식물조직배양학회지 제28권 제3호
Korean J. Plant Tissue Culture
Vol. 28, No. 3, 153~157 (2001)

# 원형질체 배양을 통한 배추 (*Brassica campestris* ssp. *perkinensis*) 캘러스 형성 및 뿌리분화

염옥희 · 전익조 · 김혜진 · 백남권[1] · 임학태*
강원대학교 식물응용과학부 & 한국감자 육종소재 은행, [1]중앙종묘(주) 오산육종연구소

# Callus Formation and Rooting of Inbred Lines of Chinese Cabbage (*Brassica campestris* ssp. *perkinensis*) Though Protopalst Culture

LIAN, Yu-ji · CHUN, Ik-Jo · KIM, Hei-Jin · BACK, Nam-Kyuen[1] · LIM, Hak-Tae*
*Division of Applied Plant Sciences & Center for the Korea Potato Genetic Resources (KPGR), Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea*
*[1]Choong ang Seed CO., LTD. Osan Breeding Institute*

**ABSTRACT** Protoplasts were isolated from hypocotyls, cotyledons, and young leaves of Chinese cabbage grown under *in vitro* environmental condition. An enzyme mixture of 1% Cellulysin and 0.5% Macerozyme in combination with 0.4 M mannitol was most effective condition for protoplast isolation. The highest yield of protoplasts, $7.6 \times 10^5$ protoplast/g of fresh weight, was obtained from the treatment of leaves for 12~16 hours at 27~28℃ with shaking at 30 rpm. The most suitable medium for an initial cell division was K8p basal medium supplemented with 5 mg/L 2,4-D and 2 mg/L kinetin. Within 7~10 days, protoplasts derived from hypocotyl and cotyledon tissues formed cell colonies. When the cells were grown at the size of 8~10 cells, they were embedded into semi-solid medium containing 0.2% agarose. Calli derived from protoplast culture were transferred to the 100 different types of plant regeneration media, but no completely regenerated plants from inbred lines of Chinese cabbage used for this study were obtained, though frequent rooting took place in several media tested.

**Key worlds:** Calli, cell division, enzyme mixture, mannitol, semi-solid medium

## 서 론

십자화과는 채소, 기름, 조미료, 사료로 널리 이용되는 경제적으로 아주 중요한 작물이다 (Pua 1993). 특히 배추는 한국에서 김치의 재료로 중요하게 이용되고 있을 뿐만 아니라 종자 및 김치의 해외수출을 통한 외화 획득원으로 중요한 위치를 차지하고 있는 작물이다. 지난 수십년 동안 이러한 *Brassica* 속 작물의 품질 향상을 위한 필요한 형질들은 종속간에 필요한 형질을 옮기는 유성교잡의 방법으로 성공적으로 시도되어 왔다. 하지만 고전적인 교잡방법은 야생종이나 근연관계가 먼 품종의 내병성, 내충성 그 외의 유용형질들은 종속간의 불화합성으로 인해 유전자 전이의 가능성이 제한되어 왔다 (Lian and Lim 2001b). 이러한 문제를 극복하기 위하여 최근 생물공학기술의 급속한 발전과 더불어 특정한 유전자만을 도입하는 형질전환기술과 유성교잡이 어려운 작물 간의 유전자도입을 가능하게 하는 원형질체 융합방법들은 관행육종방법으로 불가능한 종속 간의 개념을 초월할 수 있는 방법으로 육종가들의 각광을 받고 있다.

십자화과 원형질체 배양기술은 70년대 중기에 급속히 발달하기 시작하면서 많은 십자화과 원형질체 배양에 대한 연구

*Corresponding author. Tel 033-250-6425 Fax 033-254-3835
URL www.potatokorea.com E-mail limhakta@cc.kangwon.ac.kr

들이 활발하게 이루어져 왔다. *Brassica* 속에서 *B. oleracea*와 *B. napus*에서 여러 가지 부위의 식물재료를 이용한 원형질체 재분화 연구결과들이 보고되었으며 (Poulsen and Nielsen 1989; Loudon et al. 1989, Kao et al. 1990; Hansen and Earle 1994; Lee et al. 1995; Olin-Fatih 1996), *B. juncea*에서도 원형질체 배양에 의한 효율적인 식물체 재분화 연구결과들이 보고되었다 (Kirti and Chopra 1990; Narasimhulu et al. 1993; Lian and Lim 2001a).

*B. campestris*에서도 원형질체 배양에 관한 연구결과들이 보고되었지만 (Hegazi et al. 1992; Zhao et al. 1994) 단지 캘러스만을 얻었거나 재분화가 되었다고 하더라도 재분화율이 아주 저조했고, 사용된 재료도 재분화가 상대적으로 용이한 F1 시판품종을 사용하였다. 선진국들은 원형질체 배양에 의한 재분화 연구뿐만 아니라 원형질체 융합에 의한 세포질 웅성불임 특성 및 병저항성과 같은 유용형질들을 도입하는 연구들을 활발하게 진행시켜 오고 있다 (Hansen and Earle 1995; Cardi and Earle 1997; Sigareva and Earle 1997; Arumugam et al. 2000; Ren et al. 2000). 최근 외국의 종묘회사에서 원형질체 배양을 이용한 응용분야에 더 많은 연구투자를 하고 있다고 한다. 그러한 이러한 십자화과의 원형질체 융합은 원형질체 배양이 어려운 배추보다는 양배추, 배추, 갓 등의 다른 십자화과 채소에 집중되고 있다 (Lian and Lim 2001a, b).

배추는 한국의 주요 채소작물 중의 하나임에도 불구하고 품질향상을 위한 연구들이 전통육종이나 형질 전환방법에 국한되어 있어 원형질체 배양 및 융합을 통한 품종육종은 전무한 상황이다. 뿐만 아니라 원형질체 융합에 있어 초기 조건확립은 다른 조직배양과 마찬가지로 아주 중요함에도 불구하고 전 세계적으로 배추의 원형질체 배양에 관한 기초연구는 거의 없는 실정이다. 본 연구에서는 원형질체 융합기술을 통한 질적 형질을 개선하는 종간 잡종식물체 육성을 위한 원형질체 분리, 배양조건 및 callus 형성과 기관분화에 미치는 조건들을 밝히고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

실험에 사용된 식물재료들은 중앙종묘에서 분양받은 배추 inbred line들인 KW2, KW9, KW23, KW24이다. 종자들은 70% 에탄올에 1분간 소독한 후, 멸균수로 3번 세척하고, 50% 락스로 (물 : 유한락스 = 1 : 1) 20분간 표면살균하였다. 멸균수로 세 번 세척하여 3% sucrose가 포함된 MS 기본배지 (Murashige and Skoog 1962)에 치상하였다. 하배축과 자엽 및 어린잎조직을 원형질체 분리재료로 이용하였으며 식물체는 MS 배지에 2~3주마다 한 번씩 계대배양하여 유지시켰다. 배양은 25±1℃로 조절되는 배양실에서 16시간 광주기 조건에서 배양하였다.

### 원형질체 분리

효율적인 배추 원형질체 분리와 많은 양의 원형질체를 얻기 위하여 세포벽 분해효소인 Cellulysin과 Macerozyme의 농도, 원형질체 분리온도, 효소 처리시간, 진탕시간, 진탕속도를 다르게 하여 원형질체 분리를 시도하였다. 원형질체 분리는 1 g 정도의 기내에서 생장한 배추의 자엽과 하배축 및 어린잎을 멸균된 petridish위에 놓은 다음 전처리 용액 TVL 용액 (54.6 g/L sorbitol, 7.4 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ pH 5.6~5.8)을 넣고 날카로운 해부칼날을 사용하여 식물체를 사방 1~0.5 mm 정도의 크기로 작게 자른 후, 암 상태에서 1시간 preplasmolyse를 시켰다. 그 후 pasteur pipette을 사용하여 TVL 용액을 제거하였고 10 mL 가량의 여과소독한 enzyme 용액을 첨가하였다. 효소는 Cellulysin을 0.5, 1% 농도로, Macerozyme은 0.1, 0.5, 1% 농도로 조합하였다.

효소처리한 세포현탁액은 50 $\mu$m체로 세포 찌꺼기들을 걸러낸 다음 CPW21S용액 (27.2 mg/L $KH_2PO_4$, 101 mg/L $KNO_3$, 1480 mg/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 246 mg/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.14 mg/L KI, 0.025 mg/L $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 21% sucrose, pH 5.5~5.8)으로 세포들을 현탁시켜 원심분리 튜브에 담아 800 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 순수한 원형질체들은 세포 찌꺼기들과 분리되어 원심분리 튜브 윗면에 띠 모양으로 나타나는데 이 부분을 pasteur pipette로 조심스럽게 취하여 새 원심분리 튜브에 옮긴 다음 원형질체 세척용액 W5 (18.4 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 9 g/L NaCl, 1.0 g/L glucose, 0.8 g/L KCl, pH 5.6~5.8)로 2회 세척한 후 상층액을 버리고 침전물을 1 mL의 W5용액으로 다시 현탁하여 0.02 mm의 Sperm counter (Hausser 3900, 1/400-mm square)를 이용하여 원형질체수를 조사하였다.

### 원형질체 배양

분리된 원형질체는 배양배지로 $2.5 \times 10^4$-$5 \times 10^4$ protoplasts/mL의 빈도수가 되도록 희석하여 지름이 6 mm인 petridish에 배양하였다. 이 때 사용한 배지는 수정된 K8p (Glimelius et al. 1986) 배지에 2,4-D와 kinetin을 조합하여 첨가하였다. 초기배양 7~10일 후 원형질체가 분열하기 시작하면 0.2%의 agarose가 첨가된 반고체배지에 고정시켜 배양하였다. 이 때 사용하는 배지는 K3 (Kao and Michcharyluk 1975) 배지를 기본으로 하였으며, 당 농도는 초기배지보다 낮은 0.1M sucrose를 사용하였고 식물생장조절제로는 0.5 mg/L 2,4-D, 0.025 mg/L NAA와 0.025 mg/L BAP를 첨가하여 배양하였다. 형성된 calli들은 식물체 재분화를 유기시키기 위하여 MS 기본배지에 zeatin, BAP, NAA, IAA를 첨가하여 배양하였다.

## 결과 및 고찰

### 원형질체 분리 및 callus 형성

식물체의 나이, 성장조건 및 부위는 원형질체 분리 및 배양에 아주 중요한 작용을 하며 효소의 종류와 농도 역시 원형질체의 생산량 및 활력에 직접적으로 영향을 주는 주된 요인 중의 하나이다 (Hegazi et al. 1992). 배추 하배축과 자엽 그리고 계대 배양한 지 2~3주 된 어린잎을 이용하여 많은 량의 원형질체를 얻을 수 있었다. 원형질체 분리에서 가장 중요한 것이 사용되는 효소의 종류와 농도이며, 이는 원형질체의 생산량 및 원형질체의 활력에 직접적으로 영향 주는 주된 요인중의 하나이다.

배추에 가장 적합한 원형질체 분리조건들을 알아보기 위하여 배추의 자엽, 하배축 및 어린잎을 이용하여 효소농도, 배양온도, 진탕속도를 다르게 하여 실험을 수행하였는데 1% Cellulysin과 0.5% Macerozyme의 조합이 배추 원형질체 분리에 가장 적합하며 어린잎에서 $7.6\times10^5$ protoplasts/g의 가장 많은 양의 원형질체를 얻었을 수 있었다 (Table 1). 효소처리는 enzyme의 활성이 좋은 23~24℃에서 12~16시간 배양시킨 후 30~40 rpm 정도의 회전 진탕속도로 1~2시간 분리하거나, 27~28℃의 항온상태에서 30 rpm 정도의 회전 진탕시키면서 반응시켰다. 원형질체 분리효과는 27~28℃에서 12~16시간 계속적으로 회전진탕한 것이 더 좋았는데 반응 6~8시간 후 세포벽들이 분해되면서 많은 원형질체들이 조직에서 분리되어 나오는 것을 관찰할 수 있었으며 (Figure 1A), 12~16시간 처리 후 세포벽이 완전히 분해되어 원형질체가 분리되어 나오는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 1B). 효소처리를 하는 동안 30 rpm 속도로 가볍게 진탕하면서 배양하면 효소용액이 식물조직과 접촉하는 빈도가 높아지면서 원형질체가 세포에서 더 쉽게 분리되기 때문에 더 많은 양의 원형질체를 얻을 수 있었다. 그러나 진탕 속도가 40 rpm 이상일 때 세포가 쉽게 파괴되어 원형질체 양이 적었다. (Table 2). CPW21S 용액으로 원형질체들을 세포 찌꺼기들과 분리시켜 W5용액으로 두 번 이상 세척하여 순수한 원형질체들을 얻었다 (Figure. 1C).

**Table 1.** Effect of enzyme concentrations on the protoplasts yields of *B. campestris* (KW9).

| Enzyme Solution | E1 | E2 | E3 | E4 |
|---|---|---|---|---|
| Solution | K3 medium, 0.4 M mannitol, pH 5.6~5.8 | | | |
| Yields of Protoplast (1×protoplasts/g) | $4.5\times10^5$ | $7.6\times10^5$ | $4.4\times10^5$ | $4.8\times10^5$ |

E1 Cellulysin 1%, Macerozyme 0.1%; E2: Cellulysin 1%, Macerozyme 0.5%; E3: Cellulysin 0.5%, Macerozyme 1%; E4: Cellulysin 1%, Macerozyme 1%.

**Table 2.** Factors influencing on protoplast yield of *B. campestris* (KW9).

| Temperature | 23~24℃ | | | 27~28℃ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pre-incubation time (hour) | 12~16 | | | - | | |
| Shaking speed (rpm) | 20 | 30 | 40 | 20 | 30 | 40 |
| Incubation with Shaking (hour) | 1~2 | | | 12~16 | | |
| Protoplast yield ($1\times10^5$/g) | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 6.5 | 7.6 | 5.1 |

- : direct incubation with shaking.

### 원형질체 배양 및 callus 형성 및 기관분화

하배축, 자엽 및 어린잎에서 분리된 원형질체를 배양할 때 하배축과 자엽에서 분리된 원형질체는 배양 2일 후 세포분열을 시작하여 배양배지에 떠있는 것을 관찰할 수 있었으나 잎에서 분리된 원형질체는 petridish 바닥에 가라앉은 상태로 있을 뿐 분열하지 않았으며 시간이 지남에 따라 세포가 갈변하면서 천천히 죽었다. 이러한 현상들은 Glimelius (1984)와 Zhao 등 (1994)의 연구에서도 관찰된 바가 있는데 이것은 더디게 생장하는 십자화과속의 세포들에서 독성물질들을 분비하여 세포의 생장을 저해하여 나타나는 것으로 알려졌다. 이러한 현상들은 세포가 분열하여 8~10세포 단계에서 가장 민감하게 나타나는데 이때 분열하는 세포들을 agarose 반고체배지 (semi-solid medium)에 고정시켜 배양하면 효과적으로 방지할 수 있었다.

자엽과 배축원형질체는 세포질로 가득 차 있어서 분열능력이 왕성하고 안정하여 (Kao et al. 1990) 원형질체 배양에 효과적이다. 비록 잎에서 분리된 원형질체의 수는 자엽이나 하배축에서 얻어진 것보다 많지만 효율적인 세포분열과 식물체 재분화를 위하여 자엽과 하배축을 원형질체 재료로 쓰는 것이 바람직한 것으로 사료된다.

원형질체 배양에서 세포벽의 재생, 세포분열 및 식물체 재분화는 배지 내에 접종된 세포의 밀도와 식물생장 조절물질의 영향을 받는다 (Eriksson 1986). 분리된 원형질체는 수정된 K8p 배지에 식물생장 2,4-D와 kinetin을 조합하여 배양하였는데 2,4-D가 5 mg/L 그리고 kinetin이 2 mg/L의 조합에 세포분열이 가장 활발한 것을 관찰할 수 있었다. 2,4-D 5 mg/L과 kinetin 2 mg/L을 첨가한 배지조합에서 세포분열이 활발하였지만 (Figure 1D) 캘러스들을 sucrose가 2% 함유된 MS기본배지에 2 mg/L zeatin, 0.5 mg/L BAP와 1 mg/L의 NAA가 첨가된 배지 옮겼을 때 캘러스는 연황색 혹은 흰색을 띄면서 캘러스가 커지기만 하고 기관분화가 형성되지 않았다. 이는 고농도의 2,4-D가 활발한 세포분열을 자극하나 기관 분화를 억제시키는 것으로 사료한다. 그러나 원형질체 초기배양배지에 1 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L BAP, 1 mg/L NAA 조합에 낮은 농도의 kinetin을 첨가하였을 때 세포들이 활발하게 분열하였을 뿐만 아니라 얻어진 캘러스들은 같은 재분화에 옮겼을 때 캘러스의 색깔도 연녹색을 띠었으며 캘러스

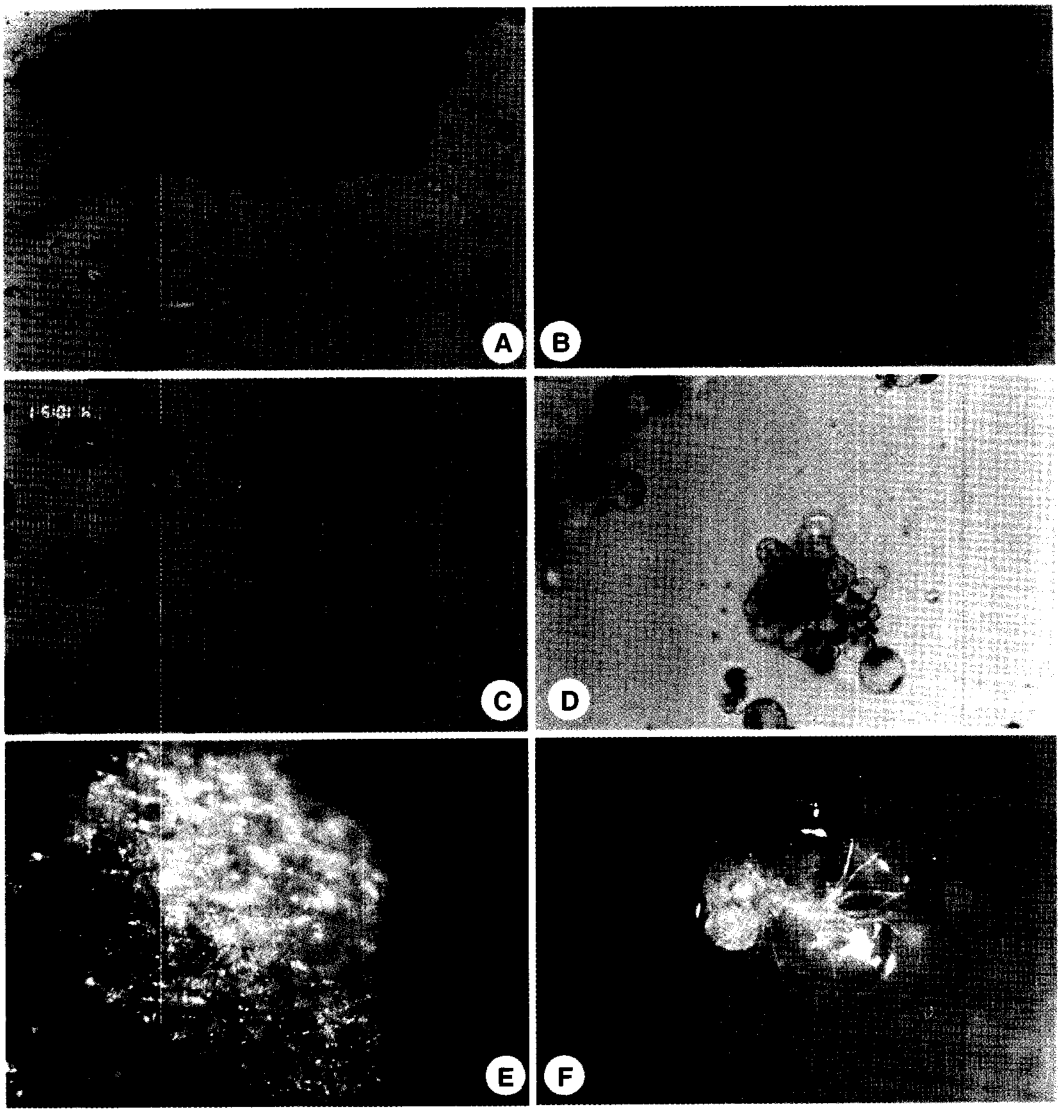

**Figure 1.** Photographes of protopalsts being isolated and differentiated into callus and roots. A, Protoplasts being released from Chinese cabbage leaf when exposed to cell wall digesting enzyme treatment; B, Protoplasts further released from leaf tissue prior to purification; C, Isolated and purified intact protoplasts; D, Cells at division; E, Callus from protoplasts-derived cell; F, Roots formed from protoplasts-derived callus.

에서 뿌리가 형성되는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 1E, 1F).

본 실험에서 배추의 자엽과 하배축, 어린잎을 사용하여 원형질체 분리 및 배양에 적합한 조건들을 밝혔으며 원형질체 배양을 통하여 캘러스를 형성시켰다. 비록 캘러스에서 신초가 형성되지 않고 뿌리만 형성되었지만 본 실험의 결과를 기초자료로 하여 *B. campestris*와 *B. oleracea* 간의 체세포 잡종 식물체를 생산하는데 성공하였다 (Lian and Lim 2001a). 또한 *B. juncea*를 사용한 조직배양과 원형질체 배양에 의한 식물체 재분화 체계가 확립되었기에 (Lian and Lim 2001b) 배추 원형질체 초기배양과 캘러스 배양에서 기관분화에 영향주는 요인들을 조절하고 기존의 배양방법을 더 체계화시킨다면 순계계통의 배추 원형질체 배양에서도 완전한 식물체 재분화를 가능하게 하는 기초자료를 제공하게 될 것이다.

## 적 요


기내에서 성장한 배추의 자엽, 하배축과 계대배양한 지 2~3주 되는 어린잎이 원형질체 분리재료로 사용되었다. 배추의 원형질체 분리에 가장 적합한 효소의 조합은 0.4 M mannitol을 삼투조절제로 한 1% Cellulysin과 0.5% Macerozyme의 효소조합이 배추 원형질체 분리에 가장 적합한 것으로 나타났으며, 잎조직을 27±1℃에서 30 rpm의 속도로 12~16시간 동안 효소와 반응시켰을 때 7.6×$10^5$ protoplast/g의 가장 많은 원형질체를 얻었다. 세포분열을 유기시키기 위하여 K8p 배지에 5 mg/L 2,4-D와 2 mg/L에 첨가하였을 때 배양 7~10일에 자엽과 하배축에서 분리한 원형질체에서 세포군들이 형성되었다. 분열한 세포가 8~10 세포크기 단계에 이르면

0.2% agarose 반고체 배지에 고정시켜 배양하였다. 얻어진 calli들을 100가지 다양한 재분화 배지에 옮겼으나 식물체의 재분화는 이뤄지지 않았지만, 간혹 캘러스에서 뿌리가 분화되는 것은 관찰할 수 있었다.

사사 - 본 논문은 농림기술관리센터의 연구비 지원에 의하여 수행된 과제의 연구 결과의 일분이며 연구비 지원에 감사드립니다.

## 인용문헌

**Arumugam N, Mokhopadhyay A, Gupta V, Sodhi YS, Verma JK, Pental D, Pradhan AK** (2000) Somatic cell hybridization of *'oxy'* CMS *Brassica juncea* (AABB) with *B. oleracea* (CC) for correction of chlorosis and transfer of novel organelle combinations to allotetraploid *Brassicas*. Theor Appl Genet **100**:1043-1049

**Cardi T, Earle ED** (1997) Production of new CMS *Brassica oleracea* by transfer of *'Anand'* cytoplasm from *B. rapa* through protoplast fusion. Theor Appl Genet **94**:204-212

**Eriksson TR** (1986) Protoplast isolation and culture. In: Fowke LC (eds), Plant protoplasts, pp.1-20.CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida

**Glimelius K** (1984) High growth and regeneration capacity of hypocotyl protoplasts in the genus *Brassica* Physiol Plant **61**:38-44

**Glimelius K, Mats D, Hugo FF** (1986) Selection and enrichment of plant protoplast het erokaryons of *Brassicaceae* by flow sorting. Plant Sci **45**:133-141

**Hanen LN, Earle ED** (1994) Novel flowering and fatty acid characters of rapid cycling Brassica napus L. resynthesized by protoplast fusion. Plant Cell Rep **14**:151-156

**Hansen LN, Earle ED** (1995) Transfer of resistance of *Xanthominas campestris pv campestris* into *Brassica oleracea* L. by protoplast fusion. Theor Appl Genet **91**:1293-1300

**Hegazi H, Hegazi, Matsubara S** (1992) Callus formation and plant regeneration from protoplast derived from cotyledons and hypocotyls of radish (*Raphanus sativus* L.) and other Cruciferous plants. J. Japan. Soc Hort Sci **61(1)**:63-68

**Kao KN, Michcharyluk MR** (1975) Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplast at very low population density in liquid media. Planta **126**:105-110

**Kao HM, Keller WA, Gleddie S, Brown GG** (1990) Efficient plant regeneration from hypocityle protopalsts of broccoli (*Brassica oleracea* L. ssp. *Italica* Plenck). Plant Cell Rep **9**:311-315

**Kirti PB, Chopa VL** (1990) Rapid plant regeneration through organogenesis and somatic embrogenesis from cultured protoplasts of *Brassica juncea*. Plant Cell, Tissue and Organ culture **20**:65-67

**Lee YH, Cho HS, Suh SC, Kim HI** (1995) Plant regeneration from hypocotyl-derived protoplasts of *Brassica oleracea* var *capitata*. Korean Society of Plant tissue culture **22**:7-11

**Lian YJ, Lim HT** (2001a) Production and Characterizations of Somatic Hybrids between *Brassica campestris* L. ssp perkinensis and *Brassica oleracea* L. var capitata. J. of Plant Biotechnology Vol. **3(1)** pp.33-38

**Lian YJ, Lim HT** (2001b) Plant Regeneration of *B. juncea* Through Plant Tissue and Protoplast Culture. J. of Plant Biotechnology Vol. **3(1)** pp.27-31

**Loudon PT, Nelson RS, Ingram DS** (1989) Studies of protoplast culture and plant regeneration from commercial and rapid cycling *Brassica* species. Plant Cell, Tissue and Organ culture **19**:213-224

**Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid grown and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant **15**:473-497

**Narasimhulu SB, Kriti PB, Prakash S, Chopra VL** (1993) Rapid and efficient plant regeneration from hypocotyl protoplasts of *Brassica nigra*. Plant cell, Tissue and Organ culture **32**:35-39

**Olin-Fatih** (1996) The morphology, cytology, and C-banded karyotypes of *Brassica campestris, B. oleracea, B. napus* plants regenerated from protoplasts. Theor Appl Genet **93**:414-420

**Poulsen GB, Nielsen SVS** (1989) Regeneration of plants from hypocotyl protoplasts of rapeseed (*Brassica napus* L.*var Oleifera*) cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ culture **17**:53-158

**Pua EC** (1993) Regeneration plant of *Brassica juncea* (L.) Czern&Coss (Brown Mustard). In: Bajaj YPS (eds), Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol 9 pp. 38-51. Springer-verlag Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong

**Ren JP, Dickson MH, Earle ED** (2000) Improved resistance to bacterial soft rot by protoplast fusion between *Brassica rapa* and *B. oleracea*. Theor Appl Genet **100**:810-819

**Sigareva MA, Earle ED** (1997) Direct transfer of a cold-tolerant Ogura male-sterile cytoplasm into cabbage (*Brassica oleracea* ssp. *capitata*) via protoplast fusion. Theor Appl Genet **94**:213-220

**Zhao KN, Malcolm I, Whitecross, Dennis J, Bittisnich** (1994) Studies on Plant regeneration from cotyledonary protoplasts in *Brassica campestris*. Plant Cell Rep **13**:164-170

(접수일자 2001년 4월 24일)