胞 Level에서 育種을 行하게 되었다.

細胞培養에 의한 遺傳的 變異擴大에는 tissue culture, anther culture, 試驗管內 受精, 胚培養, 突然變異體 選拔 等

이 實用段階에 있으며, 突然變異體 選拔, 細胞融合, recombinant DNA 技術 等은 半數體의 作出, protoplast 培養, 植物體 分化技術의 確立이 必要하다.

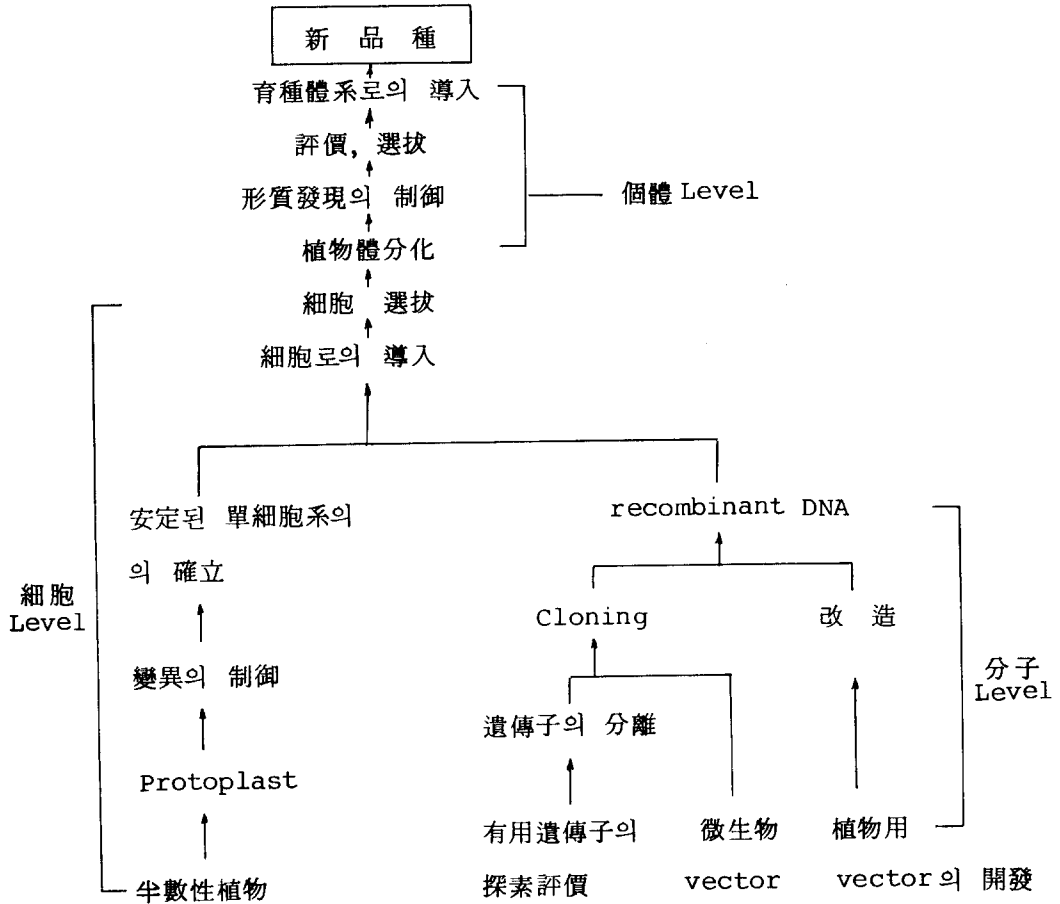


Fig 3. Breeding system of plants by cell culture and cell technology

引用文獻

1. Kanta, K and P. Maheshwari, 1963. *Phytomorphol*, 13:230-237.
2. Shivanna, A.R., 1965. *Phytomorphol*, 15:183-185.
3. Dulieu, H.L., 1966. *Phytomorphol*, 18:69-75.
4. Kameya, T., K. Hinata, and U. Mizushima, 1966. *Proc. Jap. Acade.* 42:165-167.
5. Rangaswamy N.S. and K.R. Shivanna, 1967. *Nature*, 216:937-939.
6. 中島哲夫, 1968. 育種 18 別冊 1:51-52.
7. Laibach, F., 1925. *Zeit. Bot.* 1:7.
8. 中島哲夫, 1962. *Bull. Univ. Osaka Prefect. B.* 13:13.
9. Konzak, C.F., Randolph, L.F. and Tennen, N.F., 1925. *Jour. Hered.*, 42:125.
10. Wall, J.R., 1954. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 63:427.
11. 金子賢一郎, 1961. 遺雜, 36:384.
12. Webster, G.J. 1955. *Agron. Jour.*, 47:138.
13. Keim, W.F. 1953. *Agron. Jour.*, 45:601.
14. Blakeslee, A.F. and Satina, S. 1944. *Science*, 99:331.
15. McLean, S.W. 1946. *Amer. Jour. Bot.*, 33:630.
16. Smith, PrG. 1944. *Amer. Soc. Hort. Soc. Proc.*, 44:413.
17. Jørgensen, C.A., 1928. *Jour. Gernet.*, 19:133.
18. Grant, W.F., Bullen, M.R. and Nettancourt, D.De., 1962. *Canad. Jour. Genet. Cytol.*, 4:105.
19. Skirum, G.W., 1942. *Jour. Hered.*, 33:211.
20. Skovsted, A., 1935. *Jour. Genet.*, 30:397.
21. Brink, R.A., Cooper, D.C. and Ausherman, L.E., 1944. *Jour. Heud.*, 33:67.
22. 渡邊好郎, 百足幸一郎, 1959. 遺雜, 34:1
23. Iwanoskaya, E.V., 1946. *Compt. Rend. Acad. Sci. URSS.* 54:445.
24. Zdmiiikovskaja, A.I., 1954. *Argobiologia*, 4:130.
25. Lammerts, W.E., 1942. *Amer. Jour. Bot.*, 29:166.
26. Asen, S, and Larson, R.E., 1951. *Prog. Rep. Agri. Exp. Stat.*, 40:4.
27. Randolph, L.F. and Cox, L.G., 1943. *Amer. Soc. Hort. Sci.*, 43:284.
28. Tukey, H.B., 1933. *Jour. Hered.*, 24:7.
29. I. Negrutiu, M. Jacobs and M. Caboche, 1984. Review. *Theor. Appl. Genet.*, 67, 289.
30. R.S. Chaleff, 1983. *Science*, 219, 676

31. S.R. Singer and C.N. McDaniel, 1984. *Theor. Appl. Genet.*, 67, 427.
32. 古澤 殿, 水口敦雄, 田中國介, 1985 : 第9回植物組織培養シンポジウム大會講演要旨集, 170.
33. P. Thanutong, I. Furusawa and M. Yamamoto, 1983. *Theor. Appl. Genet.*, 66, 209.
34. R.I.S. Brettell, E. Thomas and D.S. Ingram, 1980. *Theor. Appl. Genet.*, 58, 55.
35. Z. Junzhi, Plant cell culture in crop improvement, ed. S.K. Sen and K.L. Giles, Plenum Pre Press, New York, London, 1983. p.361.
36. 新關宏夫 : 農業および園藝, 1985. 60, 1109.
37. W.R. Tulecke, 1953. *Science*, 117, 599.
38. T. Yamada, T. Shoji and Y. Sintono, 1963. *Bot. Mag. Tokyo*, 76, 332.
39. S. Guha and S.C. Maheshwari, 1964. *Nature*, 204, 497.
40. S. Guha and S.C. Maheshwari, 1966. *Nature*, 212, 97.
41. S. Guha and S.C. Maheshwari, 1977. *Phytomorphology*, 17, 454.
42. S.C. Maheshwari, A. Rashid and A.K. Tyagi, 1982. *Amer. J. Bot.*, 69, 865.
43. T.L. Reynolds, 1984. *J. Plant Physiol.*, 117, 157.
44. 中村幸生, 廣田年信, 藤卷 宏, 1985. : 育種學雜誌, 35, 別刷, 1, 70.
45. 尾崎厚一, 1985 : 第9回植物組織培養シンポジウム大會講演要旨集, 153.
46. J.W. Ouyang, S.M. Zhou and S.E. Jia, 1983. *Theor. Appl. Genet.*, 66, 101.
47. B. Foruoghi - Wehr and W. Friedt, 1984. *Theor. Appl. Genet.*, 67, 377.
48. C. Raquin, 1985. *Z. Pflanzenzucht*, 94, 166.
49. K.K. Pandey, 1975. *Nature*, 256, 310.
50. J.C. Sanford, Y.S. Chyi and B.I. Reisch, 1984. *Theor. Appl. Genet.*, 67, 553.
51. H. Lorz, B. Baker and J. Schell 1985. *Mol. Gen. Genet.*, 199, 178.
52. A. Hoekema, P.R. Hirsch, P.J.J. Hooykaas and R.A. Schilperoord, 1983. *Nature*, 303, 1033.
53. D.W.R. White, 1984. *Planta*, 162, 1
54. J. Paszkowski, R.D. Shillito, M. Saul, V. Mandak, T. Hohn, B. Hohn and I. Potrykus, 1984. *The EMBO Jour.*, 3, 2717.
55. R.B. Horsch, J.E. Frei, N.L. Hoffmann, D. Eichholtz, S.G. Rogers and R.T. Fraley, 1985. *Science*, 227, 1229.

56. M-D, Chilton, D.A. Tepfer, A. Petit, C. David, F. Casse-De-lbart and J. Tempe, 1982. *Nature*, 295, 432.
57. N. Tanaka, M. Hayakawa, Y. Mano, H. Ohkawa and C. Matsui, 1985. *Plant Cell Reports*, 4, 74.
58. H.E. Flores and P. Filner, 1985. *In Vitro, cellular and developmental biology*, 21, part 11, 53A
59. G. Ooms, A. Karp, M.M. Burrell, D. Twell and J. Roberts, 1985. *Theor. Appl. Genet.*, 70, 440.
60. 清川繁人, 鎌田 博, 原田 宏, 1985. : 第9回植物組織培養シンポジウム大會講演要旨集, 43.
61. P.S. Carlson, H.H. Smith and R.D. Dearling, 1972. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 69, 2292.
62. G. Melchers, M.D. Sacristan and A.A. Holder, 1978. *Carlsberg, Res. Commun*, 43, 203.
63. I. Potrykus, J. Jia, G.B. Lazar and M. Saul, 1984. *Plant Cell Reports*, 3, 68.
64. 大河原敏文, 大河原依久子, 小林省三, 内宮博文, 石井茂孝, 1985 : 第9回植物組織培養シンポジウム大會講演要旨集, 32.
65. 大河原敏文, 大河原依久子, 小林省三, 内宮博文, 石井茂孝, 1985 : 第9回植物組織培養シンポジウム大會講演要旨集, 33.
66. R. Fluhr, D. Aviv, E. Galun and E. Edelman, 1984. *Theor. Appl. Genet.*, 67, 491.
67. G.W. Bates and C.A. Hasenkampf, 1985. *Theor. Appl. Genet.*, 70, 229.
68. O. Schieder and H. Kohn, 1985. *Plant Sci.*, 38, 121.
69. 森川弘道, 杉野克彦, 林 泰行, 竹田淳子, 千田 貫, 山田康之, 1985 : 第9回植物組織培養シンポジウム大會講演要旨集, 26.
70. J.W. Watts, J.II. Doonan, D.J. Cove and J.M. King, 1985. *Mol. Gen. Genet.*, 199, 349.
71. J. Gressel, N. Cohen and H. Binding, 1984. *Theor. Appl. Genet.* 67, 131.
72. G. Pelletier, C. Primard and F. Vedel, 1985. *In Vitro, cellular and developmental biology*, 21, Part 11, 63A.
73. 神大 隆, 久保友明, 1984 : 育種學雜誌 34, 別刷, 1.
74. 久保友明, 1985. 盤田たばこ試場報告, 17, 69.
75. F.C. Steward, M.O. Mapes and K. Mears, 1958. *Am. J. Bot.*, 45, 705.
76. V. Vasil, D. Wang and I.K. Vasil, 1983. *Z. Pflanzenphysiol.*, 111, 233.
77. 駒嶺 穰, 1984 : 計測と制御, 23, 751.

78. S.Y. Zee and S.C. Wu, 1979. *Z. Pflanzenphysiol.*, 93, 325.
79. G. Reuther, Acta, 1977. *Hort.* 73, 217.
80. J.W. Heyser and M.W. Nabors, 1982. *Z. Pflanzenphysiol.*, 107, 153.
81. L.K. Pareek and N. Chandra, 1978. *Plant Sci. Lett.*, 11, 311.
82. B. de Bruijne, E. de langhe and R. van Rijk, 1974. *Meded. Fak. Landbouwwet Genet.*, 39, 637.
83. M. Furmanova, H. oledzek and O. Sowinscha, 1984. *Z. Pflanzphysiol.*, 115, 209.
84. J. Kochba and P. Spiegel-Roy, 1973. *Z. Pflanzenzuchtg.*, 69, 156.
85. A. Vardi, P. Spiegel-Roy and E. Galun, 1975. *Plant Sci. Lett.*, 4, 231.
86. S. Kobayashi, H. Uchimiya and I. Ikeda, 1985. *Japan J. Breed.*, 33, 119.
87. M.R. Sondahl and W.R. Sharp, 1977. *Z. Pflanzenphysiol.*, 81, 395.
88. S. Jelaska, 1972. *Planta.*, 103, 278.
89. A. McHughen and M. Swartz, 1984. *J. Plant Physiol.*, 117, 163.
90. J. Reinert, 1958. *Naturwissenschaften*, 45, 344.
91. W. Halperin and D.R. Wetherell, 1964. *Amer. J. Bot.*, 51, 274.
92. 市川裕章, 今村 順, 1985 : 第9回植物組織培養シンポジウム講演要旨集, 160.
93. S.C. Maheshwari and G.R.P. Gupta, 1965. *P lanta*, 67, 384.
94. 三浦靖高, 小川恭石, 福井宏至, 田畑 守 1985 : 第9回植物組織培養シンポジウム講演要旨集, 126.
95. O.L. Gamborg, B.P. Davis and R.W. Stahlhut, 1983. *Plant Cell. Rep.*, 2, 209.
96. P.J. Dale, 1980. *Z. Pflanzenphysiol.*, 100, 73.
97. A.V.P. Dos Santos, D.E. Outka, E.C. Cocking and M.R. Davey, 1980. *Z. Pflanzenphysiol.*, 99, 261.
98. K.N. Kao and M.R. Michayluk, 1980. *Z. Pflanzenphysiol.*, 96, 135.
99. E.G.M. Meijer and D.C.W. Brown 1985. *In Vitro Annual Meeting Abstracts*, 21, part 11, 23A.
100. W. Wernicke, R. Brettell, T. Wakizuka and I. Potrykus, 1981. *Z. Pflanzenphysiol.*, 103, 361.
101. A.D. Genovesi and C.W. Magill, 1982. *Plant Cell Reports*, 1, 257.
102. J.W. Heyser, T.A. Dykes, K.J. de Mott and M.W. Nabors, 1982. *Plant Sci. Lett.*, 29, 175.
103. S. Siriwardana and M.W. Nabors, 1983. *Plant Physiol.*, 73, 142.
104. Tsung-Hsien Chen, Ling Lam and Shuh-Chun Chen, 1985. *Plant Cell*

- Tissue Organ Culture*, 4, 51.
105. 阿部利徳, 蓮原雄三, 1985 : 第9回植物組織培養シンポジウム大會講演要旨集 165.
106. C. Lu and I.K. Vasil, 1982. *Amer. J. Bot.*, 69, 77.
107. J.W. Heyser, 1984. *Z. Pflanzenphysiol.*, 113, 293.
108. V. Vasil and I.K. Vasil, 1980 *Theor. Appl. Genet.*, 56, 97.
109. V. Vasil and I.K. Vasil, 1981 *Amer. J. Bot.*, 68, 864.
110. Z. Haydu and I.K. Vasil, 1981 *Theor. Appl. Genet.*, 59, 269.
111. D.Y. Wang and I.K. Vasil, 1982 *Plant Sci. Lett.*, 25, 147.
112. S.F. Chandra and I.K. Vasil, 1984. *J. Plant Physiol.*, 117, 147.
113. I.S. Martins and M.R. Sondahl, 1984. *J. Plant Physiol.*, 117, 97.
114. J.F. Reynolds and T. Murashige, 1979. *In Vitro*, 15, 383.
115. W.J. Ho and I.K. Vasil, 1983. *Ann. Bot.*, 51, 719.
116. C. Lu, S.F. Chandra and I.K. Vasil, 1984. *Plant Physiol.*, 115, 237.
117. R.I.S. Brettel, W. Wernicke and E. Thomas, 1980. *Protoplasma*, 104, 141.
118. V.C. Pence, P.M. Hasegawa and J. Janick, 1979. *Z. Pflanzenphysiol.*, 98, 1.
119. P. Ozias-Akins and I.K. Vasil, 1982. *Protoplasma*, 110, 95.
120. J.W. Heyser, M.W. Nabors, C. Mackinnon, T.A. Dykes, K.J. Demott, D.C. Kautzman and A. Mukeeb-Kazi, 1985. *Z. Pflanzenzuchtg.*, 94, 218.
121. G.C. Phillips and G.B. Collins, 1980. *Crop Sci.*, 20, 323.
122. W.W. Hanna. C. Lu and I.K. Vasil, 1984. *Theor. Appl. Genet.*, 67, 155.
123. I.K. Vasil, Plant improvement and somatic cell genetics ed. I.K. Vasil, W.R. Scowcroft and K.I. Frey, Academic Press 1982. London, New York, p.179.
124. I.K. Vasil, Plant tissue Culture ed. A. Fujiwara, Maruzen, 1982. Tokyo, p.101.
125. I.K. Vasil, Genetix engineering in eukaryotes, ed. P. Lurquin and A. Kleinhofs, 1983. Plenum, New York, p.233.
126. A. Karp and S.E. Maddock, 1984. *Theor. Appl. Genet.*, 67, 249.
127. 山川邦夫, 1985 : 農業および園藝, 60, 117.
128. 日本國特許公報 : 昭 59-102308, 公開昭和 59 年 6 月 13 日
129. Kao, K.N., Michayluk, M.R., 1974 : A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts, *Planta*, 115:355-367.
130. D. Aviv, S. Bleichman, P. Arzee-Gonen and E. Galun, 1984.

- Theor. Appl. Genet.*, 67, 499.
131. Cocking, E.C., 1981 : Opportunities from the use of protoplasts, *Phil. Trans. R. Soc. Lond*, B292:557-568.
 132. Izhar, S., Tabib, Y., 1980. : Somatic hybridization in *Petunia*. *Theor. Appl. Genet.*, 57:241-245.
 133. Glimelius, K., Bonnet, H.T., 1981 : Somatic hybridization in *Nicotiana* : Restoration of photoautotrophy to an albino mutant with defective plastids, *Planta*, 153:497-503.
 134. Glimelius, K., Chen, K., Bonnet, H.T., 1981 : Somatic hybridization in *Nicotiana* : Segregation of organellar traits among hybrid and cybrid plants, *Planta*, 153:504-510.
 135. Maliga, P., Lörz, H., Lázár, G., Nagy, F., 1982 : Cytoplasm-protoplast fusion for interspecific chloroplast transfer in *Nicotiana*, *Mol. Gen. Genet.*, 185:211-215.
 136. Zelcer, A., Aviv, D., Galun, E., 1978 : Interspecific transfer of cytoplasmic male sterility by fusion between protoplasts of normal *Nicotiana sylvestris* and X-ray irradiated protoplasts of male sterile *N. tabacum*, *Z. Pflanzenphysiol.*, 90:397-407.
 137. M. Rothenberg, M.L. Boeshore, M.R. Hanson and S. Izhar, 1985 *Curr. Genet.*, 9, 615.
 138. Belliard, G., Vedel, F. Pelletier, G., 1979 : Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion, *Nature*, 281:401-403.
 139. Nagy, F., Török, I., Maliga, P., 1981 : Extensive rearrangements in the mitochondrial DNA in somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana knightiana*, *Mol. Gen. Genet.*, 183:437-439.
 140. W.R. Krul and J.F. Worley, 1977. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 102, 360.
 141. C.E. Green, *Plant tissue culture*, ed. A. Fujiwara, Maruzen, 1982 Tokyo, p.107.
 142. C.Lu, I.K. Vasil and P. Ozias-Akins, 1982. *Theor. Appl. Genet.*, 62,109.
 143. C.Lu, V. Vasil and I.K. Vasil, 1983. *Theor. Appl. Genet.*, 66, 285.
 144. C.L. Armstrong and C.E. Green, 1985. *Planta*, 164, 207.