

# *Solanum melongena* var. *fructualbo*의 原形質體 遊離 및 培養

鄭載東 · 李河靜

慶北大學校 農科大學 園藝學科

## Protoplast Isolation and Culture of Mesophyll in *Solanum melongena* var. *fructualbo*

Chung, Jae Dong · Lee, Ha Jeong

Dept. of Horticulture, Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

### Summary

The experiments were conducted to identify several factors affecting isolation and culture of mesophyll protoplasts in *Solanum melongena* var. *fructualbo*.

Higher viable protoplasts were obtained, when isolated in 1.5% macerozyme, 0.2% macerozyme, 0.6M mannitol, 0.01M MES, 0.2% BSA containing solution adjusted to pH 6.3 for 4 hours.

One hour' plasmolysis of the material before digestion of leaf tissue was effective for protoplast yield and viability.

The method of washing and purification of crude protoplasts, ESS process with 0.7M mannitol and 0.6M sucrose solution, was the best way to get purified protoplasts with viability.

As isolated protoplasts were cultured in 8P-KM medium at a density of  $2.5 \times 10^4$ /ml, the cells were enlarged after 3 to 5 days from culture, subsequently the cells were divided and resulted in colonies.

### 緒 論

지난 30~40년동안 原核細胞(prokaryote)로의 形質導入 및 形質轉換과 같은 遺傳的인 조작이 可能하게 되었으며, 近來에는 生命工學이라고 불리는 새로운 기술이 많은 분야에 걸쳐 널리 利用되고 있으며 특히, 農學에 대한 生命工學의 응용은 既存의 育種方法으로 해결하기 곤란한 難題나 또는 장기간 요구되는 育種方法상의 장애 요소를 해결할 수 있는 새로운 기술로서 각광받기 시작하고 있다.

1960年代 酵素溶液을 사용한 原形質體의 獲得이 보고된 이래 原形質體에서부터 完全한 機能을 가진 植物體로 再分化시키는 기술이 발전됨에 따라 지금까지 가지과 식물 38種, 가지과 이외의 식물 28種에서 原形質體를 遊離하여 植物體가 分化되었는데<sup>1)</sup> *Solanum melongena*의 境遇 葉肉組織 또는 懸濁培養한 細胞의 原形質體 培養으로부터 植物體를 얻었다.<sup>2)</sup> 본 實驗은 觀賞용 및 절화용으로 利用되는 백가지라고 불리는 *Solanum melongena* var. *fructualbo*의 葉肉細胞로부터 原形質體 遊離와 原形質體의 초기培養에 미

치는 要因을 규명함으로써 今後 個體分化에 必要한 기초자료로 利用코자 本 實驗을 遂行하였다.

## 材料 및 方法

*Solanum melongena* var. *fructualbo*의 種子를 vermiculite에 播種하여 恒溫室內에서 發芽시켜 本葉이 2~3매 되었을 때 부엽을 넣은 사질양토에 移植하여 溫室內에서 7,000~10,000 lux로 調節한 自然光下에서 晝溫 27°C, 夜溫 23°C, 濕度 70~80%下에서 栽培하였다. 5~7週된 幼苗로부터 完全 展開된 어린잎을 0.5% NaOCl溶液에 8~10分間 殺菌하여 殺菌水로 3回 水洗한 다음 잎의 뒷면 表皮組織을 銳利한 핀셋으로 除去한 後 使用하였다.

### 1. 原形質體 遊離에 미치는 要因

酵素濃度: cellulase(Onozuka R-10) 1.0, 1.5 및 2.0%를 각각 macerozyme(R-10) 0.2%와 組合하여 使用하였다.

酵素處理時間: 酵素溶液內에서 原形質體 遊離 時間을 1~6時間으로하여 時間別 原形質體의 收量 및 生存率을 調査하였다.

酵素溶液內 mannitol濃度: mannitol 0.6~0.8 M을 各各 酵素溶液에 添加하여 實驗하였다.

酵素溶液內 添加物: 酵素溶液內 2-[N-Mopholino] ethansulfonic acid(MES) 0.01M, polyvinylpyrrolidone(PVP) 2%, Bovine serum albumin(BSA) 0.2%를 單用 또는 混用添加하여 原形質體의 遊離狀態를 調査하였다.

水洗溶液內 mannitol 또는 sucrose濃度: mannitol과 sucrose를 0.5~0.7M의 溶液으로 調製해서 水洗와 分離用으로 使用하였고, 各濃度別 原形質體 回收效果 및 生存率을 調査하였다.

水洗方法: 遊離된 原形質體 回收을 위해 mannitol(M)과 sucrose(S)의 適定濃度를 選定해서  $\frac{E}{M}SS$ ,  $\frac{E}{S}S$ , ESS, EMSS의 方法으로 水洗하였다.  $\frac{E}{M}$ 은 mannitol溶液위에 酵素溶液을 넣어 遠心 分離하여 띄우는 것을 뜻하며, S는 sucrose 溶液에서 遠心分離하여 原形質體와 찌거기를 分離하는 것을 말한다. 調査는 최종적으로 8P-KM 培地에 넣어 2回 遠心分離한 후 行하였다.

酵素處理前 前處理: 前處理를 하지않은 材料와 CPW무기염을 添加한 mannitol 0.7M 溶液을 pH5.8로 調整하여 下層의 표피조직을 除去한 후 溶液에 띄워 29°C 培養室內에서 1時間동안 暗狀態로 침지한 후 原形質體를 遊離하였다.

實驗에 使用된 모든 溶液에는 CPW 무기염 (CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 1,480mg/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 27.2mg/l, KNO<sub>3</sub> 101mg/l, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 246.5mg/l, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.025mg/l, KI 0.16mg/l)을 添加하였으며, 各 處理別 實驗에 使用된 條件은 前 實驗에서 얻은 最適條件으로 하였다. 酵素溶液의 殺菌은 濾過殺菌(0.20μm membrane filter) 하였으며, 試料의 生體重 1g당 原形質體數를 환산하였고 生存率(%)은 Evans' blue 0.2% 溶液으로 2分間 염색 後 鏡檢하여 全體原形質體數-염색된 原形質體數 / 全體原形質體數 × 100으로 환산하였고, 건진 原形質體數는 總原形質體數 × 生存率(%) / 100으로 계산하였다.

### 2. 原形質體 培養

위의 實驗 結果에서 얻은 最適條件으로하여 mannitol 0.1M을 添加한 8P-KM(Kao and Michayluk, 1975) 培地로 2회 水洗하여 2.5 × 10<sup>4</sup> / ml로 原形質體의 密度를 調節한 다음 pasteur pipette으로 dropping(0.4ml/3drops)하여 25 ± 2°C의 培養室, dim light下에서 培養하였다. 培養 3日 後부터 細胞의 分裂狀態를 현미鏡下에서 觀察 하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 原形質體 遊離에 미치는 要因

酵素濃도가 原形質體 收量 및 生存率에 미치는 影響을 보면(그림 1-A), macerozyme 0.2%에 cellulase 1.5% 組合에서 原形質體 收량이 가장 높았으며, 生存率은 macerozyme 0.2%에 cellulase 1.5%, 2.0% 組合에서 良好하였다.

Bhatt와 Fassuliotis<sup>1)</sup>는 *Solanum melongena*의 葉肉組織으로부터 原形質體 遊離時 macerozyme 0.2%, cellulase 1.0%에서, Saxena等<sup>2)</sup>은 macerozyme 0.5%, cellulase 1.5%에서 原形質體를 遊離하였는데, 本 實驗은 結果와 거의 비슷하

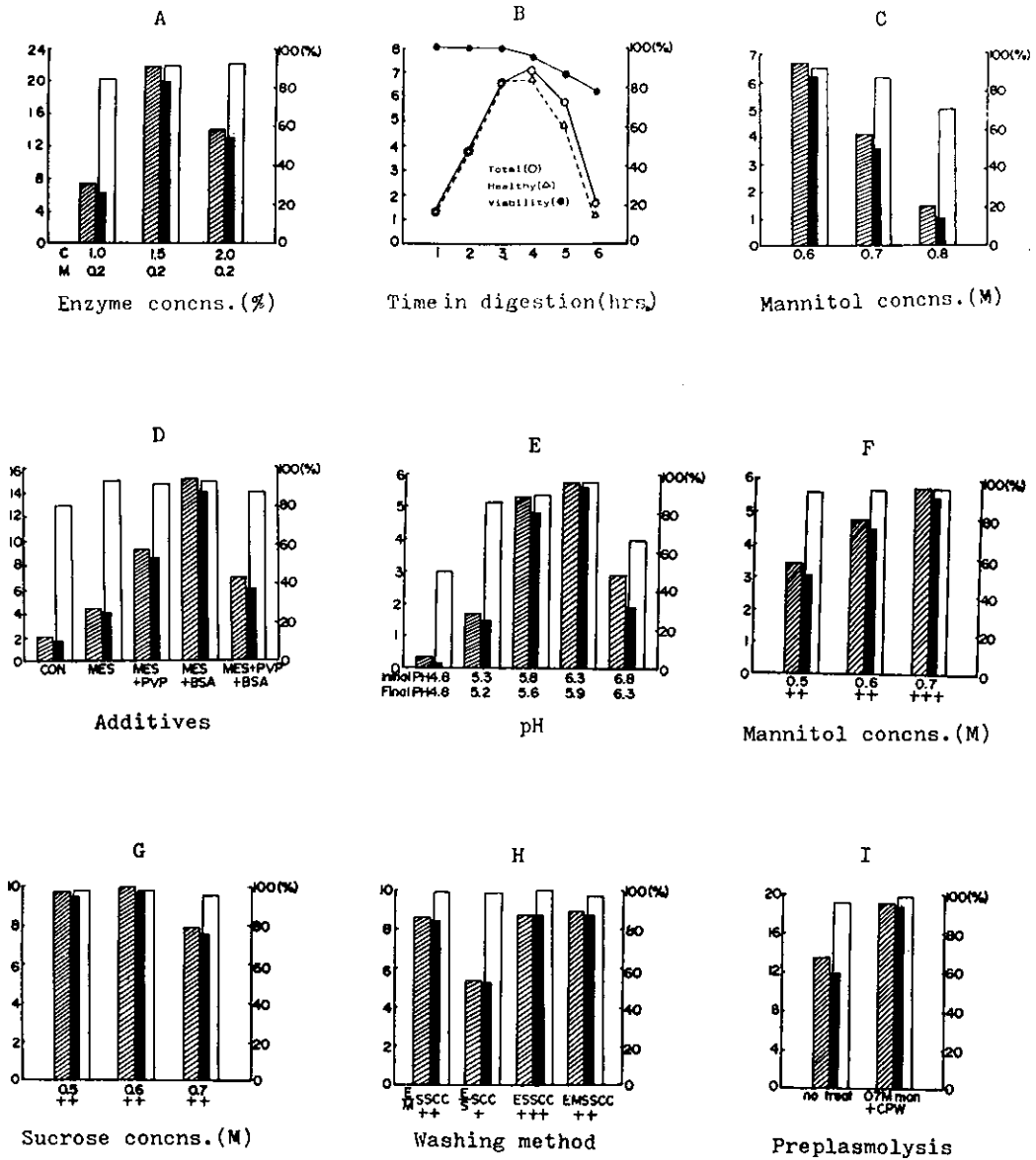


Fig. 1. Effect of isolation factors on total (▨) or healthy protoplast yield (■) and viability (□) of *Solanum melongena*. Unit of protoplast yield : x10<sup>5</sup>/g. fw.

였다. 한편, Gleddie 等<sup>10)</sup>은 *S. melongena*의懸濁培養한細胞로부터 driselase 1.0%, rhozyme 1.0%, cellulase 1.0%에서 原形質體를遊離시켰다고 하였는데 濃度가 다소 높은 것은 葉肉組織

에 비해 細胞壁이 견고한데 기인하는 것으로 判斷된다.

酵素處理時間이 原形質體 收量 및 生存量에 미치는 影響을 보면(그림 1-B), 酵素를 處理한 1

時間 後부터 增加하여 4時間에 最大의 收量を 나타내었으며, 生存率은 3時間 以後부터 減少하는 傾向이었다. Bhatt와 Fassuliotis<sup>1)</sup>는 *S. melongena*의 葉肉組織의 境遇는 1~2時間에서, Gleddie等<sup>10)</sup>은 *S. melongena*의 懸濁培養한 細胞의 境遇는 12時間에서 最大의 收量を 나타내었다고 하였는데 原形質體 遊離時間은 材料의 種類와 栽培(培養)條件에 따라 달라서 1時間에서 24時間까지 遊離하는 境遇가 있는데 일반적으로 高濃度에서 短時間, 低濃度에서 長時間 處理하는 境遇가 많으나 原形質體의 生存에 惡影響을 미치지 않는 範圍의 處理時間이 선정되어야 할 것으로 생각된다.

酵素溶液內 삼투압 維持를 위해 mannitol 을 濃度別로 添加한 結果를 보면(그림 1-C), 0.6 M에서 原形質體 收量 및 生存率이 최대치를 나타내었고, 濃度가 增加할수록 減少하는 傾向을 보였으며, 高濃度에서는 原形質體가 萎縮됨을 觀察할 수 있었다.

Evans와 Bravo<sup>9)</sup> 및 Street<sup>11)</sup>는 酵素溶液內 삼투압조절제로 주로 mannitol 을 單用하거나 sorbitol 과의 混用으로 0.4~0.8M 정도로 사용하였는데 이는 다른 糖類와는 달리 植物代謝에 거의 利用되지 않고 단지 삼투압에만 관여하며 植物細胞內 浸透도 대단히 늦은 特性을 가지고 있다고 하였는데 *S. melongena*의 葉肉組織에서도 Saxena等<sup>12)</sup> 및 Bhatt와 Fassuliotis<sup>1)</sup>는 0.5~0.7M의 mannitol 을 使用하였는데, 이는 本試驗과 비슷한 濃度였으며 種間 遺傳的 特性 및 栽培環境에 따라 다소 差異가 있는 것으로 判斷된다.

酵素溶液內 添加物質이 原形質體 收量 및 生存率에 미치는 影響을 보면(그림 1-D), 無添加區에 비해 添加區에서 原形質體 收量이 全般的으로 增加되었으며, 그 중 MES와 BSA의 混用添加區에서 原形質體 收量이 현저히 增加되었다. 그러나 여기에 PVP를 添加했을 때는 收量이 급격히 減少하였다.

Szabados와 Gaggero<sup>13)</sup>, Krueger等<sup>14)</sup>은 MES buffer 를 酵素溶液에 添加함으로써 pH를 安定시켜 進진 原形質體를 獲得할 수 있다고 하였으며, Wilson等<sup>15)</sup>과 Evans<sup>9)</sup>는 PVP와 MES 를 酵素溶液에 添加함으로써 進진 原形質體를 遊離

하는데 效果가 있다고 하였다. Evans<sup>9)</sup>는 原形質體가 遊離되는 동안 酵素溶液에 BSA를 添加하면 세포내기관의 파괴를 방지하여 進진 原形質體 獲得이 가능하다고 하였다. 이와 같이 酵素溶液內 phenol物質의 除去와 산화방지 및 細胞의 安定性を 유지하기 위해 使用되고 있는데 本實驗에서도 그 效果가 인정되었다. 그러나 PVP를 添加함으로써 原形質體 收量이 減少한 것은 高濃度の PVP가 함유됨에 따른 溶液의 삼투압 변화에 기인된 것으로 추정된다.

酵素溶液內 pH가 原形質體 收量에 미치는 影響을 보면(그림 1-E), pH6.3에서 原形質體 收量 및 生存率이 가장 良好하였으며, pH5.8에서도 良好하였으나, pH가 5.3이하이거나 6.8에서는 原形質體 收量이 급격히 減少하였다.

Evans와 Bravo<sup>9)</sup>는 原形質體 遊離時 酵素溶液의 pH는 5.4~6.2사이에 適當하다고 했는데, Scott等<sup>16)</sup>은 보리의 葉肉組織으로부터 原形質體 遊離時 pH4.6~5.4範圍에서 原形質體 收量이 많았고 5.0以下에서는 生存率이 낮았으며, 原形質體는 pH5.8~6.2사이에서 安定된 狀態를 보였다고 하였다. 지금까지 여러 植物을 대상으로 가장 널리 利用되고 있는 pH값은 5.5~6.0이었으며<sup>17)</sup> "18)" 간혹 pH를 8.0으로 調査한 경우도 있었다.<sup>19)</sup> 이와 같은 結果는 酵素活力에도 연관되나 植物의 種類에 따라 다소 달라지는 것으로 판단된다. 그러나 本시험의 結果로 보아 pH5.8~6.3의 範圍에서 原形質體를 遊離한다면 進진 原形質體의 獲得이 가능할 것으로 생각된다.

水洗溶液內 mannitol 또는 sucrose 濃度가 原形質體 回收에 미치는 影響을 보면(그림 1-F, G) mannitol 0.7M이 添加된 溶液에서 가장 많은 原形質體를 얻었고, sucrose 濃度は 0.5M과 0.6M에서 거의 비슷하게 많은 原形質體를 얻었으며, 生存率은 全般的으로 良好한 傾向을 나타내었다. 순수 原形質體를 分離하기 위한 sucrose 濃度は 0.3~0.9M으로 다양하며<sup>20)</sup> 酵素溶液의 濃도와 같은 수준 또는 0.1M前後의 濃度로 調整하였는데, *Brassica oleracea*<sup>21)</sup>에서는 0.77M mannitol 을 *S. melongena*<sup>18), 19)</sup>에서는 0.5~0.7M sucrose 溶液으로 水洗하였다고 하였는데, 이 濃度は 種間 差異나 生育段階에 따라 差異가 있을

것으로 생각되며, 本 實驗에 사용된 백가지의 境遇는 mannitol 0.7M과 sucrose 0.6M을 使用하는 것이 適合하다고 생각된다.

原形質體를 回收하는 方法에 따라 回收 效果에 큰 差異를 나타내고 있어 적절한 原形質體의 回收 方法을 알고자 本 實驗을 수행하였는데(그림 1-H) 酵素溶液을 除去한 후 0.6M sucrose에 2회 띄운 후 培養用 培地로 2회 씻어주는 方法(ESSCC)으로 原形質體를 回收했을 때 原形質體의 狀態가 가장 良好하였으며, 生存率 역시 높은 편이었다.

David 等<sup>1)</sup>은 *Gossypium hirsutum*에서 ESS 方法으로, Power<sup>12)</sup>는 *Petunia parodii*에서 EMSS 方法으로 水洗함으로 原形質體를 回收하였는데, Binding 과 Nagy<sup>13)</sup>는 *S. melongena*에서 水洗時 mannitol 溶液을 使用하는 것은 原形質體 回收 方法으로 적절하지 않다고 하였는데, 本 實驗에서도 mannitol 溶液에 水洗하는 것보다 바로 sucrose 溶液을 使用하는 것이 건전原形質體 獲得에 유리하였다.

酵素溶液을 처리하기 前 前處理를 했을 때 原形質體 收量 및 生存率을 보면(그림 1-I) CPW 무기염을 함유한 0.7M mannitol에서 1時間동안 前處理한 것이 他處理區에 비해 原形質體 收량이 많았으며, 生存率은 全般的으로 良好하였다.

Bhatt와 Fassulrotis<sup>14)</sup>는 *S. melongena*의 葉肉組織을 CPW 무기염을 함유한 0.7M mannitol 溶液에서 25~26°C 暗狀態에서 1~2時間동안 前處理를 하였고, Zapata 等<sup>15)</sup>은 *Lycopersicon esculentum*과 *L. peruvianum*에서 CPW 무기염을 함유한 9% mannitol 溶液에서 1時間동안 前處理를 하였는데, 이는 原形質體를 安定시키는데 效果가 있다고 하였으며, Evans 等<sup>16)</sup>은 前處理 效果는 mannitol, sorbitol 과 sucrose 溶液에 1時間에서 數時間동안 材料를 침지해 둠으로써 原形質分離를 일으켜 細胞壁이 遊離되면서 보다 용이하게 原形質體가 나출되고 酵素의 細胞內 침투가 억제되며, 나출原形質體의 자발적 융합을 방지하기 위함이라고 하였는데, 本 實驗에서도 前處理에 의해 原形質體 收량이 增加되었는데 이것은 原形質體의 安定에 큰 影響을 미친 것으로 생각된다.

## 2. 原形質體 培養

播種後 5~7週된 幼葉에서 얻은 原形質體를 培養하기 위해 基本培地 實驗을 한 結果 NT培地 및 MS培地에서는 細胞分裂 및 狀態가 저조하였으며, colony가 形成되지 않았으나 8P-KM培地에서 plating efficiency가 가장 높은 것으로 관찰되었다

Bhatt 等<sup>1)</sup>은 *S. melongena*의 葉肉組織 原形質體를 8P-KM培地에 Gleddie 等<sup>10)</sup>은 *S. melongena*의 懸濁培養 細胞로부터 遊離된 原形質體를 NT, MS 또는 Kao培地에 培養하였으며 Binding 等<sup>11)</sup>은 8P-KM培地를 利用하여 14科에 屬하는 56種의 原形質體를 培養해서 個體分化가 가능하였다는 보고로 보아 8P-KM培地가 NT培地를 위시한 여타 培地와는 달리 여러 種類의 vitamin類와 糖類가 含有되어 있기 때문에 廣範圍한 植物의 原形質體 培養用 培地로써 그 適應度가 상당히 높을 것으로 생각된다. 8P-KM培地로 原形質體를 培養한지 3~5日 後에 細胞가 伸長하여 分裂하기 始作하였으며(그림 2-2, 3) 10日 後에는 細胞가 여러개로 分裂하여 colony를 形成하였으나, 심한 褐變現象으로 인해 더 이상 진전을 보지 못하였다(그림 2-4).

植物에 따라 栽培環境의 變化에 의해 반응이 달라질 수 있어서 溫室內에서 栽培한 材料植物에서 原形質體를 얻기가 어려운 것도 있기 때문에 器內 培養한 材料를 使用하는 境遇가 있으며<sup>11, 14, 16)</sup>, 無菌培養했을 때는 生理的 狀態가 安定되어 있으면서 組織이 柔軟하여 原形質體 遊離가 容易하며 表面殺菌에 依한 損傷을 最大한 막을 수 있는 잇점이 있으므로 이와 같은 점을 감안하여 無菌培養 材料를 使用함으로써 原形質體 培養 및 植物體 分化를 보다 容易하게 할 수 있을 것으로 생각된다.

## 摘 要

*Solanum melongena* var. *fructualbo* 品種을 利用해서 原形質體 遊離에 미치는 여러가지 要因을 규명하여 原形質體를 培養하여 今後 有用한 體細胞種植物의 獲得에 필요한 기초자료로 활용하고자 實驗하였다.

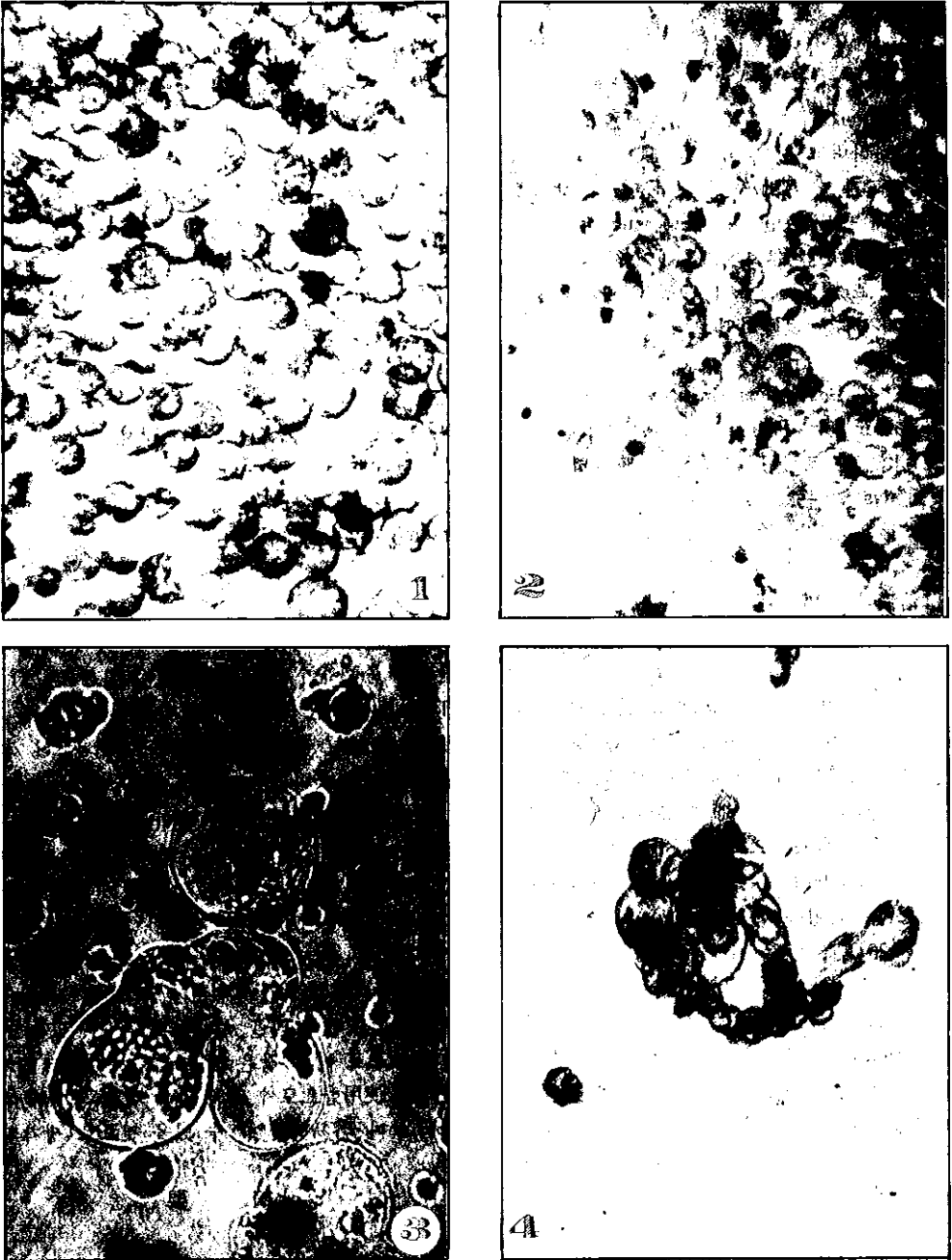


Fig. 2. Freshly isolated protoplasts from mesophyll of *Solanum melongena* var. fructuoso (1), cell enlargement after 5 days from initial culture (2), divided cells, 7 days after culture (3) and colony formation, 14 days after culture (4).

CPW 무기염이 함유된 0.7M mannitol 용액에 1시간동안 前處理한 後 cellulase 1.5%, mace-rozyme 0.2%, mannitol 0.6M, MES 0.01M, BSA 0.2%, pH 6.3에서 4시간 培養한 것이 原形質體 收量 및 狀態가 가장 良好하였다. 水洗溶液 內 mannitol 濃度는 0.7M에서, sucrose 濃度는 0.6M로 하여 ESSCC 方法으로 回收하는 것이 可

전하고 安定된 原形質體 大量獲得에 적합하였으 며, 거의 最適조건을 利用하여 遊離된 原形質體 를  $2.5 \times 10^4 / \text{ml}$ 의 密度로 8P-KM培地에 培養했 을 때 3~5日부터 細胞伸長을 하였고, 그 以後 부터 細胞分裂이 이루어져 10日 後부터 colony 形成이 관찰되었다.

### 引用 文 献

1. Bhatt, D. P. and G. Fassuliotis. 1981, Plant regeneration from mesophyll protoplasts of eggplant. *Z. Pflanzenphysiol.* 104:81-89.
2. Binding, H. and J. I. Nagy, 1986, Protoplast culture. In. *Cell Genetics in Higher plants.* Dudits, D., G. L. Farkas and P. Maliga (eds.), Akademiai kiado, Budapest. pp. 227-232.
3. Binding, H., R. Nehls and J. Jorgensen. 1982, protoplasts regeneration in higher plant. *Plant Tissue Culture*, Muruzen Tokyo, pp. 575-578.
4. Callow, J. A. and J. A. Dow. 1980. The isolation and properties of tomato mesophyll cells and their use in elicitor studies. *Plant Science*, pp. 197-202
5. David L. D. and F. Edraham. 1986, Isolation, culture, and cell division in cotyledon protoplasts of cotton (*Gossypium hirsutum* and *G. barbadense*), *Plant Cell Reports*, 5:127-131.
6. Day, D. A., C. L. D. Jenkins and M. D. Hatch. 1981, Isolation and properties of functional mesophyll protoplasts and chloroplasts from *Zea mays*, *Aust. J. Plant Physiol.*, 8:21-29.
7. Evans, D. A. 1983, protoplast fusion In. *Handbook of plant cell culture*, Macmillian Publishing Co., New York, pp. 145.
8. Evans, D. A., 1983, Protoplast fusion In. *Handbook of plant cell culture*, Macmillian Publishing Co., New York, pp. 291-326.
9. Evans D. A. and J. E. Brabo. 1983, protoplast isolation and culture. In. *Handbook of plant cell culture I.* pp. 124-137.
10. Gleddie, S. C., W. A. Keller and G. Setterfield. 1983, Somatic embryogenesis and plant regeneration, *Experimentia suppl.*, 45: 66-67.
11. Glimelius, K., 1984, High growth rate and regeneration capacity of hypocotyl protoplasts in some Brassicaceae, *Physiol. Plant*, 61: 38-44.
12. Harms, C. T., H. Lorz and I. Potrykus. 1979, Multipledroparray technique for the large-scale testing of culture media variation in hanging microdropletures of single cell systems. II. Determination of phytohormone combinations for optimal division response in *Nicotiana tabacum* protoplast cultures, *Plant Sci. Lett.*, 14: 237-244.
13. Hayward, C. and J. B. Power. 1975, Plant production from leaf protoplasts of *Petunia parodii*, *Plant Sci. Lett.*, 4: 407-410.
14. Kohlenbach. H. W., G. Wenzel and F. Hoffman. 1982, Regeneration of *Brassica napus* plantlets in cultures from isolated

- protoplasts of haploid stem embryos as compared with leaf protoplasts, *Z. Pflanzenphysiol.*, 105 (s) : 131-142.
15. Kruger-Lebus, S., I. Potrykus and J. Imamura. 1983, *Lycopersicon esculentum*, globular embryos from microspores and calli from diploid protoplasts, protoplast 1983. Birkhauser Verlag, Basel, PP. 46-47.
  16. Power, J. B., S. F. Berry, J. V. Chapman and E. C. Cocking. 1980, Somatic hybridization of sexually incompatible *Petunias* : *Petunia parodii*, *petunia parviflora*, *Theor. Appl. Genet.*, 57 : 1-4.
  17. Saxena, P. K., R. Gill, A. Rashid and S. C. Maheshwari. 1981, Plantlet formation from isolated protoplasts of *Solanum melongena* L., *Protoplasma*, 106 : 355-359.
  18. Schwenk, F. W., C. A. Pearson and M. R. Roth. 1981, Soybean mesophyll protoplast, *Plant Sci. Lett.*, 23 : 153-155.
  19. Scott, K. J., J. C. Chin and C. J. Wood. 1978, Isolation and culture of cereal protoplasts. In : *Plant tissue culture*. Pitman Advanced Publishing Program. pp. 293-303.
  20. Shanin, E. A.. 1985, Totipotency of tomato protoplasts, *Theor. Appl. Genet.* 69 : 235-240.
  21. Shepard, J. F. and R. E. Totten. 1977, Mesophyll cell protoplasts of potato isolation, proliferation and plant regeneration, *Plant Physiol.*, 60 : 313-316.
  22. Street, H. E.. 1977, Isolated plant protoplasts. In. *Plant tissue and cell culture*, University of California press. Barkeley and Los angeles.
  23. Szabados, L. and C. Gaggero. 1983, Sustained division of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) protoplasts : Stimulating effect of conditioned media, *Protoplast 1983*, Birkhauser Verlag, Basel, pp. 38-48.
  24. Vatsya, B. and S. Bhaskaran. 1983, Factors responsible for the production of subprotoplasts *Brassica oleracea* var. capitata. In, *plant cell culture in crop improvement*, PLENUM Press. pp. 485-489.
  25. Wilson, H. H., D. J. Styer, P. L. Conrad, R. O. Durbin and J. P. Helgeson. 1980, Isolation of sterile protoplasts from unsterilized leaves, *Plant Sci. Lett.*, 18 : 151-154.
  26. Zapata, E. J., P. K. Evans, J. B. Power and E. C. Cocking. 1977, The effect of temperature on the division of leaf protoplasts of *Lycopersicon esculentum* and *Lypersicon peruvianum*, *Plant Sci Lett.*, 8 : 119-124.