식물학회지·제 28권 제 3호
Korean J. Bot. 28(3): 233-241 (1985)

大豆 (*Glycine max*) 下胚軸 由來 칼루스의 原形質體 分離 및 培養

李 光 雄·李 幸 順·金 相 九
(서울大學校 自然科學大學 植物學科)

Isolation and Culture of Protoplasts from Hypocotyl-derived Callus of Soybean (*Glycine max*)

Lee, Kwang-Woong, Haeng-Soon Lee and Sang-Gu Kim
(Department of Botany, Seoul National University, Seoul)

ABSTRACT

The isolation and culture of protoplasts from hypocotyl-derived calluses of *Glycine max* (L.) Merr. cv. Jangyeop were carried out. The maximum protoplast yield of 5.3×10^5 per gram fresh callus was obtained by digestion for 6 hrs in an enzyme solution containing 3.5% cellulase, 1.5% macerozyme, 10% sorbitol and 0.1% $CaCl_2\cdot2H_2O$ at pH 5.8. Newly formed cell wall of protoplasts cultured in MS agar medium containing 10 μM α-naphthaleneacetic acid (NAA) and 32 μM N^6-benzylaminopurine (BAP) could be observed after 24 hrs culture. The first cell division of the protoplasts was observed after 3 days of culture; cell clusters after 2 weeks of culture. When transferred to solid media, the protoplasts formed cell clusters gave rise to proliferating calluses.

緖 論

Cocking(1960)이 효소를 처리하여 *Lycopersicon esculentum*의 뿌리로부터 다량의 原形質體를 分離한 이래, 이러한 원형질체는, 細胞壁 再生(Grout, 1975; Lee and Min, 1981), 細胞小器官의 移入(Davey and Cocking, 1972; Vasil and Giles, 1975; Cha *et al.*, 1982), 타 원형질체와의 融合(Kao, 1977; Lee *et al.*, 1980; Kim, 1984) 등의 연구를 통하여 유전적으로 變換된 세포를 만들어 體細胞雜種을 生成시킬 수 있게 되었다.

콩科植物은 主要 作物에 속하며, 窒素固定을 하고 있는 식물이면서도 이의 再分化에는 많은 어려움이 남아 있는데, clover (Gresshoff, 1980), alfalfa (Kao and Michayluk, 1980; Johnson *et al.*, 1981), 강남콩 (Pelcher *et al.*, 1974; Kim *et al.*, 1982, 1983), 완두 (Constabal *et al.*, 1973) 및 *Phaseolus aureus* (Xu *et al.*, 1981)에서 배양이 시도되었고, 특히 大豆

이 論文은 文敎部 學術硏究助成費(ED 83-404)에 의하여 이루어진 硏究의 일부임.

[*Glycine max* (L.) Merr.]에서는 현탁배양된 세포 (Kao *et al.*, 1970, 1971), 꼬투리 (Zieg and Outka, 1980), 葉肉細胞 (Schwenk *et al.*, 1981), 子葉 및 미성숙 種子 (Lu *et al.*, 1983), 그리고 뿌리 (Xu *et al.*, 1982)로부터 각각 원형질체를 분리하여 배양한 결과 칼루스의 형성에 이른 경우도 있다. 또한 자엽 (Oswald *et al.*, 1977; Cheng *et al.*, 1980; Kameya and Widholm, 1981)이나 줄기 (Saka *et al.*, 1980) 및 현탁배양된 세포 (Christianson *et al.*, 1983)에서도 재분화가 시도되었으나 아직까지 이렇다 할 결과에는 이르지 못하고 있는 실정이다.

한편 원형질체의 배양으로써 유전적으로 순수한 單細胞性 조직을 얻을 수 있으므로 cell line의 선택이 가능하게 되며, 동일한 유전적 조성을 갖는 세포를 다량으로 획득할 수 있는 利點이 있어 이들 세포의 대량배양도 기대될 수 있는 것이다.

그런데 현재까지 대두의 원형질체 배양에 관하여 상기와 같은 여러 가지 연구사례가 보고되었으나 칼루스로부터 배양이 시도된 경우는 아직 보고된 바 없다. 따라서 본 실험에서는 大豆의 長葉品種을 사용하여 이의 下胚軸에서 배양된 칼루스로부터 다량의 원형질체를 분리시키고 이어 이들 분리된 원형질체를 배양하여 새로운 동일 cell line의 칼루스로의 생장을 유도코자 하였다.

材料 및 方法

植物材料 및 試藥. 大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]의 品種 長葉(Jangyeop)을 農村振興廳 園藝試驗場에서 분양받아 4°C 암소에서 보관하면서 실험에 사용하였으며, 식물호르몬인 α-naphthaleneacetic acid (NAA), indole-3-acetic acid (IAA), indole-3-butyric acid (IBA), 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D), N^6-benzylaminopurine (BAP) 및 zeatin은 Sigma Chemical Co.에서, 원형질체 분리를 위한 효소인 cellulase(Onozuka R-10)와 macerozyme (Onozuka R-10)은 Yakult Honsha Co.에서 구입하여 사용하였다.

칼루스 培養. 칼루스를 배양하기 위한 배지조성은 Murashige and Skoog(1962)의 무기영양소에 sucrose (30 g/l), *myo*-inositol (100 mg/l)의 유기영양소를 첨가하였으며 vitamine으로는 thiamine-HCl (10 mg/l), nicotinic acid (0.5 mg/l) 및 pyridoxine-HCl (0.1 mg/l)을 사용하였다. 大豆의 종자는 70% (v/v) ethanol로 1분, 2.5% (v/v) sodium hypochlorite (Clorox Co.)로 15분간 표면살균을 한 다음 멸균증류수로 3회 세척하고 멸균된 질석토양에 파종하여 암소에서 발아시켰다. 발아 7일후에 幼植物體의 하배축을 1 mm 두께로 잘라 flask 당 3개씩 심어 칼루스를 유도 및 배양하였다. 칼루스를 처음 유도할 때와 조직의 유지를 위한 배양배지는 10 μM NAA와 32 μM BAP를 첨가하였으며, 배지의 pH는 1.0 N NaOH를 사용하여 5.8로 조정하였고, Difco bactoagar (8 g/l)를 첨가하여 녹인 뒤, 100 ml들이 Erlenmeyer flask에 50 ml씩 分注, 120°C에서 15분간 멸균하였다. 칼루스는 27°C 암소에서 배양하였으며 21일을 주기로 계대배양하였다.

原形質體의 分離. 大豆의 下胚軸으로부터 21일 동안 배양하여 얻은 칼루스를 계대배양하면서 이것을 원형질체 분리의 재료로 사용하였다. 이 때의 칼루스 배양은 2,000 lux, 16:8의 광주기 및 27°C의 조건하에서 시행하였다. 원형질체를 분리시키기 위한 효소용액의 조성은 Table 1과 같으며 이를 5 mM의 phosphate buffer (pH 5.8)에 용해시켜 사용하였다. 이 효소

용액을 0.45 μm의 Millipore filter paper로써 멸균시킨 다음, 여기에 16일 동안 배양된 칼루스 조직을 넣고 35 rev/min, 30°C의 항온수조에서 진탕시켰다. 효소용액에 6시간 동안 진탕한 후 pore 직경이 50 μm되는 나일론천으로 효소와 칼루스 조직의 혼합액을 여과하여 細胞塊를 제거하고 100 *g*에서 7분간 원심분리하여 효소용액을 제거시킨 후 얻어진 원형질체를 21% 설탕용액을 이용하여 정제한 다음에, 원형질체 배양액으로 2회 원심분리함으로써 세척하였다. 원형질체 배양액은 칼루스 유도배지에 7% sorbitol, 0.1% casein hydrolysate (CH), 0.1% L-glutamic acid (L-Glu)를 첨가한 것을 사용하였다. 최종적으로 원형질체의 농도는 1×10^4 protoplasts/ml가 되도록 조절하였다.

Table 1. Composition of the enzyme solution used for the isolation of soybean[*Glycine max*(L.) Merr.] callus protoplasts

Constituents	Concentration(%)
Cellulase(Onozuka R-10)	3.5
Macerozyme(Onozuka R-10)	1.5
Sorbitol	10.0
$CaCl_2\cdot2H_2O$	0.1
pH	5.8

原形質體의 培養. 직경이 55 mm되는 glass Petridish에 0.8% agar를 첨가시킨 원형질체 배양배지를 얇게 편 후, 분리된 원형질체의 현탁액을 0.5 ml 정도 넣고 습기를 유지해 주기 위해 Parafilm으로 밀봉하여 27°C의 암소에서 배양하였다. 배양 1주일마다 새로운 배지를 첨가해 주었으며 細胞塊가 형성된 후에는 sorbitol을 제거한 배지에 계대배양하였는데 이 때부터는 光조건하에서 실시하였다. 형성된 colony를 0.8% agar가 첨가된 칼루스 유도배지에 옮겨 칼루스로의 생장을 유도하였다. 모든 배양은 습기를 유지해 주기 위해 플라스틱 용기에 물을 적신 filter paper를 깔고 그 곳에 glass Petridish를 넣어 밀봉시켰다. 세포벽 재생결과는 24시간 이상 배양한 원형질체를 15% sorbitol 용액에 4시간 동안 처리하여 관찰하였다.

結 果

原形質體의 分離. 大豆[*Glycine max* (L.) Merr. cv. Jangyeop]의 下胚軸에서 유도된 칼루스 조직으로부터 원형질체를 분리하기 위해 酵素溶液(Table 1)에 칼루스를 진탕시켰을 경우, sorbitol 농도 10% (0.55 M)에서 칼루스 조직 1 g 당 5.3×10^5개의 원형질체가 분리되었다(Fig. 1).

원형질체 분리시 酵素溶液의 처리시간에 대한 효과(Fig. 2)를 보면, 3시간이 지나면서 분리된 intact 원형질체 수가 증가하였으며, 4시간째에 2.0×10^5개, 5시간째에는 2.9×10^5개, 6시간 후에는 5.3×10^5개로 계속 증가하다가 그 이상의 처리에서는 오히려 감소되었다. 즉, 7시간 처리 후에는 4.5×10^5개로, 8시간 처리 후에는 3.5×10^5개로 감소되었다.

大豆의 칼루스 생장은 배양 1주일 후부터 왕성하게 진행되기 때문에, 칼루스 배양기간에 따른 원형질체의 분리효율을 알아보기 위하여 칼루스의 초기 생장 단계인 7일부터 3일 간격으로 25일까지 배양한 칼루스 조직을 Table 1의 酵素溶液에 각각 6시간 동안 진탕시켜 분리된 원형질체의 數를 비교하였던 바(Fig. 3.), 배양 16일째의 칼루스조직으로부터 가장 많은 원형질체가 분리되었다. 이렇게 하여 분리된 원형질체는 세포질이 충만한 상태였고 그 크기가 ϕ 15~60 μm로 다양하게 나타났다(Fig. 4 A).

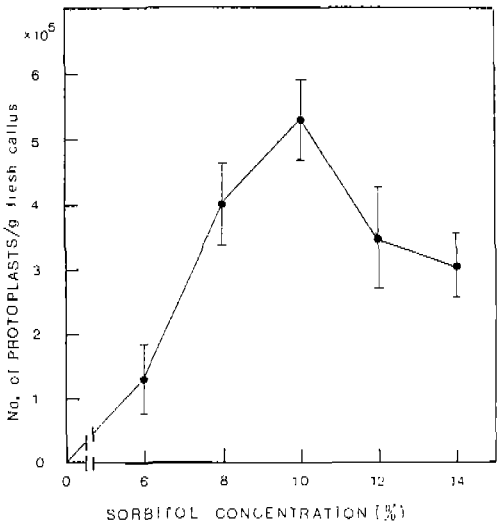

Fig. 1. Protoplast yield as related to osmoticum of the enzyme solution adjusted with sorbitol. The callus protoplasts of *Glycine max* (L.) Merr. cv. Jangyeop were isolated by the filtration method using 16-day-old callus and the composition of the solution is shown in Table 1. The incubation time in the solution was 6 hrs.

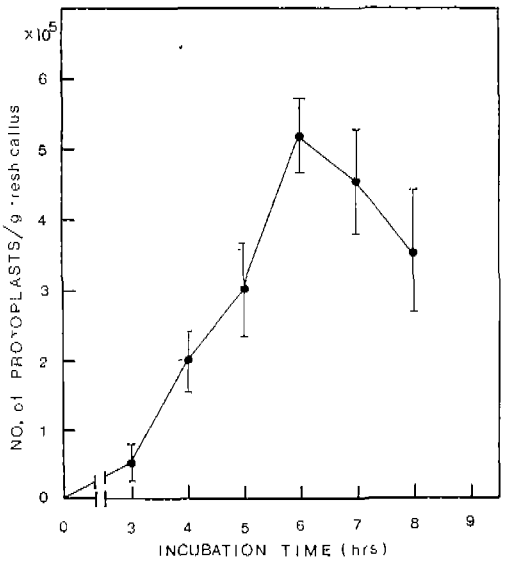

Fig. 2. Protoplast yield from soybean [*Glycine max* (L.) Merr. cv. Jangyeop] callus as related to the length of the incubation time in the enzyme solution (Table 1). The incubation was carried out on the shaker (35 rev/min) at 30°C. Calluses used were 16-day-old callus tissues.

原形體質의 培養. 분리된 원형질체(Fig. 4A)를 배양액으로 세척한 후, 원형질체의 밀도가 1×10^4 protoplasts/ml 정도 되도록 하여 배양을 실시한 결과, 배양 24시간이 지나면서 세포벽이 재생되기 시작했으며(Fig. 4B), 배양후 3일째부터는 일부 세포가 분열을 시작하였고 돌기를 형성하는 세포도 관찰되었다(Fig. C). 배양 8일이 지나면서 분열세포는 4細胞期에 이르렀으며(Fig. 4D), 그 후 계속 분열한 결과 2주후에는 細胞塊를 형성하였다(Fig. 4E). 4주 이상 배양하여 얻은 細胞塊를 sorbitol을 제거한 칼루스 배양 배지에 옮겨서 계대배양을 한 다음 光조건 하에서 배양을 계속한 결과 칼루스가 형성되었다(Fig. 4F). 이렇게 형성된 칼루스는 연한 녹색을 띤 부드러운 상태를 나타내었다.

考 察

大豆의 배양된 세포나 칼루스로부터 식물체를 재분화 시킨 보고는 아직 소수에 그치고 있으며 특히 칼루스의 원형질체를 분리하여 이들 단일 세포를 배양한 것은 더욱 드물다.

일반적으로 각 종 식물 원형질체의 분리와 배양에 있어서의 최적 osmolarity는 0.3 M에서 0.7 M까지 다양한데(Gamborg *et al.*, 1973), 10%(0.55 M)의 sorbitol로서 적정한 값을 나타낸 대두 칼루스의 경우(Fig. 1)와 비교할 때 대두 한 종내의 품종에 따라서도 역시 다양함을 알 수 있다. 즉 Mandarin 품종의 배양된 세포에서는 0.3 M이었고(Kao *et al.*, 1970,

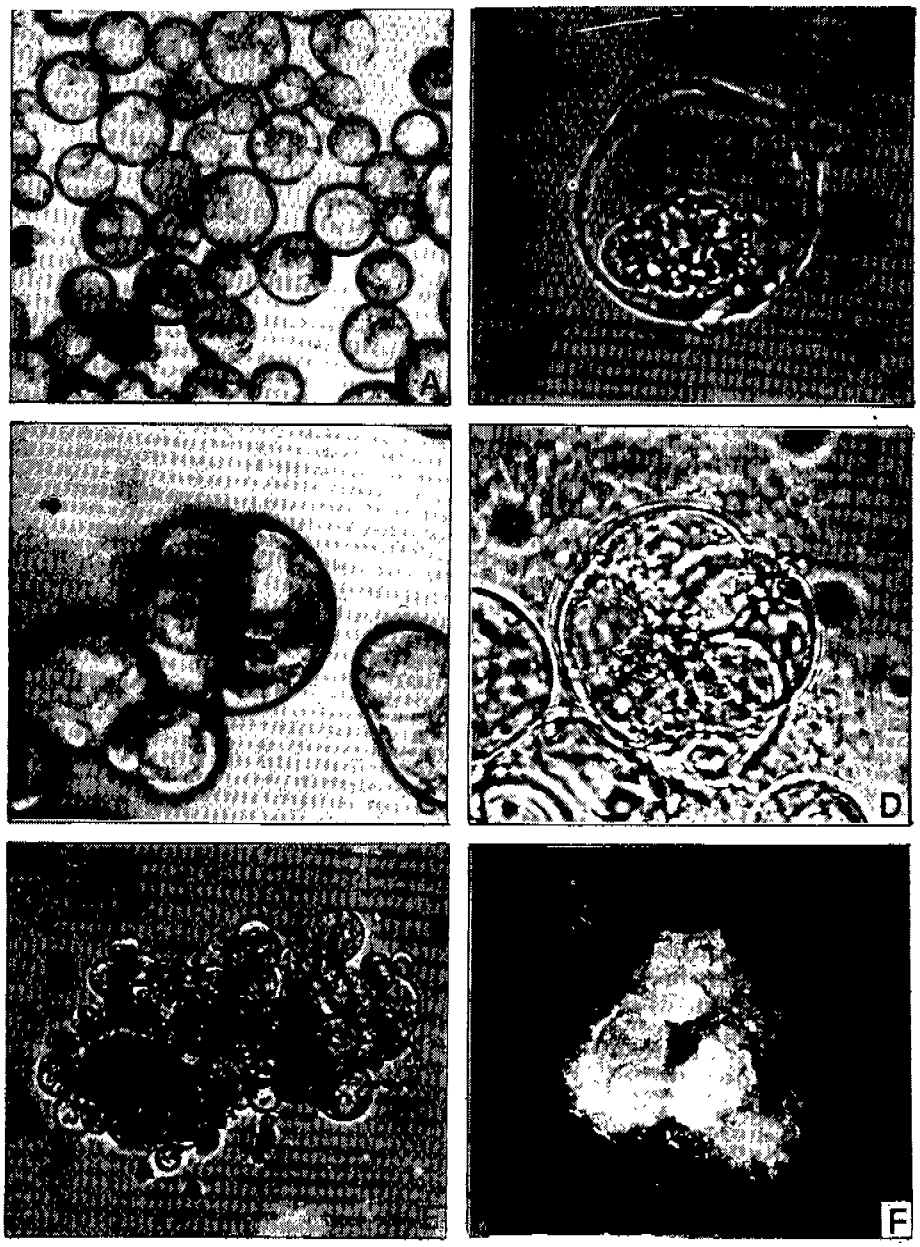

Fig. 4. Isolation and sustained culture of *Glycine max* (L.) Merr. cv. Jangyeop callus proptoplasts. A, Freshly isolated protoplasts (400×). B, Plasmolyzed protoplast showing newly formed cell wall (500×). C, First cell division after 3 days of culture (480×). D, A cluster of four cells after 8 days of culture (450×). E, Cell cluster formation after 2 weeks of culture (270×). F, Callus formation obtained in 4 weeks of culture after transferring cell clusters to MS agar plates (2.4×).

1971; Gamborg *et al.*, 1973), Columbus품종의 엽육세포는 0.44 M(Zieg and Outka, 1980), 그리고 Fiskeby품종의 뿌리(Xu *et al.*, 1982) 및 자엽(Lu *et al.*, 1983)은 0.7 M의 osmolarity를 필요로 하였다. 장엽품종의 하배축에서 유도·배양된 칼루스의 경우인 본 실험의 결과(0.55 M, Fig. 1)도 osmolarity가 시료에 따라서도 달리 나타남을 보여주고 있다.

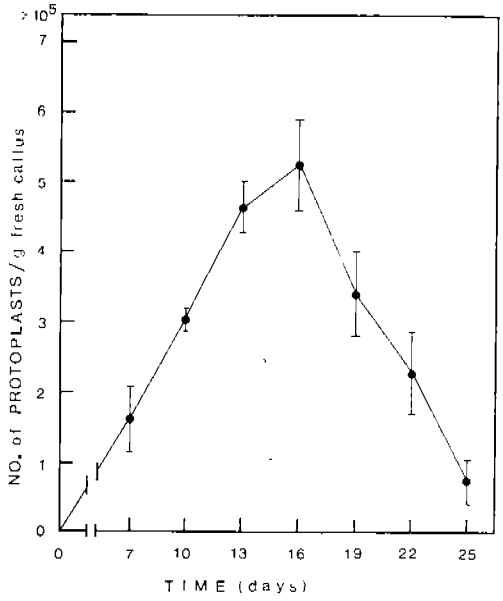

Fig. 3. Protoplast yield from *Glycine max* (L.) Merr. cv. Jangyeop callus tissue as related to the age of the callus culture.

Kao *et al.* (1970)은 대두의 현탁배양된 세포로부터 원형질체를 분리하는 데에 6시간 동안의 효소용액 처리를 필요로 하였다. 그러나 엽육조직으로부터는 1시간의 처리로 다량의 원형질체를 분리시킨 예도 있다(Schwenk *et al.*, 1981). 엽육조직에서 보다 더 오랜 시간을 요한 현탁배양 세포의 경우와 본 실험의 칼루스에서의 분리에 요구되는 시간(Fig. 2)이 동일하였는데 이는 intact 세포보다는 배양된 세포의 원형질체 분리에 소요되는 시간이 일반적으로 길다는 것과 일치되고, 또한 배양된 세포는 높은 농도의 효소용액을 필요로 하고 있음을 알 수 있었다.

원형질체의 분리는, 공시한 시료인 대두 칼루스가 가장 왕성한 생장을 보이는 때인 16일간 배양된 시료가 가장 높은 분리효율을 나타내었다(Fig. 3). 이러한 결과는 강남콩(***Phaseolus vulgaris***) 칼루스의 원형질체 분리에 요구되는 최적 조직은 13일간 배양된 칼루스라는 보고(Kim *et al.*, 1983)와 14일간 배양된 목화(***Gossypium klotzchianum***) 칼루스조직의 경우(Finer and Smith, 1982)와 마찬가지로 모두 왕성한 생장 단계에 있는 칼루스 조직임을 확인케 하였다. 칼루스의 생장이 왕성한 시기를 지나 더 진행될수록 원형질체의 수확량이 감소되는 것은 세포벽의 肥厚(Uchimiya and Murashige, 1974)로 인하여 효소용액에 의하여 쉽게 분해되지 않기 때문이며, 또한 효소용액에서의 진탕시간이 길어짐에 따라 먼저 분리된 원형질체가 파괴되고 따라서 intact한 원형질체의 수가 감소되기 때문으로 사료된다.

이상에서 본 바대로, 대두 장엽의 하배축에서 유래된 칼루스에서의 원형질체 분리는 이에 적정한 osmolarity, 처리 효소 농도, 처리 시간, 칼루스의 배양 age 등, 특정 조건이 요구된다고 할 수 있다.

이렇게 하여 분리된 장엽의 칼루스 원형질체는 배양 3일 후부터 일부 세포가 세포벽을 재생하고 분열하기 시작하였는데, 대두 조직의 원형질체를 배양한 Kao *et al.*(1970)의 보고에 의하면 배양 3~4일 후에 10% 가량이 분열을 하였으며, 1971년 실험에서는 plating efficiency가 50% 이상이었음을 보고하였다. ***Euphorbia tirucalli***의 원형질체는 배양 3일 후에 첫 분열을 하였으며(Ohyama *et al.*, 1984), ***Phaseolus aureus***의 뿌리 원형질체는 배양 2일째에 분열을 시작하였다(Xu *et al.*, 1981). 상기의 보고들로 보아, 원형질체는 배양 2~4일 이내

에 칫 분열을 시작하는 것으로 간주된다. 또한 일부 세포는 돌기를 형성한 후 세포질이 이동하여 2개의 세포로 나뉘어지는데 돌기를 형성하는 분열양상은 大豆(Kao *et al.*, 1970), 강남콩(Kim *et al.*, 1983) 및 담배의 엽육조직 원형질체(Meyer and Abel, 1975)의 분열과정에서도 보고된 바 있다.

배양 후 8일째에 분열세포는 4細胞期에 도달했으며 細胞塊는 2주 후부터 형성되기 시작하였다. 본 실험에서는 細胞塊가 완전히 형성될 때까지 약 4주 동안은 sorbitol을 그대로 유지한 채 새로운 배지를 첨가해주었으며 이렇게 형성된 colony를 sorbitol이 제거된 칼루스 유도배지에 계대배양하여 칼루스의 형성을 얻었는 바, 이 결과는 일반적으로 원형질체를 배양하는 과정에서 대부분의 경우 배양이 진행됨에 따라 osmolarity를 낮추어주는 것이 원형질체의 분열을 촉진시킨다는 보고(Kao *et al.*, 1970)와는 차이가 있었다. 따라서 원형질체를 배양하는 동안 osmolarity를 낮추어야 할 필요성은 절대적인 것은 아니라고 사료된다. 그러나 분열에 의해 세포수가 증가되기 때문에 새로운 배지를 첨가해 주는 조건이 절대적임을 강조한 보고(Kao *et al.*, 1971)와는 일치하는 결과라 할 수 있겠다.

이상의 고찰에서 원형질체의 분열양상은 거의 비슷하게 진행되는 반면에 원형질체의 배양조건은 種마다, 그리고 또한 같은 種내에서도 品種에 따라 각기 다르다는 사실을 알 수 있다. 원형질체를 배양하는 면에서 중요하게 대두되는 점은 배양배지인데, 이것 또한 아주 다양하여 단순한 구성성분으로만 되어있는 배지에서부터 여러가지 성분들이 복합된 배지가 사용된다. 後者에 속하는 Kao(1977)의 원형질체 배양배지가 가장 적합하다고 하나 본 실험에서는 칼루스 유도시와 거의 비슷한 배지를 사용하여 원형질체로부터 칼루스를 얻을 수 있었다(Fig. 4).

大豆의 현탁배양된 세포, 꼬투리 세포, 뿌리 그리고 자엽으로부터 분리된 원형질체와 함께 칼루스 조직으로부터 수 많은 원형질체의 효율적인 분리는 *Glycine*屬 내에서의 체세포잡종 형성 연구에는 물론, 大豆와 콩科식물, 大豆와 非콩科식물 사이의 원형질체 융합 실험(Kao *et al.*, 1974)을 포함한 조직배양의 진보에 기여할 수 있게 되는데, 특히 원형질체의 배양으로부터 형성된 칼루스나 식물체의 경우는 단일 세포의 근원을 갖게 되기 때문에 cell line을 선택함에 있어서 유리하게 된다. 그러나 현재까지 콩科에 속하는 작물, 특히 大豆는 식물체로의 완전한 재분화가 용이하지 않으므로 앞으로 더욱 많은 연구가 수행되어야 할 것이다.

摘 要

大豆[*Glycine max* (L.) Merr. cv. Jangyeop]의 下胚軸 組織을 10 μM α-naphthaleneacetic acid (NAA)와 32 μM N^6-benzylaminopurine (BAP)을 첨가한 MS배지에서 16일간 배양한 칼루스로부터 원형질체의 분리 및 배양을 시도하였다. 3.5% cellulase와 1.5% macerozyme, 10% sorbitol의 酵素溶液으로 6시간 진탕시켰을 때 칼루스 조직 1 g당 5.3×10^5개의 원형질체가 분리되어 높은 분리 효율을 나타내었다. 상기 배지에서 원형질체를 배양한 지 24시간이 지나면서 세포벽이 재생되기 시작하였으며, 3일 후에는 세포가 분열하였다. 배양 2주 후에는 細胞塊를 형성하였으며, 그 이후 agar 배지에 계대배양한 결과 칼루스의 형성이 이룩되었다.

參 考 文 獻

Chia, H.-C., S.-H. Cho and K.-W. Lee. 1982. Incorporation of tobacco chloroplasts into soybean pro-

toplasts. *Korean J. Bot.* 25: 181-188.

Cheng, T., H. Saka and T.H. Voqui-Dinh. 1980. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture. *Plant Sci. Lett.* 19: 91-99.

Christianson, M.L., D.A. Warnick and P.S. Carlson. 1983. A morphogenetically competent soybean suspension culture. *Science* 222: 632-634.

Cocking, E.C. 1960. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature* 187: 927-929.

Constabel, F., J.W. Kirkpatrick and O.L. Gamborg. 1973. Callus formation from mesophyll protoplasts of *Pisum sativum* L. *Can. J. Bot.* 51: 2105-2106.

Davey, M.R. and E.C. Cocking. 1972. Uptake of bacteria by isolated higher plant protoplasts. *Nature* 239: 455-456.

Finer, J.J. and R.H. Smith. 1982. Isolation and culture of protoplasts from cotton(*Gossypium klotzschianum* Anderss.) callus cultures. *Plant Sci. Lett.* 26: 147-151.

Gamborg, O.L., K.N. Kao, R.A. Miller, L.C. Fowke and F. Constabel. 1973. Cell regeneration, division and plant development from protoplasts (I). *Colloq. Inter. C. N. R. S.* 212: 155-173.

Gresshoff, P.M. 1980. *In vitro* culture of white clover: Callus, suspension, protoplast culture, and plant regeneration. *Bot. Gaz.* 141: 157-164.

Grout, B.W.W. 1975. Cellulose microfibrils deposition at the plasmalemma surface of regenerating tobacco mesophyll protoplasts: A deep etch study. *Planta* 123: 275-282.

Johnson, L.B., D.L. Stuteville, R.K. Higgins and D.Z. Skinner. 1981. Regeneration of alfalfa plants from protoplasts of selected Regen S clones. *Plant Sci. Lett.* 20: 297-304.

Kameya, T. and J. Widholm. 1981. Plant regeneration from hypocotyl sections of *Glycine* species. *Plant Sci. Lett.* 21: 289-294.

Kao, K.N. 1977. Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean-*Nicotiana glauca*. *Mol. Gen. Genet.* 150: 225-230.

Kao, K.N., F. Constabel, M.R. Michayluk and O.L. Gamborg. 1974. Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells. *Planta* 120: 215-227.

Kao, K.N., O.L. Gamborg, R.A. Miller and W.A. Keller. 1971. Cell divisions in cells regenerated from protoplasts of soybean and *Haplopappus gracilis*. *Nature New Biol.* 232: 124.

Kao, K.N. and M.R. Michayluk. 1980. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. *Z. Pflanzenphysiol.* 96: 135-141.

Kao, K.N., W.A. Keller and R.A. Miller 1970. Cell division in newly formed cells from protoplasts of soybean. *Exp. Cell Res.* 62: 338-340.

Kim, J.C. 1984. Somatic hybrids by protoplast fusion between *Nicotiana tabacum* and *N. sylvestris*. Ph. D. thesis, Seoul National University, Seoul. 116 pp.

Kim, S.-G., J.-H. Song and K.-W. Lee. 1982. Hormonal effect and cytokinin autonomy in callus culture of *Phaseolus vulgaris* L. *Korean J. Bot.* 25: 161-168.

Kim, S.-G., J.-C. Woo and K.-W. Lee. 1983. Isolation and culture of *Phaseolus vulgaris* L. callus protoplasts. *Korean J. Bot.* 26: 191-196.

Lee, K.-W. and C.-K. Min. 1981. Cell wall regeneration of pea mesophyll protoplasts. *Korean J. Bot.* 24: 73-86.

Lee, K.-W., S.-H. Cho and H.-C. Cha. 1980. The isolation and fusion of pea and barley mesophyll

protoplasts. *Korean J. Bot.* **23**: 49-54.

Lu, D.Y., S. Cooper-Bland, D. Pental, E.C. Cocking and M.R. Davey. 1983. Isolation and sustained division of protoplasts from cotyledons of seedlings and immature seeds of *Glycine max* L. *Z. Pflanzenphysiol.* **111**: 389-394.

Meyer, Y. and W.O. Abel. 1975. Budding and cleavage division of tobacco mesophyll protoplasts in relation to pseudo-wall and wall formation. *Planta* **125**: 1-13.

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

Ohyama, K., N. Misawa, Y. Yamano and T. Komano. 1984. Protoplast isolation from *Euphorbia tirucalli* L. cell suspension cultures and sustained cell division. *Z. Pflanzenphysiol.* **113**: 367-370.

Oswald, T.H., A.E. Smith and D.V. Phillips. 1977. Callus and plantlet regeneration from cell cultures of ladino clover and soybean. *Physiol. Plant.* **39**: 129-134.

Pelcher, L.E., O.L. Gamborg and K.N. Kao. 1974. Bean mesophyll protoplasts: Production, culture and callus formation. *Plant Sci. Lett.* **3**: 107-111.

Saka, H., T.H. Voqui-Dinh and T.Y. Cheng. 1980. Stimulation of multiple shoot formation on soybean stem nodes in culture. *Plant Sci. Lett.* **19**: 193-201.

Schwenk, F.W., C.A. Pearson and M.R. Roth. 1981. Soybean mesophyll protoplasts. *Plant Sci. Lett.* **23**: 153-155.

Uchimiya, H. and T. Murashige. 1974. Evaluation of parameters in the isolation of viable protoplasts from cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* **54**: 936-944.

Vasil, I.K. and K.L. Giles. 1975. Induced transfer of higher plant chloroplasts into fungal protoplasts. *Science* **190**: 680.

Xu, Z.-H., M.R. Davey and E.C. Cocking. 1981. Isolation and sustained division of *Phaseolus aureus*(mung bean) root protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol.* **104**: 289-298.

Xu, Z.-H., M.R. Davey and E.C. Cocking. 1982. Callus formation from root protoplasts of *Glycine max* (soybean). *Plant Sci. Lett.* **24**: 111-115.

Zieg, R.G. and D.E. Outka. 1980. The isolation, cuture and callus formation of soybean pod protoplasts. *Plant Sci. Lett.* **18**: 105-114.

(1985. 4. 18. 接受)