

碩士學位論文

電氣刺戟法에 의한 *Petunia hybrida* 의  
原形質體 融合

濟州大學校 大學院

農 化 學 科



1988年 12月

---

FUSION OF *Petunia Hybrida* PROTOPLASTS  
BY THE ELECTRO CELL MANIPULATOR

Sung-Kyu, Han

(Supervised by Professor Zang-Kual, U.)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF AGRICULTURE

DEPARTMENT OF AGRICULTURAL CHEMISTRY

GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1988. 12.

電氣刺戟法에 의한 *Petunia hybrida* 의  
原形質體 融合

指導教授 柳 長 杰

韓 成 圭

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함.

1988年 12月 日

 제주대학교 중앙도서관  
韓成圭의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_  
委 員 \_\_\_\_\_  
委 員 \_\_\_\_\_

濟州大學校 大學院

1988年 12月 日

## 目 次

Summary .....	1
緒 論 .....	3
材料 및 方法 .....	5
結果 및 考察 .....	10
1. Callus의 誘起 및 培養 條件 .....	10
2. 原形質體 分離에 미치는 酵素濃도와 處理時間의 影響 .....	12
3. 電氣刺戟法에 의한 原形質體 融合에 關與하는 因子 .....	15
가. 電壓 및 周波數 .....	15
나. Calcium과 Magnesium .....	20
다. Fusion facilitators .....	21
摘 要 .....	26
參考文獻 .....	29

## Summary

The conditions (enzyme concentration and incubation time) for isolating protoplasts from the callus induced from the leaf tissues of *Petunia hybrida* 'Titan red' were examined. After that, the physical and chemical factors affecting the isolated protoplast fusion by electric stimulation were investigated.

1. The callus growth rate was maximum at 20~23 days after subculture and 0.5ppm NAA and 5ppm BA was the best concentration combination for callus growth.
2. The highest protoplast yield ( $2.6 \times 10^5$  protoplasts/g. callus) was obtained when the callus was treated with the enzyme solution containing 3% cellulase and 0.5% macerozyme for 13 hours.

The protoplast yield was increased until 13 hours of enzyme treatment, from which both protoplast yield and viability were rapidly decreased.

3. The highest fusion frequency (11%) was obtained when AC pulse of 1 MHz and 60V/cm was treated for 15 seconds and successively DC 2.5kV/cm for 40usec.
4.  $Mg^{2+}$  without  $Ca^{2+}$  treatment, regardless of  $Mg^{2+}$  concentration, was not effective for fusion frequency and viability increase.

The best concentration of  $Ca^{2+}$  for protoplast fusion was 140uM, giving 11% fusion frequency and 43% viability.

Combination of 140uM  $Ca^{2+}$  and 140uM  $Mg^{2+}$  enhanced the fusion frequency and viability up to 13% and 45% respectively.

5. The fusion facilitators increased fusion frequency more than control (11%) in order of protease(2.4X), spermine(2.2X), trypsin(2.1X), DMSO(1.8X), triton X-100(1.6X), glyceryl monooleate(1.5X), concanavalin A(1.4X). But

---

viability was decreased comparing with control(45%) in order of spermine(42%), concanavalin A(41%), triton X-100(38%), glyceryl monooleate(37%), protease(37%), trypsin(35%), DMSO(31%).



## 緒 論

交雜을 이용한 傳統的 品種改良 方法은 種屬間의 不和合性 때문에 새로운 遺傳 形質의 導入에 限界가 있다. 따라서 이같은 問題를 解決하는 方法으로 遠緣 種屬의 原形質體를 人爲的으로 融合시켜 體細胞 雜種植物을 育成하려는 細胞融合 技術 研究가 活發히 進行되어 왔다. Küster(1909)가 처음으로 植物 細胞融合 現象을 觀察하였고, Schenk와 Hildebrandt(1971)가 技械的 方法으로 原形質體를 분리하여 融合을 시도하였으나 融合率이 매우 낮았다. 細胞 融合率을 높이기 위해  $\text{NaNO}_3$ (Power 등, 1970), Calcium(높은 pH에서) (Keller와 Melchers, 1973), Polyvinyl alcohol (PVA)(Nagata, 1978), Potassium dextran sulfate(Kameya, 1975), Polyethylene glycol (PEG)(Kao와 Michayluk, 1974) 등을 細胞融合에 사용하였었는데 이중 PEG법은 비교적 融合효과가 좋기 때문에 細胞融合 研究에 현재까지 많이 사용되고 있다. 그러나, 이러한 化學物質들은 비교적 높은 濃度 또는 높은 pH에서 사용되기 때문에 細胞에 나쁜 영향을 준다는 것이 알려져 있다 (Keller와 Melchers, 1973; Bates 등, 1987).

한편 電氣刺戟에 의한 細胞 融合法이 開發되어(Zimmermann 등, 1981 a, b; Zimmermann과 Scheurich, 1981) 植物, 動物, 細菌 등에 이용되었는데 (Pilwat 등, 1981; Benz와 Zimmermann, 1981 a, b; Vienken과 Zimmermann, 1982; Bates 등, 1983; Holfmann 등, 1983; Zachrisson과 Bornman, 1984; Bates, 1985) 이 방법은 조작이 단순하고 融合率이 높고 單一 細胞雙 形成率이 높고 선택적인 融合을 誘導할 수 있는 長點이 있다. 그러나 生存力이 낮다는 短點도 있다 (Zimmermann 등, 1982; Bates 등, 1983; Bates 등, 1987).

效率的인 融合을 위하여 融合 器機가 개선되고(Bates 등, 1983; Watts와 King, 1984), 보다 많은 融合體를 얻기 위하여 다량의 原形質體에 電氣刺戟을 줄수 있는 multielectrode가 개발되었는데(Puite 등, 1985) 이것은 소량의 原形質體에 電氣刺戟을 줄때보다 높은 融合率을 얻을수 있어 體細胞 雜種을 얻기 위한 電氣的 融合方法의 이용을 한층 더 容易하게 해주고 있다. 그러나, 電氣刺戟 方法에 의한 細胞의 融合率과

生存率은 交流의 周波數, 電壓, 處理時間과 直流의 電壓, 處理時間에 影響을 받으며 植物의 種 또는 部位(Tempelaar 等, 1985a)나 細胞의 크기(Bates 等, 1987) 等에 따라서도 다르다는 것이 알려져 있다.

또한, chemical facilitator를 處理할 때 細胞 融合率이 增加된다는 것이 알려졌는데 (Scheurich와 Zimmermann, 1981; Zimmermann 等, 1981; Chapel 等, 1984), 이와 관련된 것으로는 concanavalin A (Ohnishi 等, 1987), dimethyl sulfoxide(DMSO) (Ruzin 等, 1986), glyceryl monooleate(Ohnishi 等, 1987), protease(Zimmermann 等, 1981; Ruzin 等, 1986), spermine(Chapel 等, 1984; Ruzin 等, 1986), triton X-100(Ohnishi 等, 1987), trypsin(Ruzin 等, 1986), calcium(Okada와 Ohno-Shosaku, 1984; Abe와 Takebe, 1986; Ohnishi 等, 1987) 等이며 이들이 細胞의 融合率과 生存率에 미치는 影響에 관한 報告가 있다.

본 연구에서는 自家 不和合性이고 生殖能力이 높은 *Petunia hybrida* 일 組織으로부터 callus를 誘起하고 callus 生育의 適正條件과 原形質體 裸出時 酵素 濃度와 處理時間을 검토하였다.

또한, 이들 原形質體가 電場下에서 効果적인 融合을 이루기 위한 電場條件들인 交流의 周波數, 電壓, 處理時間과 直流의 電壓, 處理時間과의 關係 等을 파악함과 아울러 fusion facilitators 處理 後의 融合率과 生存率에 미치는 影響을 調査함으로써 電氣刺戟에 의한 細胞融合 分野의 基礎資料를 提供하고자 한다.

## 材 料 및 方 法

### 1. Callus의 誘起 및 培養 條件

사용한 *Petunia hybrida* 'Titan red' 種子는 中央種苗株式會社에서 구입하였다.

#### 1) 種子의 發芽 및 栽培

種子是 Tween-20을 1방울 첨가한 1.0% NaOCl 溶液에 15분간 浸漬하여 表面을 殺菌한 다음 cleanbench (Model C-CB2, 第一科學産業株式會社)로 옮겨 滅菌水로 3회 水洗하였다. 70ml의 hyponex 培地(0.3% hyponex, 2% sucrose, 0.8% agar, pH 5.0) (Kano, 1963)가 들어있는 250ml 삼각플라스크에 種子를 播種하고 aluminium foil로 싸 다음 組織 培養室로 옮긴 後 相對濕度 70~80%, 晝間溫度 25℃, 夜間溫度 20℃, 照度 2,500~3,000lux를 매일 16시간씩 유지하며 發芽시켰다.

Autoclave(120℃, 15psi, 15min)에서 滅菌한 흙 3, 堆肥 2, 모래 1의 混合土를 나무상자(50cm × 47cm × 21cm)에 섞어서 채우고 發芽된 種子를 옮겨 심은 뒤 溫度, 濕度, 日長은 組織 培養室 條件과 같으나 照度만을 5,000lux로 調節한 植物 生育室에서 栽培하였다 (寫眞 1).

#### 2) callus의 誘起 및 培養

播種後 35일부터 50일(開花日) 前까지의 植物體 上部로부터 3~5번째 되는 完全 展開 幼葉을 採取하여 70% ethanol에 2초간 담근후 0.5% NaOCl 溶液에 넣고 서서히 흔들어 주면서 15분간 表面을 殺菌한 다음 cleanbench로 옮겨 滅菌水로 3회 세척하였다.

葉 表面의 水分을 제거한 뒤 1 × 1cm 되게 切斷하여 表 1의 MS 培地(Murashige와 Skoog, 1962)가 70ml 들어있는 250ml 삼각플라스크에 置床한 後 aluminium foil로 싸고 組織 培養室로 옮겨 callus를 誘起시켰다.

또한 繼代培養 條件을 확립하기 위하여 隔日로 callus의 무게를 달아 callus의 生長率을 調査하였다.

Table 1. Composition of MS medium for culture of *Petunia hybrida* callus.

Mineral salts			
Major salts	Concentration(mg/l)	Minor salts	Concentration(mg/l)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22.3
KNO <sub>3</sub>	1900	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.6
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370	KI	0.83
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25
Na <sub>2</sub> EDTA	37.25	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.25
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27.85	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.25
Organic constituents			
	Concentration(mg/l)		Concentration(mg/l)
Glycine	2	BA	5
Nicotinic acid	0.5	NAA	0.5
Pyridoxine. HCl	0.5	Sucrose	30000
Thiamine. HCl	0.1	Agar	8000
Myo-inositol	100		

### 3) callus 生長에 對한 NAA와 BA의 影響 調査

MS 基本 培地에 naphthaleneacetic acid (NAA) 3수준(0, 0.5, 1.0ppm)과 benzyladenine(BA) 3수준(0, 5, 10ppm)을 서로 組合시킨 9 處理區의 培地를 사용하였다.

각 培地에 *Petunia hybrida* 'Titan red'의 잎을 1 × 1cm로 잘라서 置床한 後 2,500~3,000lux의 光 條件에서 한달간 培養하여 callus의 生長量을 調査하였다.

## 2. 原形質體 分離에 미치는 要因

### 1) 酵素 濃度の 影響

Cellulase Onozuka R-10(Yacult Honsha Co. Ltd. Japan) 1.0, 3.0, 5.0%와 Macerozyme R-10(Yacult Pharmaceutical Industry Co. Ltd. Japan) 0.5, 1.0, 2.0%를 濃度別로 組合한 9수준의 酵素 溶液을 사용하여 原形質體를 分離시킨 後, 原形質體의 收率을 haemocytometer(L : 1mm × W : 1mm × D : 0.1mm, American Optical, U. S.

A.)로測定하고 callus 무게 當 原形質體 數로 換算하였다.

Acetone에 fluorescein diacetate(FDA, Sigma Chemical Co. U. S. A.) (Larkin, 1976)를 5mg/ℓ 되도록 녹인 後 그 溶液을 原形質體 混合液에 加하여 最終 濃度가 2%(V/V) 되도록 하여 上溫에서 5분동안 incubation한 後, 螢光裝置가 부착된 倒立 顯微鏡(Nikon, Diaphot-TMD)下에서 초록색의 진한 螢光을 내는 살아있는 原形質體를 計數하고 原形質體 生存率은 전체 原形質體 數에 對한 百分率로 나타내었다.

酵素 溶液은 ultra membrane filter(pore size:0.45um)를 통과시켜 calius 1g當 10ml씩 사용하였다.

酵素液을 處理한 試料는 60rpm으로 13시간 진탕한 後 2겹의 가아제를 사용해서 찌꺼기를 걸러내고 이 溶液을 80g에서 5분간 遠心分離하여 酵素液을 제거한 後 0.6M sucrose를 넣고 100g에서 10분간 遠心分離하여 sucrose 表面에 層을 이루는 原形質體를 수확하였다.

이 原形質體를 融合溶液(0.6M sorbitol, 140uM CaCl<sub>2</sub>, 600uM HEPES, pH 7.0)에서 80g로 5분간 遠心分離하여 2회 세척한 後 각각의 原形質體 密度를 10<sup>5</sup>/ml되게 調節하였다.

## 2) 酵素 處理時間의 影響

酵素溶液(表 2)으로 각각 4, 7, 10, 13, 16시간 處理하여 原形質體를 分離시킨 後 原形質體 收率과 生存率을 調査하였다.

Table 2. Composition of the enzyme solution for isolatiog *Petunia hybrida* callus protoplasts.

Constituents	Concentration
Cellulase Onozuka R-10 <sup>a</sup>	3.0 %
Hemicellulase <sup>b</sup>	0.25 %
Macerozyme R-10 <sup>c</sup>	0.5 %
Calcium chloride	140 uM
HEPES <sup>d</sup>	600 uM
Sorbitol	0.6 M
pH	5.8

- a : Yakult Honsha Co. Ltd. Japan.
- b : Sigma Chemical Co. U. S. A.
- c : Yakult Pharmaceutical Industry Co. Ltd. Japan.
- d : N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid.

### 3. 電氣刺戟法에 의한 細胞融合과 關與因子 調査

#### 1) 電壓 및 周波數 條件 確立

融合 溶液에  $10^7/ml$ 의 密度로 調節된 *Petunia hybrida*의 原形質體를 懸濁하여 20ul의 混合 溶液을 electrode slide에 넣고 cover glass로 덮었다.

Electrode slide를 螢光 裝置가 부착된 倒立 顯微鏡에 올려 넣은 후 Electro Cell Manipulator 401A(BTX Inc. San Diego, CA)를 이용하여 細胞融合을 실시하였다.

이때 dielectrophoresis를 위한 交流 電壓, 周波數와 處理時間 그리고 electroporation을 위한 直流 電壓과 處理時間을 細胞融合率 [融合率(%)=(融合된 原形質體 數/融合 前의 原形質體 數) × 100]과 生存率 [生存率(%)=(電氣刺戟 後의 살아있는 原形質體 數/融合 前의 살아있는 原形質體 數) × 100]을 關連시켜 調査하였다.

#### 2) Calcium과 Magnesium이 融合率에 미치는 效果

Calcium은 膜의 安定性에 關與하고 (Zimmermann 等, 1984), 融合效果를 높인다는 보고가 있다 (Okada와 Murayama, 1966; David 等, 1981; Watts와 King, 1984). 또한,  $Mg^{2+}$ 이  $Ca^{2+}$ 보다 效果的이라는 보고도 있다 (Chapel 等, 1984).

따라서 電氣刺戟에 의한 細胞融合에 미치는  $Ca^{2+}$ 과  $Mg^{2+}$ 의 影響을 비교하기 위하여  $CaCl_2$ 와  $MgCl_2$ 를 각각 5가지 수준 (10, 70, 140, 280, 500uM)으로 處理하고 融合率과 生存率을 調査하였고, 또  $CaCl_2$ 에서 가장 좋은 效果를 보인 140uM  $CaCl_2$ 와  $MgCl_2$ 의 5가지 수준을 서로 組合시켜 調査하였다.

그리고, 좀 더 確實하게  $Ca^{2+}$ 의 影響을 알아보기 위하여 calcium을 첨가하지 않은 融合培地와 2.5mM EGTA(Ethyleneglycol-bis-( $\beta$ -aminoethylether)-N, N, N', N'-tetra acetic acid, Sigma Chemical Co. U. S. A. ), 140uM  $CaCl_2$ 를 각각 첨가한 融合培地를 비교하여 融合率과 生存率에 미치는 calcium의 影響을 調査하였다.

### 3) Fusion facilitator 處理의 影響

融合培地에 fusion facilitator를 處理했을때 細胞 融合率과 生存率에 미치는 이들의 影響을 調査하기 위해 表 3의 facilitator 중 concanavalin A, DMSO, glyceryl monooleate, spermine은 濃度別로 protease, trypsin, triton X-100은 濃度와 時間別로 處理하였다.

Table 3. Concentrations and incubation times for the fusion facilitator treatment.

Fusion facilitators*	Concentration	Incubation time(min.)
Protease	0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 %	0.5, 10, 15, 20
Triton X-100	0, 1, 2, 4, 8 ppm	0.5, 10, 15, 20
Trypsin	0, 0.1, 0.3, 0.4, 0.5 %	0, 2, 7, 13, 18
Concanavalin A	0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 %	10
DMSO	0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 %	10
Glyceryl monooleate	0, 5, 10, 50, 100 ppm	10
Spermine	0, 200, 400, 600, 800 ppm	10

\* : All of the fusion facilitators were purchased from Sigma Chemical Co. U. S. A.



## 結 果 및 考 察

### 1. Callus의 誘起 및 培養 條件

#### 1) NAA와 BA가 callus 生長에 미치는 影響

Auxin은 細胞 伸長을 그리고 cytokinin은 細胞 分裂을 促進함으로써 植物 生長에 깊이 關여하고 있는 바, 이들 生長 調節劑에 의해서 callus의 生長이 크게 좌우된다.

本 實驗에서는 auxin으로 NAA 그리고 cytokinin으로 BA를 각각 세가지 수준의 濃度로 混用 處理해서 callus의 生長을 觀察한 結果는 表 4, 寫眞 2와 같다.

NAA와 BA를 處理하지 않았을 때는 callus가 誘起되지 않았을 뿐 아니라 죽거나 變色되었고 NAA만 處理했을때 組織은 살아 있었으나 callus는 誘起되지 않았다.

Table 4. Effects of NAA and BA on callus growth of *Petunia hybrida*.

Growth regulators(ppm)		Degree of callus formation*
NAA	BA	
0	0	0
0	5	2
0	10	2
0.5	0	1
0.5	5	4
0.5	10	3
1.0	0	1
1.0	5	2
1.0	10	3

\*0 : Dead or discolored

1 : No callus but alive

2 : Poor callus

3 : Good callus

4 : Very good callus

한편, BA만 處理했을때 callus가 誘起되기는 하지만 生育狀態가 불량하였다. callus 生育이 가장 양호한 NAA와 BA의 濃度는 각각 0.5ppm과 5ppm 이었다.

이 結果는 Rao 等(1973)이 0.2ppm BA와 1ppm NAA를 處理했을때 *Petunia inflata* 와 *Petunia hybrida*의 callus 生育狀態가 가장 양호하다는 보고와는 다소 차이가 있는데 이것은 品種間의 차이에서 비롯된 것이라고 생각된다.

그리고 이들 生長 調節劑를 單獨으로 사용했을때 보다는 適正 濃度로 混用했을때

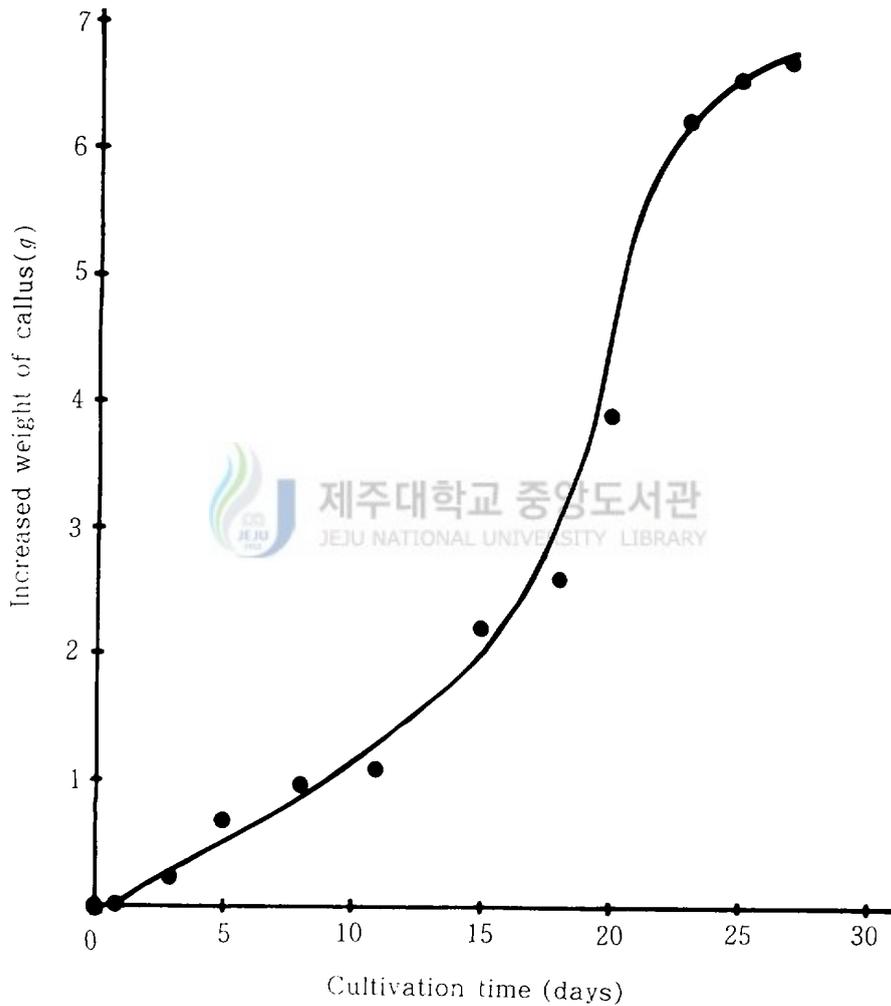


Fig. 1. Growth rates of *Petunia hybrida* callus on MS medium.

callus 生育狀態가 더 좋았다.

## 2) callus 生長率

일반적으로 callus는 培養後 一定 期間이 지나면 水分 損失로 인한 agar의 乾燥와 必須 營養素의 消耗때문에 生育이 나빠지므로 새로운 培地로 옮겨 繼代培養을 해야한다 (Street, 1969; Yeoman Macleod, 1977).

繼代 培養은 callus의 生長이 가장 活發할 때 하는것이 바람직한데, 그 時期는 growth curve를 調査하여 定할 수 있다.

callus 生長速度는 그림 1에 나타난 바와 같이 培養 始作後 20~23일에 가장 큰것으로 나타났기 때문에 繼代培養은 20~23일 間隔으로 하였다.

callus의 生育狀態는 이로부터 分離한 原形質體의 收率과 生存率에 큰 影響을 주는것으로 알려져있는데 일반적으로 生長速度가 가장 큰 시기에 있는 callus를 사용하는 것이 原形質體의 分離에 적합하다.

그래서 本 實驗에서도 NAA 0.5ppm과 BA 5ppm을 첨가한 MS 培地上에서 繼代培養 始作으로부터 20~23일째 되는 callus를 사용하여 原形質體를 分離하였다.

## 2. 原形質體 分離에 미치는 酵素 濃度와 處理時間의 影響

### 1) 酵素 濃度の 影響

細胞壁 分解 酵素를 이용하여 原形質體를 分離할 때 基本的으로 必要한 酵素는 cellulase와 pectinase인데, 適正 濃度와 處理時間은 사용되는 細胞의 種類와 生理狀態에 따라 다르다.

本 實驗에서는 *Petunia hybrida* callus의 原形質體 裸出에 適當한 酵素 處理條件을 確立하기 위해서 그림 2와 같이 cellulase와 macerozyme을 混用하여 收率과 生存率을 調査하였다.

그 結果 3% cellulase와 0.5% macerozyme을 處理했을때  $2.6 \times 10^5$  protoplasts/g. callus로 가장 높은 原形質體 收率을 얻을수 있었다.

Alan과 Martin(1976)은 酵素의 濃度가 增加할수록 分離되는 原形質體 數가 增加하지만 生存率은 減少한다고 하였는데, 本 結果에서는 cellulase는 3%, macerozyme은

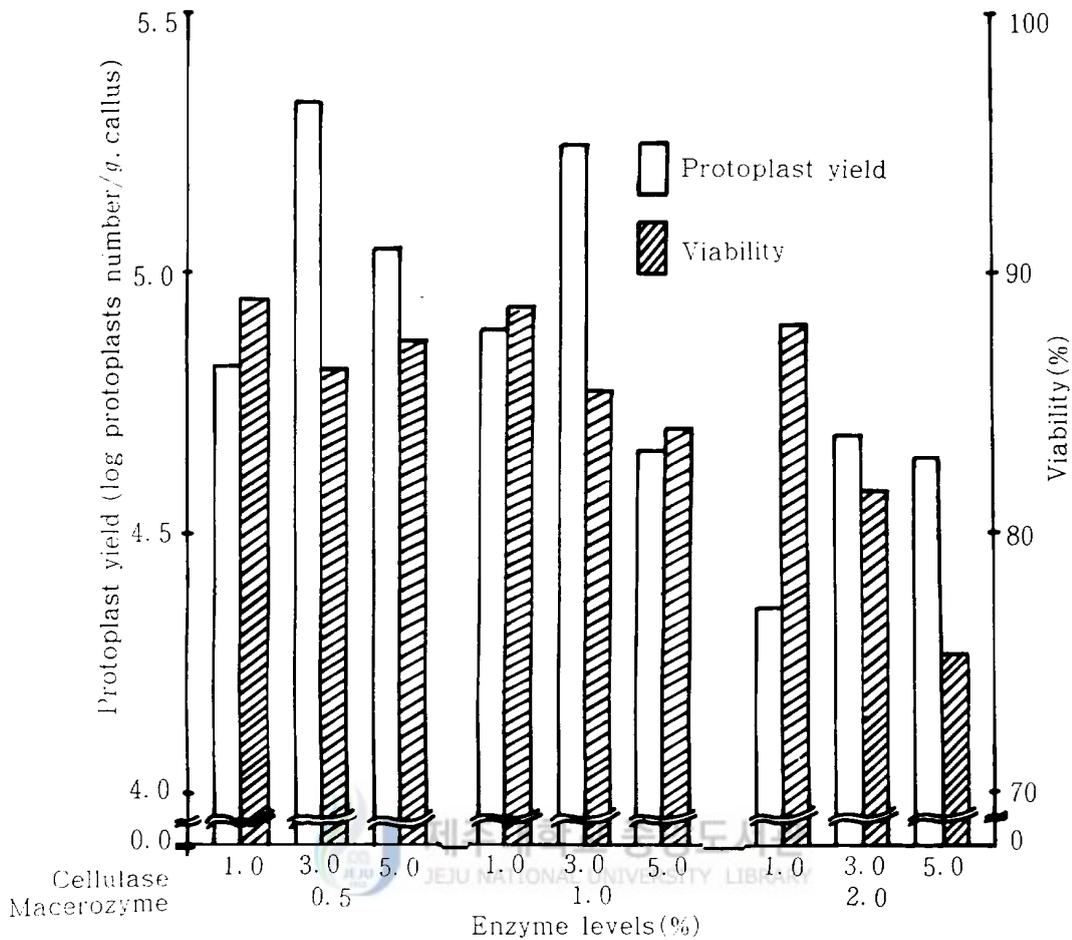


Fig. 2. Protoplast yield and viability varied with the combined treatments of cellulase and macerozyme at 14 hours of incubation time.

0.5%에서 收率( $2.6 \times 10^7$  protoplasts/g. callus)이 가장 좋았고 生存率은 cellulase 1%, macerozyme 0.5%에서 가장 좋았으며(86%) 濃度가 增加할수록 減少되었다.

높은 濃度인 5%의 cellulase와 2%의 macerozyme에서는 收率( $5.3 \times 10^5$  protoplasts/g. callus)이 낮았는데 이는 酵素濃度가 높으면 酵素에 포함되어 있는 不純物이 有毒作用을 나타내 滲透能을 변화시켜 原形質體를 파괴시킨 때문인 것으로 생각된다(韓, 1984).

## 2) 酵素 處理時間의 影響

酵素 處理時間이 原形質體의 收率에 미치는 影響을 보면 13시간 째에 最高値를 나타내어 callus 生體무게 1g當  $2.6 \times 10^6$ 개의 原形質體를 얻을수 있었으며 그 이후에는 그림 3에서 보는바와 같이 급속히 減少하였다. 13時間 後에 급속히 減少하는 것은 酵素에 의해서 原形質膜이 너무 많이 分解되어 터지기 때문인 것이다. 한편 生存率은 酵素 處理 13시간까지 서서히 減少하다가 그 이후에는 급격한 減少를 나타냈다.

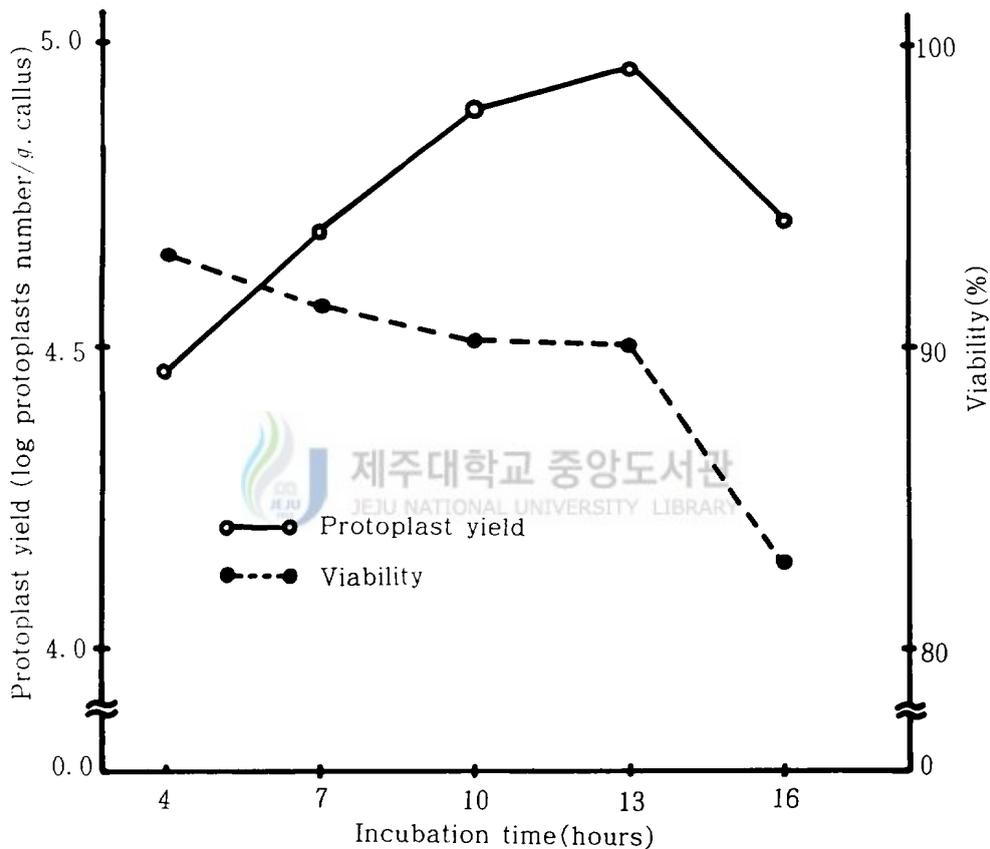


Fig. 3. Changes of protoplast yield and viability of *Petunia hybrida* with incubation times when treated with the enzyme solution (cellulase 3%, macerozyme 0.5% and hemicellulase 0.25%).

大豆의 경우 callus는 葉肉組織보다 酵素處理時間이 더 많이 所要되며 (李等, 1985) 또한 植物體 種類 및 生育狀態에 따라 處理時間은 아주 다양한 것으로 보고되어 있다(Hayward와 Power, 1975; Power 등, 1976; Sink와 Power, 1977; Power 등, 1980). Alan과 Martin(1976)에 의하면 原形質體 分離 以後 酵素가 存在하면 毒性이 있으므로 分離가 끝나는 대로 酵素를 除去하는 것이 좋다고 했다.

이상의 結果로 부터 *Petunia callus*를 3% cellulase와 0.5% macerozyme을 混合한 酵素溶液에서 13時間 處理하는 것이 protoplast 分離를 위해 가장 適合하다는 것을 알수 있었다( $\phi 20 \pm 5.0 \mu\text{m}$ ; 寫眞 3).

### 3. 電氣刺戟法에 의한 原形質體 融合에 關與하는 因子

#### 1) 電壓 및 周波數

電氣刺戟法에 의한 植物 原形質體 融合이 보고(Senda 등, 1979)된 이래, 電場 處理後 生存能力, 細胞壁 再生成 및 分裂能力이 보고됐고(Bates 등, 1983; Zachrisson과 Bornman, 1984; Watts와 King, 1984), 또한 體細胞 雜種植物이 再生成된다는 것도 보고됐다(Kohn 등, 1985; Bates와 Hasenkamph, 1985).

電場下에서의 融合過程은 交流 pulse에 의하여 原形質體가 雙極性을 띠게 되고 電場 密度가 높은쪽으로 이동하여 pearl chain이 形成된 後(寫眞 4) 高電壓의 直流 pulse를 짧은 時間동안 주면 原形質膜의 breakdown이 誘導된다.

이때 電場下에서 原形質膜이 접하고 있는 부분은 protein-free area가 되며 이곳에서 breakdown이 일어나고 原形質膜의 재 유착 過程에 의해 두 原形質體의 融合이 이루어진다(寫眞 5~10). 이러한 細胞融合에 있어서 電氣的 條件들은 細胞의 크기, 密度와 原形質膜을 이루는 脂質 및 蛋白質의 構成에 따라 달라지며 融合 chamber의 構造的 條件에 따라서도 달라지는 것으로 알려졌다(Zimmermann 등, 1982; Zimmermann과 Vienken, 1982; Bates 등, 1983; vienken 등, 1983; verhoek-Kohler 등, 1983; Bates, 1985).

本 實驗에서는 *Petunia hybrida* 'Titan red'의 明 培養 callus에서 分離한 原形質體를 電場下에서 融合시키기 위하여 먼저 交流의 周波數와 電壓 그리고 處理時間에 따른 pearl chain 形成過程을 調査하였는데 그 結果는 表 5와 같다.

Table 5. Effects of AC pulse treatments on the formation of protoplast pearl chain.

Frequency (kHz)	Amplitude (V/cm)	Time (sec)	No. of protoplasts tested	Percentage of pearl chain formation		
				Protoplasts number per chain		
				2 - 3	4 - 6	>7
10	20	5	40	16.4	3.64	NOB
		10	40	10.3	6.9	NOB
		15	40	11.9	4.5	NOB
		20	40	16.1	NOB	NOB
	40	5	40			
		10	43	NRT	NRT	NRT
		15	40			
		20	41			
	60	5	40			
		10	41	NRY	NRT	NRT
		15	37			
		20	40			
80	5	40				
	10	40	NRT	NRT	NRT	
	15	40				
	20	40				
100	20	5	40			
		10	40	NRT	NRT	NRT
		15	40			
		20	40			
	40	5	40			
		10	40	NRT	NRT	NRT
		15	41			
		20	66			
	60	5	40			
		10	40	NRT	NRT	NRT
		15	40			
		20	40			
80	5	40				
	10	40	NRT	NRT	NRT	
	15	40				
	20	40				

Table 5. (to be continued)

Frequency (MHz)	Amplitude (V/cm)	Time (sec)	No. of protoplasts tested	Percentage of pearl chain formation		
				Protoplasts number per chain		
				2 - 3	4 - 6	>7
1	20	5	40	NMV	NMV	NMV
		10	40			
		15	40			
		20	40			
	40	5	40	NMV	NMV	NMV
		10	40	NMV	NMV	NMV
		15	40	NMV	NMV	NMV
		20	40	10	NOB	NOB
	60	5	41	9.8	NOB	2.4
		10	40	27.5	2.5	NOB
		15	41	14.6	12.2	NOB
		20	39	10.3	2.6	5.1
80	5	60	16.7	NOB	NOB	
	10	40	7.5	10		
	15	38	5.3	10.5		
	20	40	5	5		
10	20	5	40	NMV	NMV	NMV
		10	40			
		15	40			
		20	40			
	40	5	40	NMV	NMV	NMV
		15	40	NMV	NMV	NMV
		15	40	7.5	NOB	NOB
		20	40	7.5	NOB	NOB
	60	5	36	11.5	NOB	NOB
		10	48	12.5	NOB	NOB
		15	35	5.7	5.7	NOB
		20	53	9.4	1.9	1.9
80	5	37	8.1	NOB	NOB	
	10	40	7.5	NOB	5	
	15	35	11.4	2.9	NOB	
	20	38	10.5	2.6	NOB	

NMV : Pearl chains were not formed because the protoplasts were not moved.

NRT : Pearl chains were not formed because the protoplasts were rotated.

NOB ; Pearl chain formation was not observed.

交流 周波數 10kHz에서는 40V/cm, 60V/cm 및 80V/cm의 電壓을 걸어줄때 그리고 100kHz에서는 20, 40, 60, 80V/cm의 電壓條件에서 原形質體가 同轉現像을 일으켜 pearl chain을 形成하지 못했는데 이는 resonance 現像이 충분히 일어나지 못해서 이들의 中性 粒子化가 이루어지지 않은 結果이다(Zimmermann 等, 1981b; Arnold와 Zimmermann, 1982). 또한 1MHz와 10MHz의 交流 周波數에 20V/cm를 걸어주면 原形質體가 움직이지 않았고 따라서 pearl chain이 形成되지 않았다.

그러나, 10kHz에서 20V/cm 그리고 1MHz와 10MHz에서 60V/cm 및 80V/cm를 걸어주면 pearl chain이 形成되었는데 10kHz보다는 1MHz와 10MHz에서 더욱 긴 chain이 觀察되었다.

즉, 낮은 周波數인 10kHz에서는 2~3개의 原形質體로 만들어진 chain이 주로 觀察되었다.

pearl chain 形成이 양호한 10kHz, 20v/cm, 10sec와 1MHz, 60V/cm, 15sec의 두 條件을 선택하여 處理한 뒤에 直流 pulse 條件을 달리하여 融合率과 生存率을 調査한 結果는 表 6과 같다.

交流 10kHz, 20V/cm를 10sec 가하고 直流 pulse 2.5kV/cm와 3.5kV/cm를 處理하면 原形質體가 모두 파괴되었으나 0.5kV/cm를 가하면 3~4%, 1.5kV/cm에서는 6%의 融合率을 나타내었다.

交流 1MHz, 60V/cm를 15sec 處理하고 直流 pulse 0.5kV/cm를 걸어주면 原形質體가 움직이지 않아 融合이 되지 않았고, 3.5kV/cm를 걸어주면 原形質體가 전부 파괴되었으나 1.5kV/cm에서는 3~6% 그리고 2.5kV/cm에서는 9~10%의 融合率을 나타내었다.

이때 交流 處理와 直流 處理 中間에서 행하여 지는 compression 條件은 10kHz에서는 30V/cm를 3초간 걸어주고 1MHz에서는 80V/cm를 8초간 걸어주는 것이 제일 좋았는데 compression 電壓 條件이 낮으면 融合率이 낮았으며 반대로 너무 높으면 原形質體가 파괴되는 現像을 보였다.

生存率은 交流 周波數가 增加할수록 그리고 直流 電壓이 增加할수록 점차 減少되는 傾向을 나타내었다.

Ruzin 等(1985)은 *Petunia parodii*의 融合條件으로 交流 周波數 1MHz에 300V/cm를 40초 가한 뒤 直流 1.75kV/cm를 40usec동안 주면 21%의 높은 融合率을 나타내었다고

Table 6. Effects of the DC pulse treatment under the selected AC conditions on the fusion frequency and viability of the pearl-chained protoplasts.

DC Amplitude (kV/cm)	Time (usec)	AC pulse			
		10 kHz. 20V/cm. 10sec		1 MHz. 60V/cm. 15sec	
		F <sup>a</sup> (%)	V <sup>b</sup> (%)	F <sup>a</sup> (%)	V <sup>b</sup> (%)
0.5	20	3.00	62.5	0(N)	57.5
	30	3.03	61.0	0(N)	54.8
	40	3.07	60.7	0(N)	54.0
	50	3.77	60.0	0(N)	53.8
1.5	20	5.96	59.7	2.77	57.2
	30	5.97	58.8	6.34	50.4
	40	5.98	58.8	4.50	49.0
	50	5.97	58.8	3.10	47.9
2.5	20	0(B)	0	8.66	54.5
	30	0(B)	0	10.1	46.6
	40	0(B)	0	10.4	45.2
	50	0(B)	0	8.86	45.1
3.5	20	0(B)	0	0(B)	0
	30	0(B)	0	0(B)	0
	40	0(B)	0	0(B)	0
	50	0(B)	0	0(B)	0

N : Not fused

B : Burst

$$a : \text{fusion frequency (\%)} = \frac{\text{No. of the fused protoplasts}}{\text{Total no. of the protoplasts tested}} \times 100$$

$$b : \text{viability (\%)} = \frac{\text{No. of the fluorescing protoplasts after electrofusion}}{\text{Total no. of the protoplasts}} \times 100$$

하였는데 品種과 protoplast의 生理的인 차이에 따라 電場 條件도 달라지는 것으로 생각된다.

그러나, 일반적인 경향은 交流 周波數가 kHz일때 보다는 MHz에서 pearl chain이 양호하게 形成되었고 直流의 높은 電壓을 짧은 時間동안 주었을때 融合率이 높아진다는 것이다.

이상의 結果 原形質體 融合의 適正條件은 交流 1MHz, 60V/cm, 15sec와 直流 2.5kV/cm, 40usec이었고 이 條件에 10%의 融合率과 46%의 生存率을 나타내었다.

## 2) Calcium과 Magnesium

電氣刺戟 融合時에 EGTA를 融合培地에 첨가할때 dielectrophoresis에는 영향을 주지 않지만 融合을 현저하게 抑制시키고(Okada 等, 1984)  $Ca^{2+}$  ionophore인 A23187을 첨가하면 融合率이 增加된다는 보고가 있으며(Grimes와 Boss, 1985) Chapel 等(1984)은  $Mg^{2+}$ 이 融合率을 향상 시킨다고 하였다.

本實驗에서는  $Ca^{2+}$ 과  $Mg^{2+}$ 의 각 濃度別로 融合效果를 조사하였으며 그 結果는 그림 4와 같다.

$MgCl_2$ 는 濃度에 관계없이 6~7%로 낮은 融合率을 나타내었고,  $CaCl_2$ 는 140 $\mu$ M에서 가장 높은 11%의 融合率을 보였으며 140 $\mu$ M  $CaCl_2$ 와 140 $\mu$ M  $MgCl_2$ 를 混合했을때는 13%의 상승된 融合率을 나타내었다.

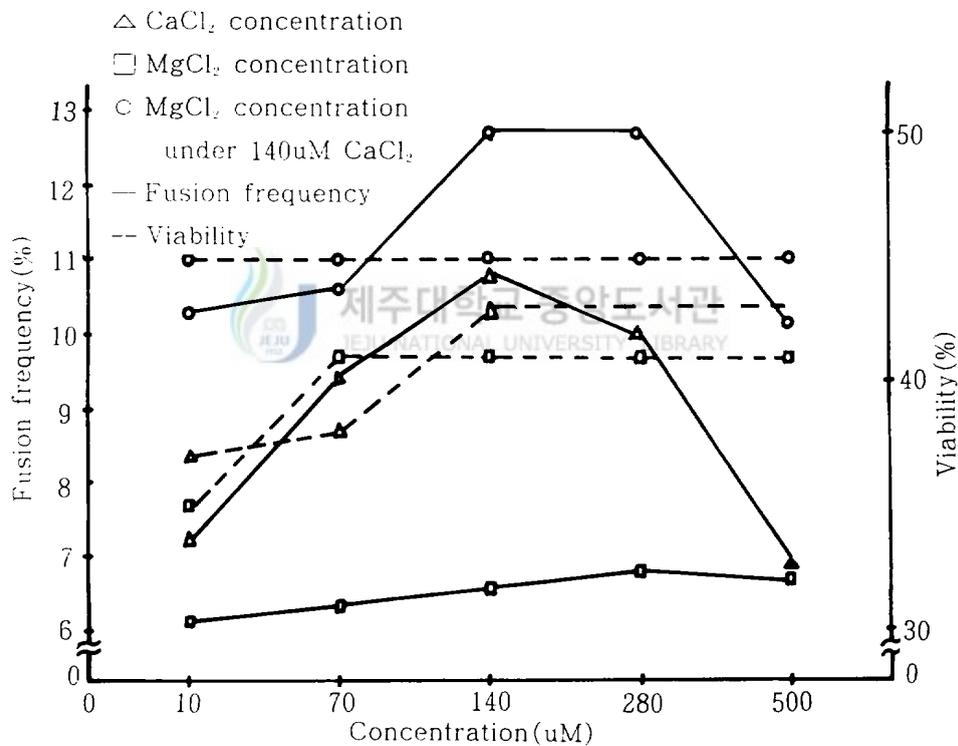


Fig. 4. Effects of various concentrations of  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  on protoplast fusion frequency and viability of *Petunia hybrida*, in the fusion medium containing 0.6M sorbitol and 600 $\mu$ M HEPES.

生存率は  $MgCl_2$ 의 70 $\mu$ M 이상에서는 40%,  $CaCl_2$  140 $\mu$ M 이상에서는 43%, 140 $\mu$ M  $Ca^{2+}$ 과 140 $\mu$ M  $Mg^{2+}$ 을 혼합했을 때는 45%이었다.

Ohnishi 等(1987)도  $Mg^{2+}$  處理는 融合效果가 없고 100 $\mu$ M  $Ca^{2+}$ 와 100 $\mu$ M  $Mg^{2+}$ 을 混合處理 했을 때 상승된 融合率을 나타낸다고 하였는데 이는 本 實驗 結果와 일치하였다.

$Ca^{2+}$ 이 融合에 미치는 影響을 確認하기 위하여 融合培地에 2.5mM EGTA와 140 $\mu$ M  $CaCl_2$ 를 첨가했을 때와  $Ca^{2+}$ 을 전혀 처리하지 않았을 때의 融合率과 生存率을 비교 調査한 結果는 그림 5와 같다.

$Ca^{2+}$ 을 處理하지 않았을 때는 融合率과 生存率이 각각 7.2%, 34%이었고 140 $\mu$ M  $CaCl_2$ 를 處理했을 때는 10.7%, 43%이었음에 비해 2.5mM EGTA 處理時는 3%, 35% 현저하게 떨어졌다. Okada 等(1984)도 EGTA 處理가 融合率을 低下시키며  $CaCl_2$  處理가 融合率을 상승시킨다고 보고한 바 있어 本 實驗 結果와 일치하고 있다.  $Ca^{2+}$ 이 融合에 미치는 자세한 기작은 아직 밝혀져 있지 않지만 (Okada 等, 1984)  $Ca^{2+}$ 이 細胞融合에 必須的이라는 것을 알 수 있다.

### 3) Fusion facilitators

Zimmermann 等(1981)과 Ohno-Shosaku와 Okada(1984)는 蛋白質 分解酵素를 處理하면 原形質의 膜蛋白質이 除去되어 融合이 促進된다고 하였으며 Ruzin 等(1986)은 spermine과 DMSO가 原形質體의 凝集 效果가 있다고 하였고 glyceryl monooleate와 concanavalin A도 融合을 促進시킨다는 보고(Ohnishi 等, 1987)가 있다.

本 實驗에서 protease, trypsin, triton X-100, spermine, DMSO, glyceryl monooleate, concanavalin A의 融合促進 效果를 調査한 結果는 그림 6~8과 같다.

Protease는 0.15%를 15분 處理하였을 때 control에 비해 2.4배, trypsin은 0.3%를 7분동안 處理하였을 때 2.1배, triton X-100은 1ppm을 15분동안 處理하였을 때 1.6배로 상승된 融合率을 나타내었는데, 一定 濃度 이상에서는 모두 融合率이 크게 減少하였고 處理時間의 影響은 별로 받지 않았다.

Concanavalin A는 0.01%에서 control에 비해 1.4배, DMSO는 2.0%에서 1.8배, glyceryl monooleate는 5ppm에서 1.5배, spermine은 400ppm에서 2.2배의 상승된

融合率을 나타내었는데 역시 一定 濃度 이상에서는 모두 融合率이 크게 減少되었다. Ruzin과 McCarthy(1986)는 protease, trypsin, spermine, DMSO 등을 處理하였을때 融合率이 상승한다고 보고 하였다. 한편 Ohnishi 等(1987)은 glyceryl monooleate를 處理하면 融合率이 증가하나 triton X-100과 concanavalin A는 融合效果가 없다고 하였다.

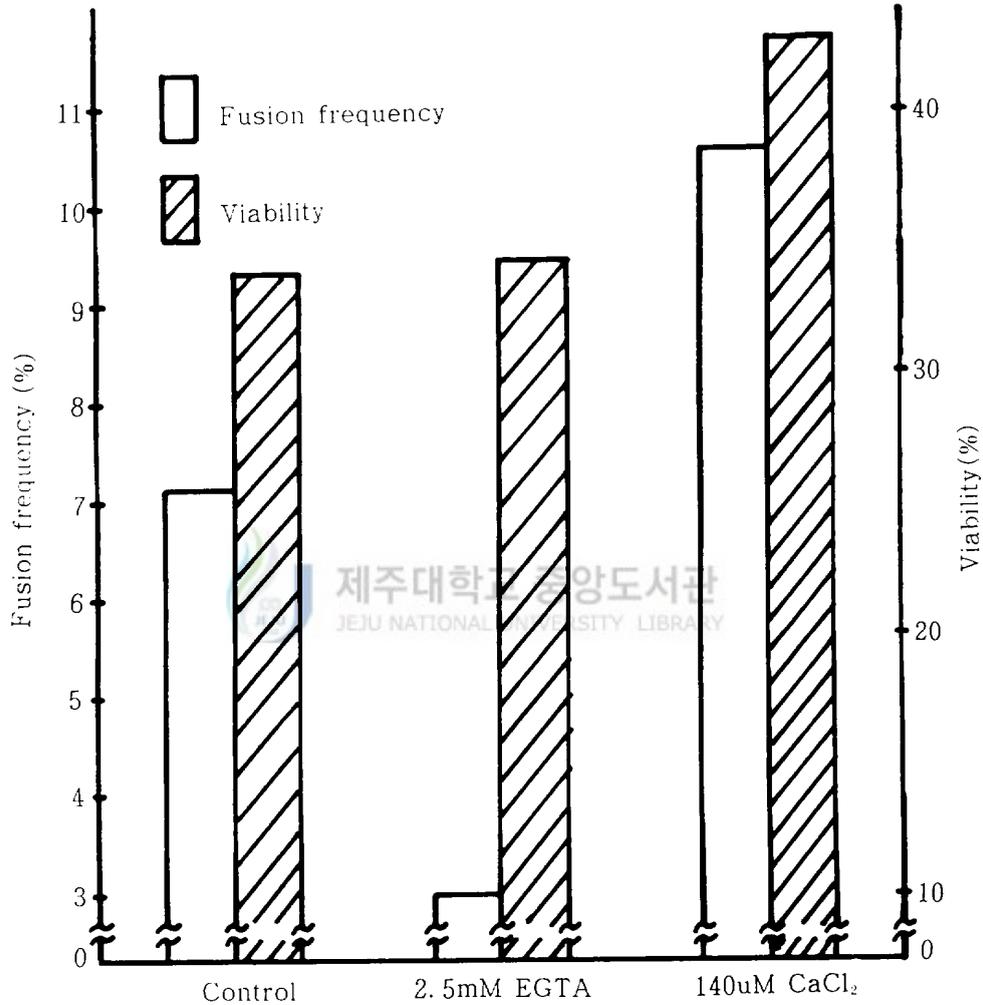


Fig. 5. Effects of three different calcium regimes on protoplast fusion frequency and viability of *Petunia hybrida*, in the fusion medium containing 0.6M sorbitol and 600uM HEPES.

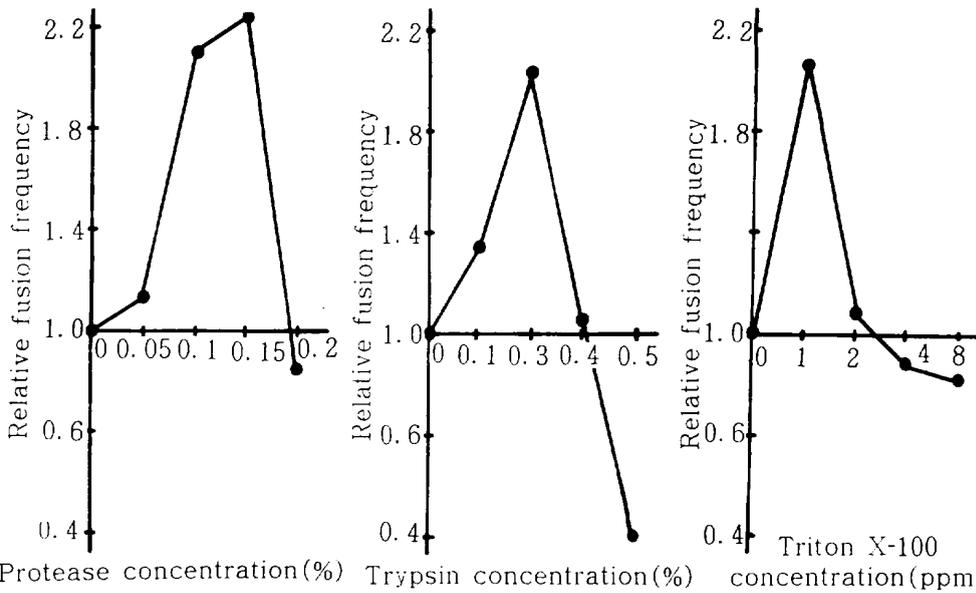


Fig. 6. Effects of protease, trypsin and triton X-100 concentrations on the electrofusion of *Petunia hybrida* protoplasts with the incubation times of 15 min. for protease and triton X-100, and 7 min. for trypsin. Fusion frequency expressed relative to the control (non-treated) value, where control = 1.0.

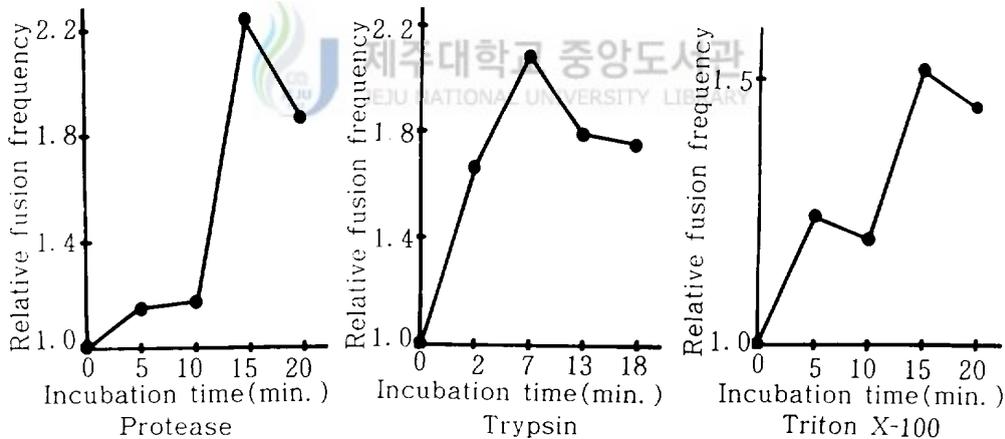


Fig. 7. Effects of the incubation time of protease, trypsin and triton X-100 on the electrofusion of *Petunia hybrida* protoplasts, with the concentrations of 0.15% protease, 0.3% trypsin, and 1ppm triton X-100. Fusion frequency expressed relative to the control (non-treated) value, where control = 1.0.

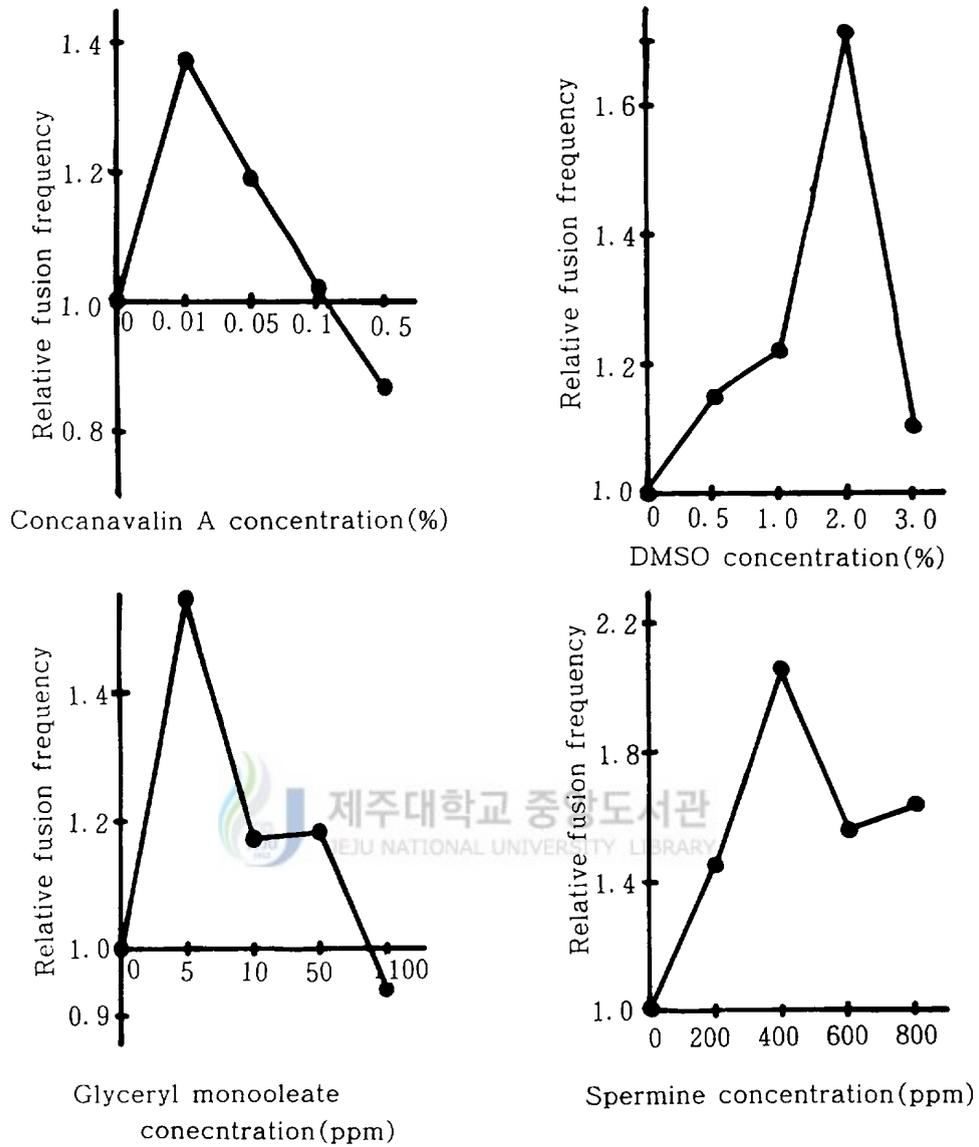


Fig. 8. Effects of concanavalin A, DMSO, glycerol monooleate and spermine concentrations on the electrofusion of *Petunia hybrida* protoplasts at the 10 min. incubation time. Fusion frequency expressed relative to the control (non-treated) value, where control=1.0.

本 實驗의 結果에서는 protease, spermine, trypsin, DMSO, triton X-100, glyceryl monooleate, concanavalin A 順으로 融合效果가 높았다.

이상의 facilitators를 適正條件으로 處理한 後 電氣刺戟을 주었을때와 주지 않았을때의 融合率과 生存率을 調査한 結果는 表 7과 같다. 電氣刺戟을 주지 않았을때는 facilitators 處理 後 2시간 동안에 모두 4% 이내의 낮은 融合率을 나타내었으나 生存率은 電氣刺戟을 주었을때 보다 높았다. 그러나, 電氣刺戟을 주었을때는 모든 facilitators 處理에 의해서 融合率이 상승한 반면 生存率은 spermine(42%), concanavalin A(41%), triton X-100(38%), glyceryl monooleate(37%), protease(37%), trypsin(35%), DMSO(31%) 順으로 낮아졌다. 따라서 이러한 facilitators는 모두 原形質體의 融合에 促進效果가 있는 반면 生存率에는 沮害要素로 作用한다는 사실을 알수 있었다.

Table 7. The combination effects of facilitators and electrical stimulation on the protoplast fusion and viability.

Facilitator treatments	Fusion frequency(%)		Viability(%)	
	electrical stimulation		electrical stimulation	
	-	+	-	+
Control	1.6	11.2	86.3	45.2
Protease(0.15%/15 min.)	3.9	26.8	76.9	36.5
Spermine(400 ppm/10 min.)	3.1	24.4	82.5	41.6
Trypsin(0.3%/7 min.)	3.8	23.3	75.9	35.4
DMSO(2%/10 min.)	3.8	20.2	72.8	31.2
Triton X-100(1 ppm/15 min.)	2.3	18.1	78.4	37.5
Glyceryl monooleate (5 ppm/10 min.)	1.7	17.3	82.0	37.1
Concanabalin A (0.01%/10 min.)	3.0	15.3	78.6	41.3

## 摘 要

本實驗은 *Petunia hybrida* 잎에서 callus를 誘起시켜 이로부터 原形質體를 裸出시키는 條件(酵素 濃度 및 處理時間)을 確立하는 한편, 電氣刺戟에 의한 植物 細胞 融合에 關與하는 物理 化學的 因子 卽 電場條件과 融合促進劑의 效果를 調査하고자 遂行되었다.

1. Callus 生長速度는 培養 後 20~23일째에 生體重 增加速度가 가장 컸고, 0.5ppm NAA와 5ppm BA를 添加한 MS 固體 培地上에서 生育시키는 것이 가장 좋았다.
2. 3% cellulase와 0.5% macerozyme을 處理했을때 가장 높은 原形質體 收率 ( $2.6 \times 10^7$  protoplasts/g. callus)을 얻었고 酵素의 適正 濃度를 초과하게 되면 收率과 生存率은 減少하였다. 原形質體의 收率은 酵素處理 13시간에 最大였고 그後 부터는 收率과 生存率이 급격히 減少하였다.
3. 電氣融合을 위한 電場條件으로는 AC 1MHz를 60V/cm에서 15sec동안 가한 후 2.5 kV/cm의 DC pulse를 40usec 동안 걸어주었을때 11% 融合率과 46%의 生存率을 보여 融合效果가 가장 좋았다.
4. 電氣融合時 2.5mM EGTA를 處理하면 3%의 融合率과 35%의 生存率, 140uM CaCl<sub>2</sub>를 處理하였을때는 11%의 融合率과 43%의 生存率, 140uM MgCl<sub>2</sub>를 處理했을때는 6%의 融合率과 41%의 生存率을 보였다.

또한, 140uM CaCl<sub>2</sub>와 140uM MgCl<sub>2</sub>를 混合處理했을때 融合率과 生存率은 각각 13%의 融合率과 45%의 生存率로 가장 높았다.

5. 電氣融合時 fusion facilitator를 處理하면 融合率은 增加되었으나 生存率은 減少되었다.

Fusion facilitator를 處理하지 않은 對照區(11.2%)의 融合率에 비해 增加된 融合效果는 protease(2.4x), spermine(2.2x), trypsin(2.1x), DMSO(1.8x), triton X-100(1.6x), glyceryl monooleate(1.5x), concanavalin A(1.4x)의 順이었다. 生存率은 對照區(45.2%)에 비해 spermine(42%), concanavalin A(41%), triton X-100(38%), glyceryl monooleate(37%), protease(37%), trypsin(35%), DMSO(31%) 順으로 減少되었다.

Plate 1. *Petunia hybrida* 'Titan red'.

Plate 2. Effects of NAA and BA on callus growth.

The callus derived from *Petunia hybrida* 'Titan red' was grown at 25°C under light condition for 30 days on MS medium containing various levels of NAA and BA combination.



Plate 1

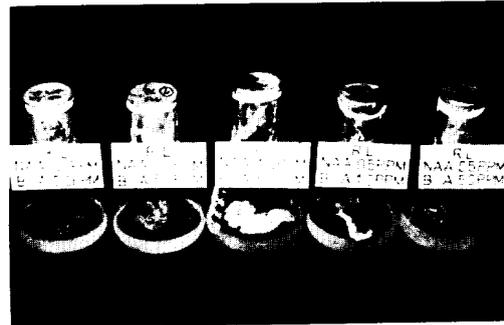


Plate 2

Plate 3. Protoplasts isolated from the callus of *Petunia hybrida*.

Plate 4. Pearl-chain formation by *Petunia hybrida* protoplasts in response to a sinusoidal AC field of 60V/cm, 15sec.

The chains of protoplasts, observed with an inverted microscope, radiate out from both electrodes.

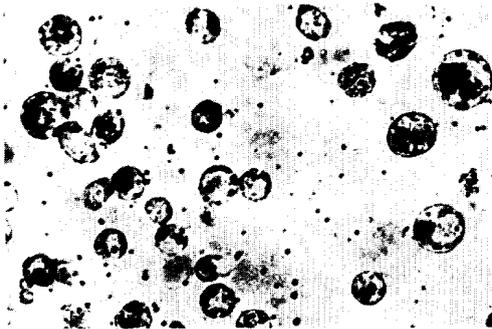


Plate 3

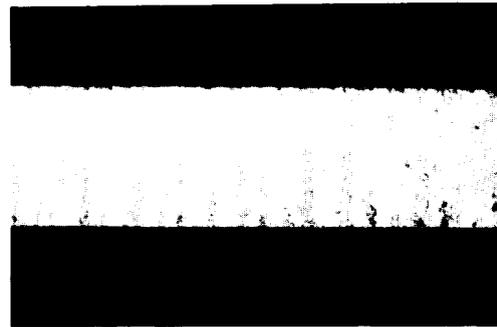


Plate 4

Plate 5~10. Fusion of *Petunia hybrida* protoplasts.

The protoplasts were aligned by a 60V/cm, 15sec AC field and were fused by application of a single-wave pulse(40usec, 2.5kV/cm).

Bar : 20um.

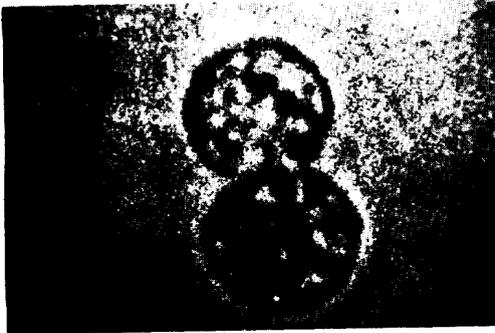


Plate 5



Plate 6



Plate 7



Plate 8



Plate 9

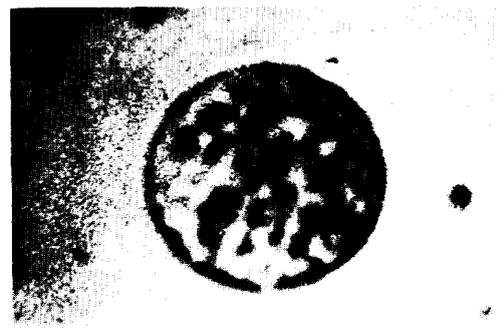


Plate 10

## 參 考 文 獻

- Alan, C. C. and B. Martin, 1976. Environmentally induced changes in the cell walls of tomato leaves in relation to cell and protoplast release. *Physiol. Plant.* 37 : 239.
- Bates, G. W. , J. J. Gaynor, and N. S. Shekhawat, 1983. Fusion of plant protoplasts by electric fields. *Plant Physiology.* 72 : 1110~1113.
- Bates, G. W. , J. A. Saunders, and A. E. Sowers, 1987. *Cell Fusion.* Plenum Press, New York. pp. 367~396.
- Binding, H. and G. Krumbiegel-Schroeren, 1984. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 1.* Academic Press, Inc. pp. 340~348.
- Chapel, M. , J. Teissie, and G. Alibert, 1984. Electrofusion of spermine-treated plant protoplasts, *FEBS Lett.* 173~336.
- Economou, A. E. , P. E. Read, 1982. Effects of NAA on shoot production *in vitro* from BA-pretreated *Petunia* leaf explants. *J. Amer. Hort. Sci.* 107(3) : 504-506
- Evans, D. A. , 1983. *Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 1.* Macmillian Publishing Co. , A Division of macmillian, Inc. , New York. pp. 291~321.
- 韓利烈, 1984. 組織培養學. 一潮閣. pp. 194~202.
- Holfmamm, G. A. and G. A. Evans, 1986. Electronic Genetic-Physical and Biological Aspects of Cellular Electromanipulation. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine,* San Diego. pp. 6~25.
- Kao, K. N. and M. R. Michayluk, 1974. A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta.* 115 : 355~367.
- Keller, W. A and G. Melchers, 1973. The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion. *Z. Naturforsch.* 28 : 737~741.
- Ohnishi, K. , J. Chiba, Y. Goto, and T. Tokunaga, 1987. Improvement in the basic

- technology of electrofusion for generation of antibody-producing hybridomas. *Journal of Immunological Methods*. 100 : 181~189.
- Okada, U. , T. Ohno-Shosaku, and S. Oiki, 1984.  $Ca^{2+}$  is prerequisite for cell fusion induced by electric pulses. *Biomedical Research*. 5(6) : 511~516.
- Power, J. B. , E. M. Frearson, D. George, P. K. Evans, S. F. Berry, C. Hayward, and E. C. Cocking, 1976. The isolation, culture and regeneration of leaf protoplasts in the genus *Petunia*. *Plant Science Letters*. 7 : 51~55.
- Power, J. B. , S. E. Cummins and E. C. Cocking, 1970. Fusion of isolated plant protoplasts. *Nature*. 225 : 1016~1018.
- Ruzin, S. E. and S. C. McCarthy, 1986. The effect of chemical facilitators on the frequency of tobacco mesophyll protoplast. *Plant Cell Reports*. 5 : 342~345.
- Schenk, R. V. and A. C. Hildebrandt, 1971. Production, manipulation and fusion of plant cell protoplasts as steps towards somatic hybridization. In : *Collog. Interm. Centre Nat. Rech. Sci. Paris*. pp. 319~332.
- Schieder, O. , 1983. *Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement*. Science Press, Beijing, China. pp. 371~390.
- Schieder, O. and H. Kohn, 1986. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vo. 3. Academic Press, Inc. pp. 569~585.
- Senda, M. , J. Takebe, S. Abe, and T. Nakamura, 1979. Induction of cell fusion of plant protoplasts by electrical stimulation. *Plant and Cell Physiology*. 20 : 1441-1443.
- Street, H. E. , 1969. Growth in organized and unorganized systems. Knowledge gained by culture of organs and tissue explants. In *Plant Physiology. A treatise*, Vol. VB, ed. F. C. Steward. New York : Academic Press. pp. 3~224.
- Watts, J. W. and J. M. King, 1984. A simple method for large scale electrofusion and culture of plant protoplasts. *Bioscience Reports*. 4 : 335~342.

- Yeoman, M. M. and A. J. Maeleod, 1977. Tissue callus culture-techniques. In plant tissue and cell culture, 2nd ed., ed. H. E. Street. Oxford : Blackwell Scientific Publications. pp. 31~59.
- Zachrisson, A. and C. H. Bornman, 1986. Electromanipulation of plant protoplasts. *Physiology Plant.* 67 : 507~516.
- Zimmermann, U. and G. Pilwat and H. P. Richter, 1981a. Electric field-stimulated fusion : Increased field stability of cells induced by pronase. *Naturwissenschaften.* 68 : 577~578.
- Zimmermann, U. , J. Vienken and G. Pilwat, 1981b. Rotation of cells in alternating electric field : the occurrence of a resonance frequency, *Z. Naturforsch.* 36c : 173~177.
- Zimmermann, U. and J. Vienken, 1982. Electric field-induced cell-to-cell fusion. *J. Membrane Biology.* 67 : 165~182.
- Zimmermann, U. and J. Vienken, 1984. *Cell Fusion*, Raven Press, New York. pp. 171~187.
- Zimmermann, U. and P. Scheurich, 1981. High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. *Planta.* 151 : 26~32.

## 謝 辭

本 論 文 이 完 成 되 기 까 지 指 導 와 激 勵 를 해 주 신 指 導 教 授 柳 長 杰 教 授 님 께 깊 이 感 謝 드 리 오 며 恒 常 많 은 가 르 침 을 주 신 金 滢 玉 教 授 님, 康 順 善 教 授 님, 高 正 三 教 授 님, 柳 基 中 教 授 님 께 도 感 謝 드 립 니 다.

또 한 實 驗 與 件 을 마 련 해 준 放 射 能 利 用 研 究 所 의 宋 成 俊 先 輩 님, 實 驗 遂 行 과 資 料 整 理 에 協 助 하 여 준 吳 成 國, 洪 京 愛 學 友, 金 性 姬 嬢, 恒 常 옆 에 서 도 움 을 준 夫 英 美 嬢 에 게 도 이 자 리 를 빌 어 感 謝 를 드 립 니 다.

끝 으 로 늘 念 慮 해 주 신 父 母 님 께 感 謝 드 립 니 다.

