

꽃양배추로의 Proteinase Inhibitor II (PI- II) 유전자 도입

김창길* · 정재동¹ · 안진흥²

경북농촌진흥원, ¹경북대학교 농과대학 원예학과, ²포항공대 생명과학과

The Introduction of Proteinase Inhibitor II (PI- I) Gene into Flowering Cabbage, *Brassica oleracea var. acephala* DC.

KIM, Chang Kil* · CHUNG, Jae Dong¹ · AN, Gyn Heung²

Kyungbuk Provincial RDA, Taegu, 302-301, Korea: ¹Department of Horticulture, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea: and ²Department of Life Science, Pohang University of Science and Technology, Pohang, 790-784, Korea. *Corresponding author.

Hypocotyl explants of flowering cabbage were precultured on MS medium without kanamycin and then cocultured with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404:pGA875 harboring insect resistant proteinase inhibitor II(PI- I) gene in MS liquid medium adjusted pH 5.5 for 72hr. These explants were transferred to MS medium containing 20 mg/L kanamycin, 500 mg/L carbenicillin, and 1 mg/L BA. The explants were subsequently subcultured every 2 weeks. After 4 weeks of subculture, kanamycin-resistant shoots were obtained from selection medium. Leaves of putative transformants survived on MS selection medium containing 30 mg/L kanamycin. Incorporation of the PI- I gene into flowering cabbage was confirmed by PCR analysis of genomic DNA. Southern blot analysis showed that ECL-labeled probe for PI- I gene was hybridized to the expected amplified genomic DNA fragment of about 500 bp from transgenic flowering cabbage.

Key words; *Agrobacterium tumefaciens*, insect resistant

*Brassica*屬 식물에는 經濟的으로 중요한 작물들이 많이 속해 있으며 그 종류도 매우 다양하다. 일찍이 U(1935)는 *Brassica*屬 식물의 계통분석을 수행하여 3종의 기본 계통을 갖는 식물의 相互交雜에 의해 1차 및 2차 계통 식물이 형성됨을 입증하고 이들의 유연관계를 밝혔다. 이들 6종의 *Brassica*屬 식물에는 *B. oleracea*를 포함한 *B. napus*, *B. juncea*, *B. campestris*, *B. nigra*, *B. carinata* 등이 포함되어 있다.

지난 십 여 년간 植物育種學은 분자생물학의 발달에 힘입어 외래의 유용유전자를 선택적으로 고등 식물체내로 도입시켜 관련형질을 전환시키는 형질전환에 성공하고 있다. 근년에는 이러한 형질전환 기술을 이용하여 除草劑(Milki et al., 1990; Shah et al., 1986), 바이러스(Harrison et al., 1987), 그리고 害蟲(Barton and Miller, 1993; Delanny et al., 1989)에 대해 저항성을 나타내는 유용 농작물을 개발하고자 많은 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 성과도 상당히 커서 1995년까지 형질전환된 3,647種의 식물들이 포장시험중에 있

으므로 2,000년까지는 이들 식물에 대한 商品化가 가능할 것으로 보고있다(James, 1996).

식물체는 자연환경하에서 여러 병해충의 공격대상이 된다. 이런 상태에서 각 식물들은 生存을 위하여 다양한 자기 방어 기작을 발달시켜 왔다. 그 한 방법은 방어에 관련된 유전자를 활성화시켜 防禦物質을 생산해서 병원균에 對抗하는 것이다. 여기에는 병원균의 공격부위에서만 만들어지는 phytoalexin類 관련유전자와 단백질분해효소 억제물질(proteinase inhibitor)을 생성하는 유전자와 같이 공격부위는 물론 공격부위에서 먼 부위에서까지 발현되는 것들이 있다. 최근에는 토마토에서 순수 분리되어진 PI유전자의 mRNA로부터 cDNA를 만들어 담배에 도입시킨 결과 *Manduca sexta* 유충의 성장을 현저히 抑制한다는 보고(Johnson et al., 1989)와 더불어 콩과 식물인 cowpea에서 분리된 PI유전자를 담배에 도입하여 *Heliothis virescens* 유충에 저항성을 나타내었다는 보고(Hilder et al., 1987)도 있다. 그러나 지금까지 PI유전자에 대한 실험은 대부분 分子的 수준에서 유전자

發現機作과 特異성에 국한되어 있는 것이 사실이다.

따라서 본 研究는 토마토에서 분리된 proteinase inhibitor II (PI-II) 유전자를 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하여 種 분화가 다양한 *Brassica* 屬인 꽃양배추(*Brassica oleracea* var. *acephala* DC)에 도입하기 위하여 형질전환시 조직절편 으로부터 식물체 재분화효율 향상 및 유전분석 등에 대하여 일련의 실험을 遂行하였고 그 결과를 보고하고자 한다.

材料 및 方法

형질전환 및 식물체 재분화

꽃양배추(*Brassica oleracea* var. *acephala* DC.) '은배'의 종자를 1% NaOCl(active chlorine, 10~12%)용액에 30분간 살균하고 멸균수로 수세한 후 sucrose 3%와 한천 0.8%를 함유한 MS배지에 파종하여 25 ± 2°C, 1일 16시간 명배양하였다. 무균배양 5~7일후 자엽은 엽병이 2 mm 부착된 상태로 절단하고, 하배측은 1 cm 길이로 잘라 BA 1.0 mg/L가 첨가된 MS배지에 1일간 전배양한 다음 공동배양(cocultivation) 재료로 사용하였다. 사용한 균주는 binary vector 시스템으로 클로닝된 pGA 875와 helper plasmid로 pAL4404를 가진 *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404로써 pGA 875의 구조는 토마토에서 분리된 661 base pair의 PI-II 유전자의 cDNA가 약 400 bp의 35S promoter와 nopaline synthase의 terminator(T_{nos})사이에 삽입되어 있으며, 形質轉換植物體를 選擇할 수 있는 표지유전자로 neomycin phosphotransferase gene II (NPT-II)를 Ti-plasmid의 T-DNA border sequence사이에 가지는 구조이다(Figure 1). pGA 875가 든 *A. tumefaciens*를 kanamycin 15 µg/ml와 tetracyclin 5 µg/ml이 첨가된 YEP(1% peptone, 1% yeast extract, 0.5% NaCl) 液體培地에서 28°C, 暗상태로 48시간 동안 분당 160 rpm으로 진탕배양한 다음 spectrophotometer 600 nm에서 optmal density가 0.5일때 하배측과 2일간 공동배양 하였다. 형질전환시 植物體 再分化 및 형질전환 효율

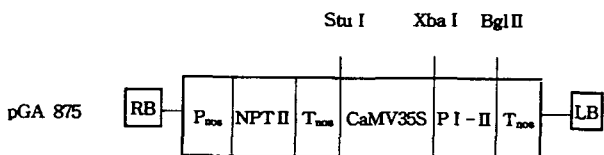


Figure 1. Structure of the binary vector pGA 875. Abbreviations used are : P_{nos}: nopaline synthase promoter, NPT II: neomycin phosphotransferase type II, T_{nos}: polyadenylation signal of the nopaline synthase gene, CaMV35S: 35S promoter of cauliflower mosaic virus, PI-II: coding region of the proteinase inhibitor-II cDNA of tomato, RB: T-DNA right border, LB: T-DNA left border.

향상을 위하여 재분화배지에 AgNO₃(0, 1, 2, 3 mg/L)를 첨가하거나 공동배양배지내 pH(5.5, 5.8)를 달리하여 식물체 재분화율을 조사하였다. *Agrobacterium*과 공동배양후 자엽과 하배측으로부터 균을 제거하기 위하여 carbenicillin 500 mg/L와 kanamycin 20 mg/L가 첨가된 재분화배지에 옮긴 후 25°C, 16시간 일장하에서 배양하였으며 2주마다 새로운 배지로 옮겨 주었다. 再分化된 shoot는 500 mg/L의 carbenicillin과 10 mg/L의 kanamycin이 첨가된 MS 배지에 이식하여 뿌리를 유도하고 뿌리가 형성된 꽃양배추는 포트에 이식하여 온실에서 순화시킨 다음 遺傳分析에 사용하였다.

再分化된 植物體의 kanamycin 耐性檢定

재분화된 식물체의 kanamycin내성을 조사하기 위하여 온실에서 완전히 순화시킨 형질전환된 식물체의 잎을 0.5% NaOCl용액에 15분간 살균하고 멸균수로 3회 이상 수세한 다음 5 × 5 mm 크기로 잘라 kanamycin 30 mg/L가 첨가된 재분화배지에 배양하고 3주후에 생존율을 조사하였다.

PCR에 의한 遺傳分析

PI-II 유전자가 대상식물체의 염색체내에 삽입되었는지의 여부를 확인하기 위하여 PCR분석을 수행하였다. Kanamycin 耐性檢定에 의해 形質轉換이 확인된 식물체의 잎으로부터 DNA를 分離(Murray and Thompson, 1980)하여 TE용액에 1 µg/µl 濃度로 하여 template DNA로 이용하였다. PCR 反應溶液은 10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 15 mM MgCl₂, 200 µM dNTP(GIVBCO BRL), 100ng primer, 50ng template DNA 및 25 unit Tag & DNA polymerase(Promega)를 넣고 전체 반응용액은 50 µL가 되게 하였으며, 반응하는 동안 水分蒸發을 막기 위하여 mineral oil을 한 방울씩 첨가하였다. HYBAID Thermal Cycler를 이용한 첫 DNA 변성은 95°C에서 5분간, 그후의 DNA변성은 95°C에서 1분간, annealing은 58°C에서 2분간 그리고 DNA 합성은 72°C에서 2분으로 35 cycle을 실행했으며, 최종 DNA합성은 5분으로 하였다. 합성된 DNA는 1.2% agarose gel로 전기영동하고 EtBr에 염색하여 UV lamp에서 band를 확인하였다. PI-II 遺傳子 分析을 위한 primer들은 PI-II 유전자의 48~70과 498~520까지로 그 sequence 들은 각각 5'-CAT GGC TGT TCA CAA GGA AGTT-3'과 5'-CTA GAC TTG TCC ATC TTC TGGA-3'이다.

Southern blot 分析

PCR方法으로 꽃양배추의 염색체 내에 삽입되어 있는 것

으로 확인된 PI-II 유전자가 形質轉換시 사용된 *Agrobacterium*내의 binary vector 시스템으로 cloning된 遺傳子 인지를 확인하기 위하여, 도입된 PI-II 유전자를 PCR방법으로 증폭한 후, Spe I, BamH I으로 double digestion한 0.7kb의 PI-II 절편을 ECL-labelling & Detection Kit(Amersham)을 이용하여 labelling하여 probe로 사용하였다. PCR방법에 의해 증폭된 DNA를 1X TAE buffer를 사용하여 1.2% agarose gel에서 전기영동하고 0.5 μ g/ml ethidium bromide 용액에 염색한 후, capillary transfer 방법(Southern, 1975)으로 nylon membrane에 전이 시켰다. DNA가 전이된 memberane을 prehybridization 용액(ECL golden buffer, 0.5M NaCl, 5% blocking reagent)에서 3시간동안 전처리한 후 ECL labelling kit로 표시된 탐침을 첨가하여 42°C에서 8시간 반응시켰다. Hybridization이 완료된 membrane은 42°C에서 washing buffer(0.4% SDS, 20X SSC, 3.6% urea)용액으로 20분간 2번 세척하였다. 그리고 상온에서 2XSSC 용액으로 5분간 2번 세척하였다. 세척된 membrane은 상온에서 X-ray film에 노출시켰다.

結果 및 考察

형질전환 및 식물체 재분화

*Agrobacterium*과 공동배양기간 중 배지내의 pH가 식물체 재분화에 미치는 영향을 조사한 결과(Figure 2) 공동배양배지의 pH가 5.5일 때 하배축과 자엽 모두 높은 재분화율을 나타냈는데, 이는 식물조직배양에서 주로 이용되는 배지의 pH인 5.8보다 조금 낮았다. 즉, *Agrobacterium*과의 공동배양에 사용되는 배지의 pH는 약간 산성을 띄는 것이 菌의 감염을 촉진시키는 것으로 나타났으며 이러한 결과는 Godwin 등(1991)이 배추의 잎에 *A. tumefaciens*를 감염시

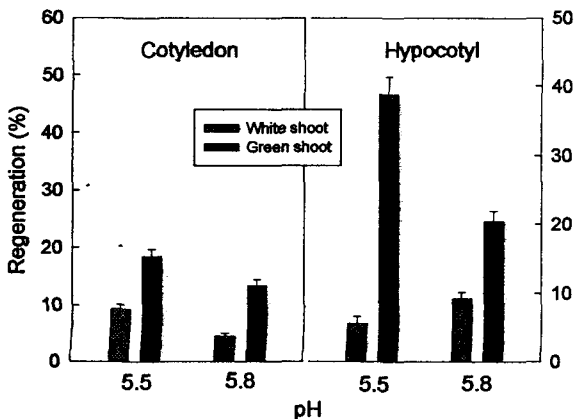


Figure 2. Effect of pH on shoot regeneration from cotyledon(left) and hypocotyl(right) cultures of *B. oleracea* var. *acephala* on cocultivation medium.

켰을 때 pH 5.5에서 가장 높은 종양 형성율을 보인다는 결과와 일치하였다.

선발배지내 $AgNO_3$ 가 꽃양배추의 자엽과 하배축으로부터 식물체 재분화에 미치는 영향을 조사한 결과(Figure 3) 자엽에서는 $AgNO_3$ 가 첨가되지 않은 MS 배지에서 식물체 재분화율이 15.6%인데 비해 2 mg/L의 $AgNO_3$ 가 함유된 배지에서는 23.3%의 재분화율을 나타내어 $AgNO_3$ 의 효과가 인정되었다. 그러나 하배축에서는 $AgNO_3$ 를 첨가하지 않은 배지에서 34.4%로 가장 높은 식물체 재분화율을 나타내어 $AgNO_3$ 의 효과가 없는것으로 나타났다. 배지내에 에틸렌 합성 억제제인 $AgNO_3$ 를 첨가하여 형질전환체의 획득 빈도를 높였다는 보고는 배지내 첨가되는 $AgNO_3$ 의 濃度에 다소 차이는 있으나 *B. juncea* (Barton and Miller, 1993; Pental et al., 1993), 감자(De Block, 1988), 밀(Purnhauser et al., 1987) 등에서 이미 확인된 바 있다. 꽃양배추에서도 역시 그 효과가 인정되었으나 배양조직에 따라 차이가 있었는데 이는 배양시 조직내에서 생성되는 에틸렌의 양이 배양부위에 따라 차이가 다른데 기인 한 것으로 추정된다. $AgNO_3$ 의 배지내 첨가는 배지 殺菌 후에 반드시 첨가하고, 캘러스 유거나 식물체 재분화에는 효과적이거나 시간이 경과될수록 배지의 褐變現象이 일어나 $Ag_2S_2O_3$ 에 의한 生長抑制現象이 발생하여 shoot 분화 후 발근에는 억제적인 효과를 나타낸다고 하였다. 뿐만아니라 배지내 첨가되는 $AgNO_3$ 에 의해 발생하는 Ag^+ 이온의 생장억제효과를 방지하기 위해서는 공동배양후 菌의 제거를 위해서 배지내 첨가되는 항생제는 carbenicillin 이나 triacillin을 250~500 mg/L 첨가하여 사용하는 것이 Ag^+ 이온에 의한 배지내 갈변현상을 억제시킬 수 있다고 하였다(De Block et al., 1989).

pGA 875를 가진 *A. tumefaciens*와 공동배양후 kanamycin 20 mg/L가 첨가된 선발배지에서 再分化된(Figure 4) 녹색식물체를 온실에서 순화시킨다음 잎을 절취하여 kanamycin 내성정도를 조사하였다. 배양 2주후 형질전환된 꽃양배추의

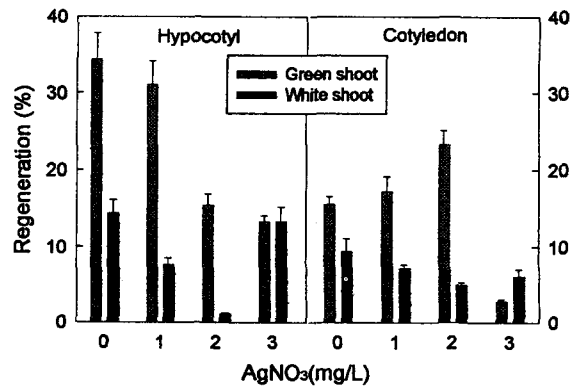


Figure 3. Effect of $AgNO_3$ concentration on shoot regeneration from cotyledon(left) and hypocotyl(right) cultures of *B. oleracea* var. *acephala* on Km selection medium.

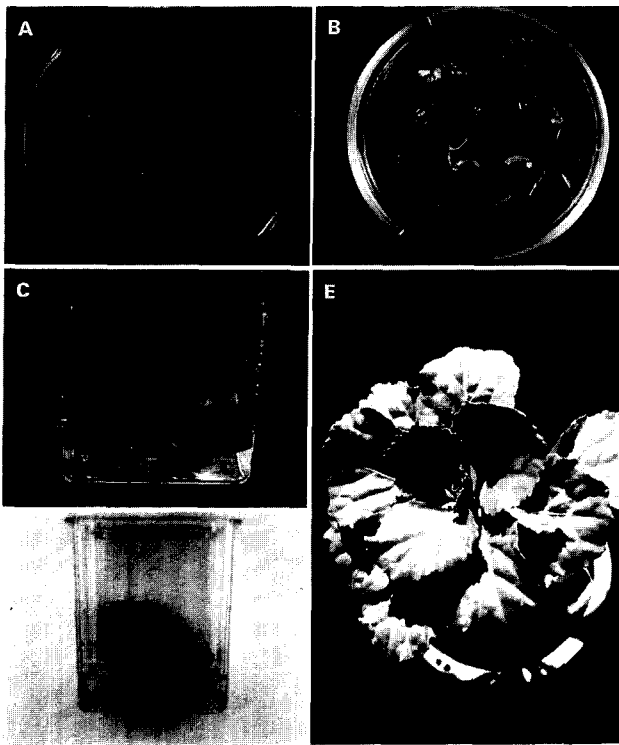


Figure 4. Shoot regeneration from cotyledonary petiole and hypocotyl explants of *B. oleracea* cocultivated with *A. tumefaciens*. A: plant regeneration from cotyledonary petioles on selection medium, B: plant regeneration from hypocotyls on selection medium, C: shoot development on selection medium, D: shoot cultured on rooting medium with 10 mg/L kanamycin for 3 weeks, E: transgenic plant on pot.



Figure 5. Leaf disc assay of transgenic plant and normal plant on shooting media containing 30 mg/L kanamycin. The photograph was taken after 3 weeks of culture. A: control plant, N: nontransgenic plant, T: transgenic plant.

있는 kanamycin이 첨가된 배지에서도 짙은 녹색을 띄거나 캘러스가 형성된 반면 형질전환되지 않은 대조구의 잎은 고사하였다(Figure 5). 일반적으로 kanamycin을 선발 표시인

Table 1. Transformation frequency from cotyledon and hypocotyl cultures of *B. oleracea* var. *acephala* using *Agrobacterium tumefaciens*.

Explant	Transformed explants/total explants (%)	NPT ⁺ shoots	Transformation frequency* (%)
Cotyledons	15/334 (4.5)	10	3.0
Hypocotyl	23/360 (6.4)	17	4.7

*Conservative estimate of transformation frequency based on leaf disc assay.

자로 이용하여 형질전환된 식물체가 kanamycin에 내성을 갖는다는 것은 감자(De Block, 1988), 유채와 배추 등(De Block et al., 1989)에서 잘 알려져 있다. 다만 형질전환시 *A. tumefaciens*의 T-DNA border상에 위치한 유전자가 식물체 게놈상에 삽입될때 일부가 손상을 입거나 완전하게 삽입이 이루어지지 않았을 경우도 있다. 따라서 형질전환된 식물체의 잎에 대한 kanamycin 내성정도만을 가지고 유용유전자의 형질전환 여부를 판단하기는 곤란하다. 그러나 복잡한 분자수준의 유전분석 이전에 일차적으로 형질전환여부를 판단하는 수단으로는 유용하게 활용되어질 수 있을것으로 판단된다.

또한, 잎의 kanamycin 내성검정 결과 식물조직의 종류에 따라서도 형질전환 효율이 다르게 나타났는데 자엽에서 3.0%, 하배축에서 4.2%의 형질전환 효율을 나타내었다(Table 1). 이러한 형질전환 효율은 Moloney 등(1989)이 유채의 자엽조직을 이용한 실험에서 형질전환효율이 60% 이상이었다고 한 결과 보다 효율면에서 매우 낮은 것으로 나타났다. 그러나 Radke 등(1988)이 유채의 하배축 조직을 이용한 형질전환 실험에서 형질전환 효율이 2.5% 였다고 한 연구결과 보다 다소 높게 나타났다. 이러한 차이는 식물체의 중간 재분화를 뿐만 아니라 사용된 plasmid의 종류가 다른데서도 기인 한 것으로 판단된다.

形質轉換 確認 및 유전자 發現

재분화된 식물체의 kanamycin 내성검정 결과 形質轉換이 된 것으로 추정되는 꽃양배추에서 殺蟲性 遺傳子가 식물체 게놈상에 정확히 삽입되어 있는지를 확인하기 위하여 먼저 PCR을 수행한 다음 전기영동하여 본 결과 대조구에서는 어떤 band도 확인할 수 없었지만 형질전환된 식물체에서는 약 500 bp의 PI-II band들이 존재함을 확인할 수 있었다(Figure 6A). Lane 1은 토마토 cDNA library로부터 분리한 PI-II 유전자를 증폭한 것이며, lane 3, 4, 5, 6, 7은 형질전환된 꽃양배추로부터 증폭된 PI-II 유전자이다. 이들 모두에서 약 500 bp의 절편을 볼 수 있었으나, 형질전환되지 않은 꽃양배추(lane 2)에서는 이 절편이 보이지 않아 PI-II 유전자가 꽃양배추 게놈상에 삽입되어 있음을 알 수 있었다. 또

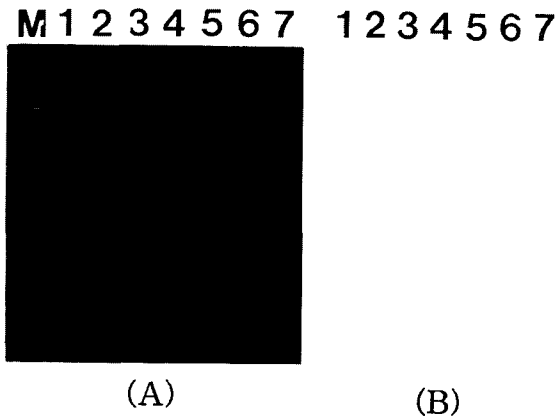


Figure 6. Agarose gel electrophoresis (A) and Southern blot analysis (B) of PCR amplification products. m: marker, lane 1: amplified product from plasmid pGA 875, lane 2: amplified product from genomic DNA of nontransformed plant, lanes 3, 4, 5 and 6 amplified products from genomic DNA of transgenic plants transformed with pGA 875. The arrow indicates approximately 473 bp of amplified PI- II product.

한 PCR로 증폭한 절편이 PI- II 유전자인지를 검정하기 위하여 Southern blotting을 수행한 결과 형질전환된 꽃양배추(lane 3, 4, 5, 6, 7)와 PI- II 유전자를 증폭한 것(lane 1)에서 모두 band가 나타나 증폭된 DNA가 PI- II 유전자임을 확인하였다(Figure 6B).

摘 要

꽃양배추의 하배축 조직을 proteinase inhibitor II 유전자가 도입된 *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404와 2일간 pH 5.5로 조절된 MS 액체배지에서 공동배양후 carbenicillin 500 mg/L, kanamycin 20 mg/L와 BA 1 mg/L가 함유된 MS 재분화배지에 옮겼다. 이들 조직을 매 2주마다 계대배양하였으며 약 4주후에 kanamycin 저항성 개체를 얻었다. 형질전환된 것으로 추정되는 식물체는 kanamycin 30 mg/L가 함유된 선발배지에서 생존하였다. PCR 분석결과, PI-II 유전자가 형질전환체의 게놈상에 삽입되어 있음을 확인하였다. 형질전환체의 Southern blot 분석을 통하여 ECL-labelling된 PI-II 유전자와 동일한 것으로 판단되는 약 500bp 위치에서 밴드를 확인할 수 있었다.

引用文獻

Barton KA, Miller MJ (1993) Production of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins in plants. In ; Kung S and Wu R (eds.) Transgenic Plants Vol. I.

- Academic Press Sandiego California pp. 297-315
- De Block M (1988) Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum Tuberosum*) using *Agrobacterim tumefaciens*. Theor Appl Genet 76: 767-774
- De Block M, Brouwer DD, Tenning P (1989) Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the bar and neo genes in the transgenic plants. Plant Physiol 91: 694-701
- Delanny X, Lavalle BJ, Proksch RK, Fuchs RL, Slims SR, Greenplate JT, Marroone PG, Dodson RB, Augustine JJ, Layton JG, Fischhoff DA (1989) Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurtaki* insect control protein. Bio/Technology 7: 1265-1269
- Godwin I, Todd G, Ford-Lloyd B, Newbury HJ (1991) The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plant species. Plant Cell Reports 9: 671-675
- Harrison BD, Mary MA, Baulcombe DC (1987) Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic satellite RNA. Nature 328: 799-802
- Hilder VA, Gatehouse AMR, Sheerman SE, Barker RE, Boulter D (1987) A nobel machanism of insect resistance engineered into tobacco. Nature 300: 160-163
- James C (1996) Progress of genetic engineering in field and horticulture crops. Asian Seed 3(5): 18-19
- Johnson R, Narvaez J, An G, Ryan C (1989) Expression of Proteinase inhibitor I and II in transgenic tobacco plant ; Effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. Proc Natl Acad Sci USA 86: 9871-9875
- Miki BL, Labbe H, Hattori J, Ouellet T, Gabard J, Sunohara G, Charest PJ, Iyer VN (1990) Transformation of *Brassica napus* canola cultivars with *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacide synthase genes and analysis of herbicide resistance. Theor Appl Genet 80: 449-458
- Moloney MM, Walker JM, Sharma KK (1989) High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. Plant Cell Reports 8: 238-242
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nudl Acids Res 8: 4321-4325
- Pental D, Pradhan AK, Sodhi YS, Mukhopadhyay A (1993) Variation amongst *Brassica juncea* cultivars for regeneration from hypocotyl explants and optimization of conditions for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. Plant Cell Reports 12: 462-467
- Purnhauser L, Medgyesy P, Czako M, Dix PJ, Marton L (1987) Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbagenifolid* Viv. tissue cultures using the ethylene inhibitor AgNO₃. Plant Cell Rep 6: 1-4
- Radke SE, Andrews BM, Moloney MM, Crouch ML, Kridl JC, Knauf VC (1988) Transformation of *Brassica napus* L. using *Agrobacterium*

tumefaciens ; developmentally regulated expression of a reintroduced napin gene. Theor Appl Genet 75: 685-694

Shah DM, Horsh RB, Klee HH, Kishore GM, Winter JA, Tumer NE, Hiromaka CM, Sanders PR, Gusser CS, Aykent S, Siegal NR, Roger S, Franley RT (1986) Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. Science 233: 478-481

Southern E (1975) Detection of specific sequences among DNA

fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98: 503-512

UN (1935) Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experinental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertization. Japan J Bot 7: 389-452

(1997년 10월 16일 접수)