

*Petunia hybrida*와 *Nicotiana sanderae*間 原形質體 融合効率增進

鄭載東 · 盧英熙 · 池仙玉

慶北大學校 農科大學 園藝學科

Improvements of Protoplast Fusion Efficiency between
Petunia hybrida and *Nicotiana sanderae*

Jae Dong CHUNG · Young Hee ROH · Sun Ok JEE

Dept. of Horticulture, Coll. of Agriculture,
Kyungpook National University.

Abstracts

This study was conducted to get basic information for factors affecting protoplast fusion between *Petunia hybrida* 'Titan red' and *Nicotiana sanderae*. The experiments such as fusogen, time of PEG treatment, temperature at fusion, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ concentration in fusion solution, and $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ concentration and pH in eluting solution were carried out to increase the fusion efficiency. The results obtained were as follows; Fusion between *P. hybrida* and *N. sanderae* was accelerated when the mixture of the protoplasts was treated with 30% PEG 6,000 solution containing 5.5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ for 10 minutes at 25°C, and subsequently eluted with a eluting solution containing 50 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ adjusted to pH 9.0.

Key Words : *P. hybrida* *N. sanderae*, Protoplast fusion

緒 論

지금까지 有用形質을 재조합하여 作物을 改良코자 할 때는 性的 親和性이 있어서 種子의 結實이 가능한 植物에 한해서 이루어져 왔다. 이와 같은 慣行的인 방법은 보다 廣範圍한 有用遺傳子를 導入해서 優良個體를 얻는데는 限界가 있었다. 이러한 限界를 克服하기 위하여 1960년 Cocking은 原形質體 遊離에 관한 研究를

하였는데 이는 性的不和合性인 植物體間의 原形質體를 融合하여 體細胞雜種植物을 얻을 수 있다면 優良遺傳子의 導入範圍가 넓어져 앞으로 作物改良의 새로운 手段으로의 이용이 가능하다고 생각하였기 때문이었다.

그후 原形質體 培養에 관한 研究가 계속되어 1971년 Takebe에 의해 담배의 原形質體를 배양하여 最初의 個體를 얻었으며, 1972년 Carlson등은 *Nicotiana lansdorffi*와 *N. glauca*의 原形質體融

습을 통해 種間 體細胞雜種植物을 얻은 바 있으며 1978년 Melcher 등은 *Solanum tuberosum*과 *Lycopersicon esculentum*간의 原形質體를 融合하여 屬間 體細胞雜種植物을 얻음으로써 性的 不和合性인 植物體間的 雜種植物을 얻을 수 있다는 可能性을 높여 주었다.

한편 페튜니아와 담배와의 屬間 原形質體融合에 의한 雜種植物의 獲得은 최근 Pental 등 (1986)에 의해 *Petunia hybrida*와 *N. tabacum*의 融合產物을 培養해서 體細胞雜種植物을 얻었으며, Mulin과 Van(1989)은 *Petunia hybrida*와 *Nicotiana plumbagifolia*간의 屬間 體細胞雜種植物을 얻었으나 本 實驗에 供試한 材料를 利用해서 體細胞雜種植物을 얻었다는 報告는 없다.

이와같은 研究의 成果에도 불구하고 體細胞雜種植物을 실제 栽培面에 이용한다는 것은 대단히 어려운데 이는 融合된 原形質體培養으로부터의 再分化 能率이 너무나 낮아 有用形質을 지닌 體細胞雜種植物을 選拔하는데 어려움이 있었으며 染色體의 消滅에 의한 突然變異의 發生 및 兩親의 중간형 또는 모본의 어느 한쪽형으로 發現되어 목적으로 하는 有用個體의 選拔이 어렵게 되는 등 앞으로 해결해야 할 問題點이 대단히 많다.

本 研究에서는 우선 體細胞雜種植物의 出現頻度を 높이기 위하여 融合에 미치는 諸要因을 檢討하여 今後 體細胞雜種植物의 獲得頻度を 높히는데 필요한 基礎資料를 얻고자 實驗을 수행하였다.

材料 및 方法

Petunia hybrida 'Titan red'와 *Nicotiana sanderae*의 種子를 vermiculite에 播種하여 晝間溫度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 相對濕度 85%, 光度 2,000lux, 16時間 照明한 生長床에서 재배하였다. 施肥는 Murashge-Skoog培地의 無機鹽이 含有된 溶液으로 매 2주마다 1회 葉面施肥하였다.

30~40日間 栽培해온 幼苗의 完全 展開된 幼葉을 採取하여 材料로 使用하였는데 材料의 殺菌 및 前處理는 *P. hybrida*의 경우 採取한 材料를 0.5% NaOCl 溶液으로 10분간 殺菌한 후 殺菌水로 충분히 씻어 예리한 핀셋으로 下部의

表皮組織을 벗긴다음 CPW 無機鹽이 添加된 mannitol 0.6M 溶液으로 28°C 에서 1時間 前處理하였다.

*N. Sanderae*의 경우 *P. hybrida*와 같은 방법으로 殺菌한 材料를 잘게 썰어 NH_4NO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 각각 1mM을 NAA와 BA 각각 1mg/l가 含有된 溶液에 넣어 4°C 에서 16시간 前處理하였다.

原形質體 遊離는 *P. hybrida*의 경우, macerozyme R-10 0.5%, Cellulase Onozuka R-10 2.0%, MES buffer 0.01M, BSA 0.2%, mannitol 0.6M 및 CPW 無機鹽이 含有된 酵素溶液의 pH를 5.8에 調整한 酵素溶液 20ml당 1g의 試料를 넣어 28°C , 暗狀態로 4시간(50 strokes/min)동안 處理하였다. *N. sanderae*의 경우, macerozyme R-10 0.5%, Cellulase Onozuka R-10 3.0%, MES buffer 0.01M, BSA 0.2%, mannitol 0.6M 및 CPW 無機鹽이 含有된 酵素溶液 20ml당 1g의 試料를 넣어 28°C 暗狀態로 4時間(50 strokes/min) 처리하였다.

原形質體의 水洗와 回收는 두種 모두 mannitol 0.6M 溶液에서 500rpm으로 5分間 水洗한 다음 sucrose 0.6M 溶液에서 800rpm으로 8分間 遠心分離하였다. 本 實驗에 使用된 CPW 無機鹽은 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,480mg/l, KH_2PO_4 27.2mg/l, KNO_3 101mg/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 246.5mg/l, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025mg/l, KI 0.16mg/l을 함유한 溶液을 使用하였으며, 酵素溶液 및 培地는 필터殺菌(pore size : $0.2\mu\text{m}$ membrane filter)하였다.

이상에서 얻은 *Petunia hybrida* 'Titan red'의 原形質體와 *Nicotiana sanderae*의 原形質體를 각각 融合하는 데 필요한 要因을 檢討하기 위하여 (표 1)의 實驗을 遂行하였으며 PEG와 PVA의 處理時는 Kao(1976)의 方法, Dextran處理時는 Kameya(1975)의 方法에 준하였으며 그 과정은 (그림 1)과 같다. 實驗別 要因을 細明하기 위하여 融合 partner인 *N. sanderae*를 neutral red 0.02% 溶液으로 染色하여 標識子로써 使用하였으며 각 段階別 實驗에 使用된 條件은 前 實驗에서 얻은 最適條件으로 하였다. 融合率은 顯微鏡 視野當 보이는 전체 原形質體數에 대한 融合原形質體數의 百分率로 換算하였으며 各 處理當 5反復으로 反復當 3회씩 檢鏡하였다.

Table 1. Investigated factors affecting protoplast fusion.

Factors investigated		Treatments
Fusogens	PEG(M. W 6,000)	10, 20, 30, 40(%)
	PEG(M. W 1,540)	10, 20, 30, 40
	PVA	10, 15, 20, 25
	Dextran 40T	10, 15, 20, 25
Time of PEG treatment	PEG(MW 6,000)	10, 20, 30(min)
Temperature at fusion		25, 30, 35(°C)
CaCl ₂ · 2H ₂ O concns in fusion solution		5.5, 10.5, 15.5 (mM)
CaCl ₂ · 2H ₂ O concns in eluting solution		50, 75, 100, 125(mM)
pH value in eluting solution		9.0, 10.5, 12.0

Abbrs.; PEG : Polyethylene glycol, PVA : Polyvinyl alcohol.

結果 및 考察

融合方法이 原形質體 狀態 및 融合率에 미치는 영향을 보면 (表 2)와 같다.

PEG 6000, 30%에서 融合率이 가장 높은 傾向이었으며 20%에서도 良好하였고 PVA 10-15%에서도 增加하는 傾向이었으나 그 외의 濃度에서는 不良하였고 PEG 1540과 Dextran 40T는 不適合하였다.

融合劑의 種類에서 張(1987)은 *P. hybrida*와 *Datura stramonium*의 組合에서의 融合率은 PEG 1,540, PEG 6,000=PVA, Dextran 순으로 減少하였으며 PEG 1,540에서 原形質體 狀態도 良好한 傾向을 보였다 하였고, *P. hybrida*와 *Solanum melongena*의 組合에서의 融合率은 PEG 6,000, PVA, PEG 1,540, Dextran 순으로 減少하였으며, 原形質體 狀態 또한 PEG 6,000에서 良好하였다고 하였는데 이는 本 實驗의 結果와 一致하였다.

PVA 및 Dextran을 이용한 融合方法으로 體細胞雜種植物을 얻고 있으나 이중 PEG를 利用해서 가장 많은 體細胞雜種植物을 얻었다는 점

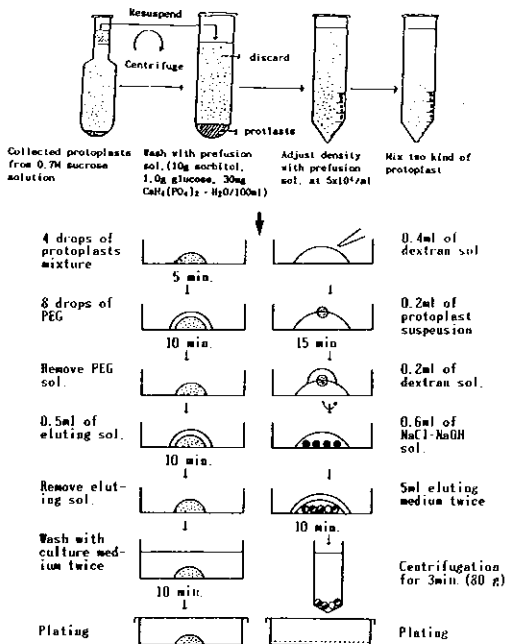


Fig. 1. Procedures for protoplast fusion by PEG and PVA(left) and dextran(right) method.

Table 2. Fusion frequencies between *P. hybrida* and *N. sanderae* by several fusogen treatments.

Fusogen(%)		% of cell fusion
PEG MW 6,000	10	7.4±1.7*
	20	11.0±1.4
	30	12.0±2.7
	40	3.7±1.8
PEG MW 1,540	10	1.6±0.9
	20	5.8±0.9
	30	6.2±0.1
	40	8.3±2.2
PVA	10	10.3±1.7
	15	10.4±0.8
	20	7.1±0.01
	25	5.5±0.1
Dextran 40T	10	3.6±0.3
	20	5.6±0.7
	30	6.0±0.8
	40	6.9±1.5

* Each value represent the mean ± SE of 5 replicates.
Each replicate was mean value of 3 observations.

(Bhojwani and Razdan, 1983; Evans, 1983)에서 볼때 本 實驗에서 공시한 組合에서도 PEG를 利用한 融合方法이 無難하리라 보여진다.

PEG 농도의 影響에 관하여 Power 등(1976)은 PEG 6,000, 15%에서 *P. hybrida*와 *P. parodii*와의 融合을, O'connell과 Hanson(1985)은 PEG 6,000 30%에서 *Lycopersicon esculentum*과 *L. pennellioi*와의 融合을 誘導하여 이는 本 實驗의 結果와 一致하였다. 鄭과 朴(1986)은 PEG 6,000, 50%에서 *P. hybrida*와 *S. nigrum*의 融合을 시도하였다. Wallin 등(1974)은 PEG 1, 540에서 7%와 14%에서는 融合이 일어나지 않고 21%에서는 活性的이나 28% 以上에서 融合率이 增加하였다고 報

告하였다. 張(1987)은 *P. hybrida*와 *S. nigrum* 및 *Datura stramonium*의 組合에서는 PEG 1, 540 40%로, *P. hybrida*와 *S. melongena*의 組合에서는 PEG 6,000, 50%가 適合하다고 하였다. 일반적으로 PEG의 分子量은 1,000에서 부터 6,000까지, 濃度는 10-15%로써 多樣하게 이용되는 傾向이다(Bhojwani and Razdan, 1983; Evans, 1983). 이는 材料의 妙齡, 酵素의 種類, 濃度 및 原形質體 遊離時間 등이 融合에 影響을 미치고 있는데서 기인하는 것으로 생각된다.

PEG 6,000 30%를 利用하여 融合劑를 處理했을 때 融合劑 處理時間이 融合에 미치는 影響을 보면 (表 3)과 같다.

Table 3. Effect of duration of PEG treatment on protoplast fusion between *P. hybrida* and *N. sanderae*.

Minutes	% of cell fusion
10	14.6±0.7*
20	12.9±0.8
30	6.4±0.6

PEG MW 6,000, 30%

* Each value represent the mean±SE of 5 replicates.
Each replicate was mean value of 3 observations.

PEG를 10분간 處理時 融合率이 가장 높았으나 時間이 經過함에 따라 破裂이 심하였다.

融合劑의 처리시간의 影響에 관하여 Schenck와 Robbelen(1982)은 *Brassica oleracea*와 *B. campestris*의 融合을, Hodgson과 Rose(1984)는 시금치의 葉肉組織 유래의 原形質體와 당근 뿌리 幼組織 原形質體의 融合에서 10분간 處理가 좋다고 하였다. 이는 本 實驗의 結果와 一致한 반면, Kao와 Michayluk(1974)은 *Vicia hajastana*와 *Pisum sativum*에서 10-20분, Tabaeizadeh 등(1985)은 *P. hybrida*와 *L. peruvianum*과의 融合에서 15분 處理를 하였으며 Gamborg 등(1981)은 20-45분 處理하는 것이 좋다고 한 것으로 보아 이는 材料의 種類, 融合劑의 分子量 및 濃度の 變異에서

基因된 것으로 判斷된다. 또한 Wallin 등 (1974)은 *Daucus carota*에서 融合劑 處理후 30분이 經過하는 동안 融合은 繼續 일어나지만 5분 이내에 전체 融合率의 80% 이상의 融合이 일어난다고 한 것으로 보아 장시간 融合劑 處理로 인한 融合劑의 毒性이 融合產物에 미치는 影響을 考慮해 볼 때 本 實驗의 10분간의 處理가 適切하리라 判斷된다.

PEG 6,000 30%로 10분간 處理했을 때 處理溫度가 原形質體 融合에 미치는 影響을 보면 (表 4)와 같다.

Table 4. Effect of temperature during PEG treatment on protoplast fusion between *P. hybrida* and *N. sanderae*.

Temperature(°C)	% of cell fusion
25	7.9±0.3*
30	7.9±1.2
35	5.5±0.6

* Each value represent the mean±SE of 5 replicates.
Each replicate was mean value of 3 observations.

PEG처리시 25°C 또는 30°C에서 融合을 誘導하더라도 融合率의 差異는 發見되지 않았으나 25°C에서 處理했을 때가 30°C에서 處理했을 때에 비해 原形質體가 보다 安定되어 있음을 觀察할 수 있었다.

PEG에 의한 融合 誘導시 溫度의 影響에 관하여 Wallin 등(1974)은 당근의 原形質體 融合에서 15°C에서는 凝集이 일어나는 반면 35°C에서 原形質體 融合이 일어나는 것을 觀察하였으며, 중간온도인 25°C에서 融合을 誘導하는 것이 좋다고 하였는데 이는 本 實驗의 결과와 같았고 Burgess와 Fleming(1974)은 PEG처리후 25°C보다 37°C에서 강하게 凝集되는 것을 電子顯微鏡으로 觀察하였으며, Hodgson과 Rose(1984)는 25°C에서 融合을 實施하였다.

PEG處理시 原形質體의 構成成分인 인지질이 gel 狀態에서 liquid crystal 狀態로 변하므

로 原形質體의 柔軟性이 增加되어 融合이 誘導된다는 報告(Lazar, 1983)로 보아 植物의 種類에 따라 差異가 있지만 低溫 보다는 다소 높은 溫度에서 融合을 誘導하는 것이 適當하리라 본다.

融合 溶液內 Ca⁺⁺이온농도가 融合에 미치는 影響을 보면 (표 5)와 같다.

Table 5. Effect of CaCl₂ · 2H₂O concentrations in fusion solution on protoplast fusion between *P. hybrida* and *N. sanderae*.

CaCl ₂ · 2H ₂ O concns(mM)	% of cell fusion
5.5	14.7±1.2*
10.5	14.5±1.8
15.5	14.7±1.7

* Each value represent the mean±SE of 5 replicates.
Each replicate was mean value of 3 observations.

CaCl₂ · 2H₂O의 濃도에 관계없이 融合率은 높은 傾向이었으나 오히려 低濃度에서 原形質體의 狀態는 상당히 安定되어 있는 것으로 觀察되어 原形質體融合시 주로 利用되는 濃도보다는 상당히 낮은 濃度에서도 安定狀態가 유지됨을 알 수 있었다.

融合 溶液內 Ca⁺⁺이온농도의 影響에 관하여 Power 등(1976)은 *P. hybrida*와 *P. parodii*에서 10mM의 CaCl₂를, Hodgson과 Rose(1984)는 시금치의 葉肉組織 유래 原形質體와 당근 뿌리 幼組織 原形質體에서 10.5mM의 CaCl₂ · 2H₂O를, Tabaezadeh 등(1985)은 *P. hybrida*와 *L. peruvianum*과의 融合에서 CaCl₂ · 2H₂O 200mM을, Schenck와 Robbelen(1982)은 *B. oleracea*와 *B. campestris*의 融合에서 CaCl₂ · 2H₂O 30mM을, Pirrie와 Power(1986)는 *N. tabacum*과 *N. glutinosa*에서 CaCl₂ · 2H₂O 100mM을 融合劑에 添加해서 原形質體 融合을 誘導하였다. 張 (1987)은 10.5mM에서 融合率이 가장 良好하다고 하였으나 本 實驗에서는 濃도가 融合率

에 큰 영향을 나타내지 않았다.

이와같이 融合劑에 添加되는 Ca^{++} 이온의 濃度는 多様한데 融合處理時 Ca^{++} 이온은 融合 과정 중 原形質體의 破裂을 防止하는 役割을 하며 적정농도는 材料의 種類 및 植物의 種類에 따라 다른데 이는 細胞의 原形質膜의 構造와 관계되는 것으로 推定된다.

融合劑 處理後 일정시간이 經過한 다음 稀釋溶液을 處理하게 되는데 稀釋溶液內 Ca^{++} 이온濃度가 原形質體融合에 미치는 影響을 보면 (表 6)과 같다.

Table 6. Effect of $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ concentrations in eluting solution on protoplast fusion between *P. hybrida* and *N. sanderae*.

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ concns(mM)	% of cell fusion
50	12.6±0.7*
75	12.2±0.8
100	11.2±0.6
125	5.4±0.9

* Each value represent the mean±SE of 5 replicates.

Each replicate was mean value of 3 observations.

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 濃度는 50mM에서 融合率도 높은 편이고 原形質體의 狀態도 良好하였으나 高濃度인 120mM에서는 原形質體의 破裂이 심하였다.

稀釋溶液內 Ca^{++} 이온의 影響에 관하여 Hahne와 Hoffmann(1986)은 *N. glutinosa*와 *D. carota*의 融合에서 125mM의 $CaCl_2$ 를 添加하였으며 Uchimiya(1982)는 *N. tabacum*과 *N. glutinosa*의 融合에서 50mM을, Menczel등(1981)은 *N. tabacum*과 *N. knightiana*에서 66mM을, Syono등(1979)은 완두와 담배에서 50mM을, Sundberg와 Glimelius(1986)는 Brassica屬의 融合에서 67mM의 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 가 添加된 稀釋溶液으로 먼저 稀釋하고 84mM의 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 로 2차 稀釋하는 方法을 利用하였다고 보고 하였는데 본 실험에서는

125mM의 高濃도보다는 훨씬 낮은 50mM의 低濃度에서 良好하였는데 이는 植物 原形質膜의 安全性의 差異와 融合處理時 Ca^{++} 이온은 다른 種間 原形質體 사이의 膜을 連結해 주며 融合劑 處理後 일정 時間 經過後 稀釋함으로써 融合이 이루어지기 시작하는데 原形質膜이 여러 곳에서 破裂되어 原形質體 사이의 原形質 連結鎖가 形成되므로 融合이 된다(Mullin and Van, 1989)고 한 것으로 보아 이와 같은 物理 化學的인 內的變化는 種에 따라 큰 差異를 나타내고 있을 것으로 생각된다.

稀釋溶液의 pH가 原形質體融合에 미치는 影響을 보면 (表 7)과 같다.

Table 7. Effect of pH value of eluting solution on protoplast fusion between *P. hybrida* and *N. sanderae*.

pH	% of cell fusion
9.0	14.5±2.9*
10.5	12.2±0.9
12.0	8.2±0.1

* Each value represent the mean±SE of 5 replicates.

Each replicate was mean value of 3 observations.

pH 9.0에서 融合率이 가장 높았으나 pH가 높아짐에 따라 融合率이 減少하는 경향이였다.

稀釋溶液內 pH의 影響에 관하여 Schenck와 Robbelen(1982)은 *B. oleracea*와 *B. campestris*에서 pH 9.0으로 조정된 稀釋溶液으로 稀釋하였다고 報告했는데 이는 본 實驗의 結果와 一致하였으나 Power등(1976)은 *P. hybrida*와 *P. parodii*의 融合處理시 pH 10.5로 조정된 稀釋溶液을 使用하는 것이 効果的이라고 했다. PEG-high Ca^{++} 融合方法에서 pH가 높을 때는 原形質體 融合을 促進하는 intramembraneous lysophospholipid의 形成을 誘導하므로 큰 影響을 주는 것(Kao, 1980)으로써 이는 材料植物의 特性이 달라짐에 따라 적정 pH에 差異가 있을 것으로 보인다.

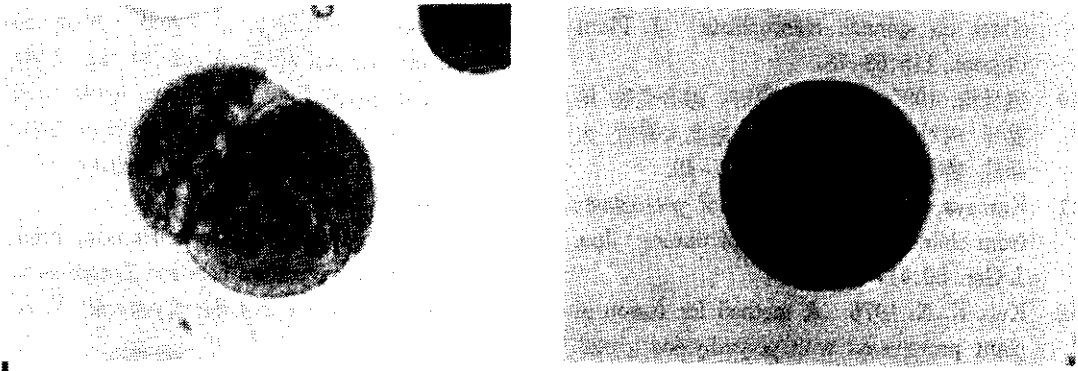


Fig 2. Stage just before fusion (Left) and fused cell (Right) between *P. hybrida* and *N. sanderae*.

위의 결과들을 종합하여 수행된 *P. hybrida*와 *N. sanderae*간의 원형질체 융합과정은 (그림 2)와 같다.

摘 要

*Petunia hybrida*와 *Nicotiana sanderae*의 原形質體 融合에 의한 體細胞雜種植物을 얻기 위하여 原形質體融合에 미치는 融合濟의 종류, PEG의 處理時間 및 融合時 溫度, 融合溶液과 稀釋溶液內的 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 의 量 및 稀釋溶液의 pH에 대해 實驗하였으며 그 結果는 다음과 같다.

두 種의 原形質體를 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5.5mM이 含有된 PEG 6,000 30%溶液으로 25°C에서 10분간 處理한 후 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50mM이 含有된 稀釋溶液의 pH를 9.0으로 調節한 溶液으로 稀釋시켰을 때 原形質體 融合率이 가장 높았다.

參 考 文 獻

1. Bhojwani, S. S. and M. K. Razdan, 1983. Somatic hybridization, In: plant tissue culture. Elsevier(Amsterdam), pp. 261-286.
2. Burgess, J. and N. Fleming, 1974. Ultrastructural studies of the aggregation and fusion of plant protoplasts. *Planta*, 118: 183-193.
3. Carlson, P. S., H. H. Smith and R. D. Dearing, 1972. Parasexual interspecific plant hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 69: 2292-2294.
4. 鄭載東·朴炳俊, 1986. *Petunia hybrida*와 *Solanum nigrum* 原形質體 融合產物의 培養 및 器官分化, 韓國組織培養學會誌 13 (1):1-14.
5. Cocking, E. C., 1960. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature* 187:962-963.
6. Evans, D. A., 1983. Protoplast fusion. In: Handbook of plant cell culture Vol. I (eds) Evans, D. A., W. R. Sharp, P. V. Ammirato, and Y. Yamada. MacMillan, pp. 291-321.
7. Gamburg, O. L., J. P. Shyluk and E. A. Shahin, 1981. Isolation, fusion and culture of plant protoplasts. In: Plant tissue culture, methods and application in agriculture (ED) T. A. Thorpe. Academic Press, pp. 115-153.
8. Hahne, B. and F. Hoffmann, 1986. Cortical micro tubules and protoplast fusion: Effect and fate of micro tubular Lattices. *Plant Science*, 47:199-206.
9. Hodgson, R. A. J. and R. J. Rose, 1984. Fusion of spinach mesophyll protoplasts with

- carrot root parenchyma protoplasts and the effect on spinach chloroplasts. *J. Plant Physiol.*, 115:69-78.
10. 張世均, 1987. 가지科植物的 融合產物 培養에 의한 植物體 分化. 慶北大學校 大學院 農學碩士學位論文, pp. 1-49.
 11. Kameya, T. 1975. Culture of protoplasts from chimeral plant tissue of nature. *Jpn. J. Gen.* 50:417-420.
 12. Kao, K. N. 1976. A method for fusion of plant protoplasts with polyethylene glycol. In: *Cell Genetics in Higher Plants* (D. Dudits et al. eds.), pp. 233-238. Akademiai Kiado, Budapest.
 13. Kao, K. N., 1980. Expression of foreign genetic material through protoplast fusion, through uptake of procaryotic cells and cell organelles. In: *Plant cell cultures; Results and perspectives* (eds) Sala, F. et al., Elsevier/North Holland Biomedical Press, pp. 195-205.
 14. Kao, K. N. and M. R. Michayluk, 1974. A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta*, 115:355-367.
 15. Lazar, G. B., 1983. Recent developments in plant protoplast fusion and selection technology, In: *Protoplasts 1983* (eds) Potrikus, I. et al. Birkhauser Verlag, pp. 61-67.
 16. Melchers, G., M. D. Sacristan and A. A. Holder, 1978. Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carsberg Res. Common*, 43: 203-218.
 17. Mencil, L., F. Nagy, Z. R. Kiss and P. Maliga, 1981. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum*+*Nicotiana knightiana*: Correlation of resistance to *N. Tabacum* plastids. *T. A. G.* 59:191-195.
 18. Mulin, M. and K. T. T. Van, 1989. In vitro flower formation from thin epidermal cell layers of a partial somatic hybrid between *Pryunis hybtifs* (Hort.) and *Nicotiana plumbaginifolia* (Viv.). A comparative study of the morphology of in vitro leaves and flowers of the hybrid and its parental lines. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 16 : 195-206.
 19. O'connell, M. A. and M. R. Hanson, 1985. Somatic hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon pennellii*, *T. A. G.* 70 : 1-12.
 20. Pental, D., J. D. Hamill, P. A. Pirrie and E. C. Cocking. 1986. Somatic hybridization of *Nicotiana tabacum* and *Petunia hybrida*. *M. G. G.* 202:342-347.
 21. Pirrie, A. and J. B. Power, 1986. The production of fertile, triploid somatic hybrid plants (*Nicotiana glutinosa*(n)+*N. tabacum* (2n) via gametic and somatic protoplast fusion. *T. A. G.* 72 : 48-52.
 22. Power, J. B., E. M. Frearson, C. Hayward, D. George, P. K. Evans, S. F. Berry and E. C. Cocking, 1976. Somatic hybridization of *Petunia hybrida* and *P. parodii*. *Nature* (London) 263 : 500-502.
 23. Schenck, H. R. and G. Robbelin, 1982. Somatic hybrid by fusion of protoplasts from *Brassica oleracea* and *B. campestris*. *Z. Pflanzenzucht.* 89 : 278-288.
 24. Sundberg, E. and K. Glimelius, 1986. A method for production of interspecific hybrids within Brassicaceae via somatic hybridization, using resynthesis of *Brassica napus* as a model. *Plant science*, 43 : 155-162.
 25. Syono, K., T. Nagata, M. Suzuka, S. Kajita and C. Matsui, 1979. Fusion of pea root nodule protoplasts with tobacco mesophyll protoplasts *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 95s. 449-457.
 26. Tabaeizadeh, Z., C. Perennes and C. Bergounioux, 1985. Increasing the variability of *Lycopersicon peruvianum* Mill. by pro-

- toplast fusion with *Petunia hybrida* L. Plant Cell Reports, 4 : 7-11.
27. Takebe, I., G. Labib, and G. Melchers, 1971. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. Naturwissenschaften, 58 : 318-320.
28. Uchimiya, H., 1982. Somatic hybridization between male sterile *Nicotiana tabacum* and *N. glauca* through protoplast fusion. T. A. G. 61 : 69-72.
29. Wallin, A., Glimelius and T. Erikson, 1974. The induction of aggregation and fusion of *Daucus carota* protoplasts by polyethylene glycol. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 74s. 64-80.