

電氣場下에서의 담배 및 완두 原形質體 融合

徐挺宇·李光雄

(서울대학교 自然科學大學 植物學科)

Electrofusion of Tobacco and Pea Protoplasts

Suh, Jung-Woo and Kwang-Woong Lee

(Department of Botany, Seoul National University, Seoul)

ABSTRACT

Intra- and inter-specific protoplast fusions of tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Virginia 115) and pea (*Pisum sativum* cv. Sparkle) were carried out in highly inhomogeneous alternating electric fields. Under the electric field of alternating current (AC, sine wave), 600 V/cm and 800 kHz for tobacco protoplasts, and 600 V/cm and 700 kHz for pea protoplasts, the protoplasts were aggregated in *pearl chains*. Intra-specific protoplast fusions were most effectively induced within the aggregates of tobacco and pea, respectively, by the additional application of a single high field pulse of direct current (DC, square wave) at 1 kV/cm for 50 μ s. Inter-specific fusions between protoplasts of the two plants were most effectively induced in the electric field of 600 V/cm and 700 kHz, and square wave pulse at 1 kV/cm for 50 μ s. The duration of the field pulse over the electrical breakdown voltages was simulated from 1 to 100 μ s in both tobacco and pea protoplasts. The yield of the electrofusion products was significantly high (above 60%), compared with that (20%) of the standard fusion method by polyethylene glycol (PEG) 4,000, and the viability of electrofused protoplasts was above 70%, but that of PEG-fused protoplasts 8~16%, when determined by Evan's blue staining method.

緒 論

植物細胞의 遺傳學的 分析과 體細胞의 交雜體 生成을 위하여 效果的이고 再生能力이 있는 細胞融合體의 획득 技法에 關하여 重點의인 연구가 進행되어 왔는 바, 지금까지 非活性 Sendai virus (Toister and Loyter, 1973)를 이용하거나, polyethylene glycol(PEG)을 사용하였고(Keller and Melchers, 1973; Kao and Michayluk, 1974; Kao *et al.*, 1974), 칼슘이온 또는 polyvinyl alcohol(PVA)(Zakai *et al.*, 1977; Volsky and Loyter, 1978)의 사용과 그 외에도 電氣衝擊(Gimmer *et al.*, 1977; Senda *et al.*, 1979)에 의한 세포융합 방법도 시도되어 왔다. 특히 최근에는 1980年代 初 U. Zimmermann을 중심으로 몇몇 연구자들에 의해

본 연구는 1984년도 農林부 기초과학육성 연구비의 지원에 의한 것임.

시작된, 세포막의 전기적 파괴(breakdown)에 의한 새로운 융합기법이 대두되었다(Zimmermann *et al.*, 1981 a, b; Zimmermann and Scheurich, 1981). 식물세포 융합에서는 귀리 (*Avena sativa*) 原形質體에서 처음 이루어진 이 새로운 技法이 기존의 방법에 비하여 細胞의 生理的 상태, 融合率 등, 여러 면에서 보다 效果的인 것으로 밝혀졌다(Zimmermann *et al.*, 1982; Bates *et al.*, 1983). 이로부터 電氣場下에서 막의 breakdown에 의한 세포융합 방법은 식물세포에서 뿐만 아니라 동물세포, 세균의 원형질체 등, 다양한 종류의 세포들에서 활발히 이용되고 있다(Pilwat *et al.*, 1981; Benz and Zimmermann, 1981 a, b; Vienken and Zimmermann, 1982; Bates *et al.*, 1983; Halfmann *et al.*, 1983; Zachrisson and Bornman, 1984; Bates, 1985).

Dielectrophoresis 현상을 이용한 이 융합방법은 高周波의 sine wave(AC)와 square wave (DC) pulse의 특성을 이용한 것인 바, 세포막의 side chain에 존재하는 陰電荷가 갖는 ζ -potential이 교류 전기장에서 resonance現象으로 제거되고, 이에 따라 中性粒子化한 세포들이 전기장하에서 雙極性을 띠고 전기장의 세기 차이에 따라 전기장의 密度가 높은 곳으로 이동하여 나열되는데, 이러한 dielectrophoresis에 의하여 일단 세포들이 전기장을 따라 나열된 후에, 高電壓의 square wave를 짧은 시간 동안 주면 세포막의 breakdown이 誘導된다. 이 때 전기장하에서 세포막이 접하고 있는 부분은 protein-free area가 되며, 이곳에서 breakdown이 일어나고, 이어서 세포막의 재유착과정에 의해 두 원형질체간에 융합이 이루어진다. 이러한 세포융합에 있어서 전기적 조건들은 세포의 크기, 밀도와 세포막을 이루는 脂質 및 蛋白質의 構成에 따라 달라지며 융합 chamber의 구조적 조건에 따라서는 달라지는 것으로 알려졌다(Zimmermann *et al.*, 1982; Zimmermann and Vienken, 1982; Bates *et al.*, 1983; Vienken *et al.*, 1983; Verhoek-Köhler *et al.*, 1983; Bates, 1985). 이상의 전기장하에서의 세포 융합 방법은 융합유도물질(fusogen)을 넣지 않고 이루어지며, 실내 온도하에서 가능하고, pH를 비롯한 세포의 생리적 조건들을 적정 상태로 유지할 수 있으며, 현미경으로 융합과정을 관찰할 수 있고, 또 높은 融合率과 生存力(viability)을 갖는다는 利點이 있다.

본 연구에서는 전기장하에서의 원형질체 융합방법을 雙子葉植物인 담배 및 완두에서 시도하였는 바, 單子葉植物에 비해서 electrofusion이 어려운 것으로 알려져 있으나, 組織培養에 있어 매우 유용하고도 중요한 재료인 담배의 葉肉細胞 및 칼루스, 그리고 완두의 엽육 세포를 사용하여 이들 원형질체의 효과적인 융합을 이루기 위한 電氣場 形成의 전기적 조건들과 breakdown時에 필요한 square wave pulse의 세기와 시간과의 관계 등을 규명함과 아울러 PEG를 사용한 융합시의 융합률 및 生存力을 조사하여 electrofusion에 의한 원형질체 융합시의 결과와 대조, 그 효율성을 비교하고자 하였다.

材料 및 方法

植物材料 및 試藥. 담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Virginia 115)는 온도 24~28°C, 照度 2,000~5,000 lux, 그리고 낮 16시간·밤 8시간의 日長條件下에서 8~12週 生育시켜 얻은 성숙한 잎을 재료로 사용하였다. 담배 칼루스는 위의 조건에서 생육시킨 성숙한 잎을 재료로 MS배지(Murashige and Skoog, 1962)로부터 유도시킨 후, 1 mg/l α -NAA (α -naphtha-

Table 1. Composition of enzyme solutions for the protoplast isolation of tobacco and pea

Ingredients	Concentration for protoplast isolation		
	Tobacco mesophyll	Pea mesophyll	Tobacco callus
Macerozyme (Onozuka R-10)	0.6%	—	1.0%
Cellulase (Onozuka R-10)	0.6%	0.6%	2.0%
Hemicellulase (Sigma)	—	0.3%	—
Pectinase (Sigma)	—	0.3%	—
Sorbitol	0.5 M	0.5 M	0.5 M
Calcium chloride	0.1%	0.1%	0.1%
MES ^a	2.0 mM	2.0 mM	2.0 mM
pH	5.8	5.8	5.8

MES^a; 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid.

leneacetic acid), 0.1 mg/l kinetin의 호르몬 조건으로 27°C, 暗所에서 10일씩 繼代培養하며 재료로 사용하였다. 완두(*Pisum sativum* cv. Sparkle)는 담배와 마찬가지로 온도 24~28°C, 조도 2,000~5,000 lux, 낮 16시간, 밤 8시간의 일장조건하에서 3~4주 기른 식물체의 성숙한 잎을 재료로 사용하였다.

原形質體의 分離. 담배 엽육세포의 원형질체는 Table 1의 효소용액으로 27°C, 암소에서 4시간 진탕한 다음 100 g로 3분간 원심분리한 후, 효소 용액을 제거하고 0.5 M sorbitol 용액으로 100 g에서 3분간 원심분리하여 세척하였고, 다시 21% 설탕 용액으로 정제한 뒤, 0.5 M mannitol 용액으로 2회에 걸쳐 세척하여 획득하였다. 완두 원형질체도 Table 1의 조성으로 담배 엽육 원형질체와 같은 방법으로 분리하였다. 담배 칼루스의 원형질체는 Table 1의 용액에, 10일간 계대배양된 조직을 넣고 35 rev/min, 30°C의 항온수조에서 6시간 진탕한 후, pore 직경이 50 μm인 mesh로 細胞塊를 제거하고 100 g에서 5분간 원심분리한 다음 21% 설탕 용액으로 정제하고, 0.5 M mannitol용액으로 2회 세척하여 얻었다.

Electrode 및 電氣裝置. Slide glass 위에 유리 chamber를 설치한 후, 직경이 2 mm인, 銀으로 만든 electrode를 200 μm 간격으로 平行하게 접촉시켰다. 교류 전기장을 형성하기 위하여 standard signal generator(MSG-2301, Meguro)를 사용하였고, square wave pulse는 function generator(Type FG-315, Sugawara)를 사용하였다. 모든 signal은 oscilloscope(VP-5420B, National)로 측정하였다.

原形質體의 融合. 전기장하에서의 원형질체 융합은, electrode slide를 현미경 재물대에 놓은 후, function generator와 pulse generator를 병렬로 연결시키고 각각 10⁵ 또는 10⁶/ml인 현탁액을 chamber에 同量씩 넣고 dielectrophoresis 시킨 후 pulse를 주어 breakdown을 유도하였다. PEG를 사용한 담배 엽육조직 원형질체의 융합은, 5×10⁵/ml의 원형질체 원형질체 현탁액을 배양접시에 0.1 ml 정도 떨어뜨리고 2분간 방치한 후 PEG 4,000의 50% 용액을 주위에 천가하여 확산에 의한 융합을 유도하였다. 가장 융합률이 높았던 시간인 15분 후 배양액을 가하여 2~3회 세척한 후, hemacytometer로 측정, 융합률을 다음과 같이 계산하였다. a) 種內融合率(%)=(融合에 가담한 原形質體 數)/(融合前の 原形質體 數)×100, b)

種間融合率(%)=(融合에 가담한 原形質體 數)/(融合前 2種의 原形質體 數) \times 100.

Viability의 測定. 원형질체의 viability는 1% Evan's blue, 0.5 M sorbitol용액으로 염색한 후 Levy hemacytometer에서 백분율로 구하였다.

結 果

交流 전기장하에서의 dielectrophoresis는 담배 및 완두 모두에서 AC(sine wave) 600 V/cm, 800 kHz에서 유도되었다. 완두와 담배간의 접촉현상(Fig. 1. A)과, 10^6 /ml 농도의 담배 원형

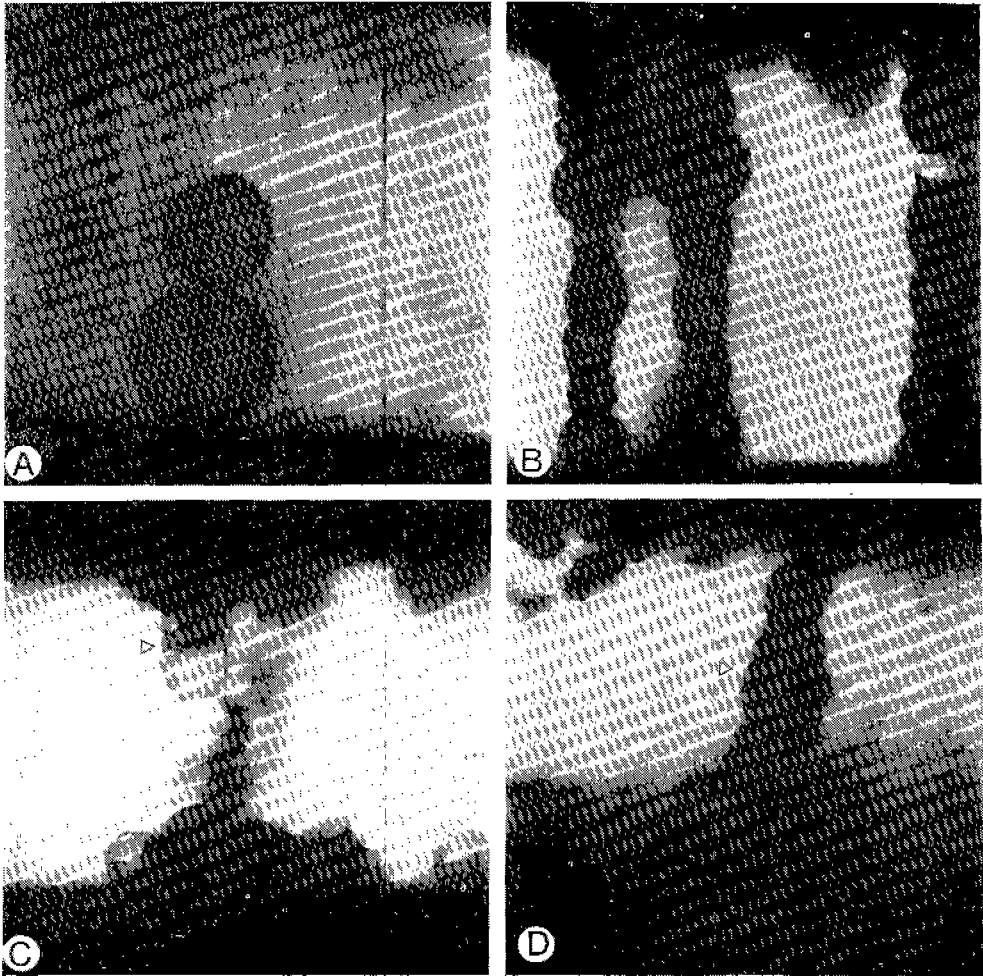


Fig. 1. A, tobacco (larger one) and pea mesophyll protoplasts contact each other by inhomogeneous high electric field. (380 \times); B, using higher suspension densities, dielectrophoresis. *chains* of tobacco protoplasts were arranged in parallel by many *pearl* (180 \times); C & D, electrofusions of protoplasts in *pearl chains* of tobacco protoplasts (180 \times).

질체 용액을 사용하였을 때 많은 *pearl chain*들의 형성을 관찰할 수 있었고(Fig. 1. B), 1, 200 V/cm의 square wave pulse를 주었을 때 *pearl chain*中的의 접촉된 원형질체간에 융합이 이루어지는 것이 관찰되었다(Fig. 1. C, D).

담배 원형질체간의 융합은 1 kV/cm의 square pulse를 주어 60분 후 완전히 이루어졌으며(Fig. 2. A, B), 완두의 경우는 1 kV/cm의 square pulse를 50 μ s동안 준 후 융합이 이루어지는 것이 관찰되었다(Fig. 2. C).

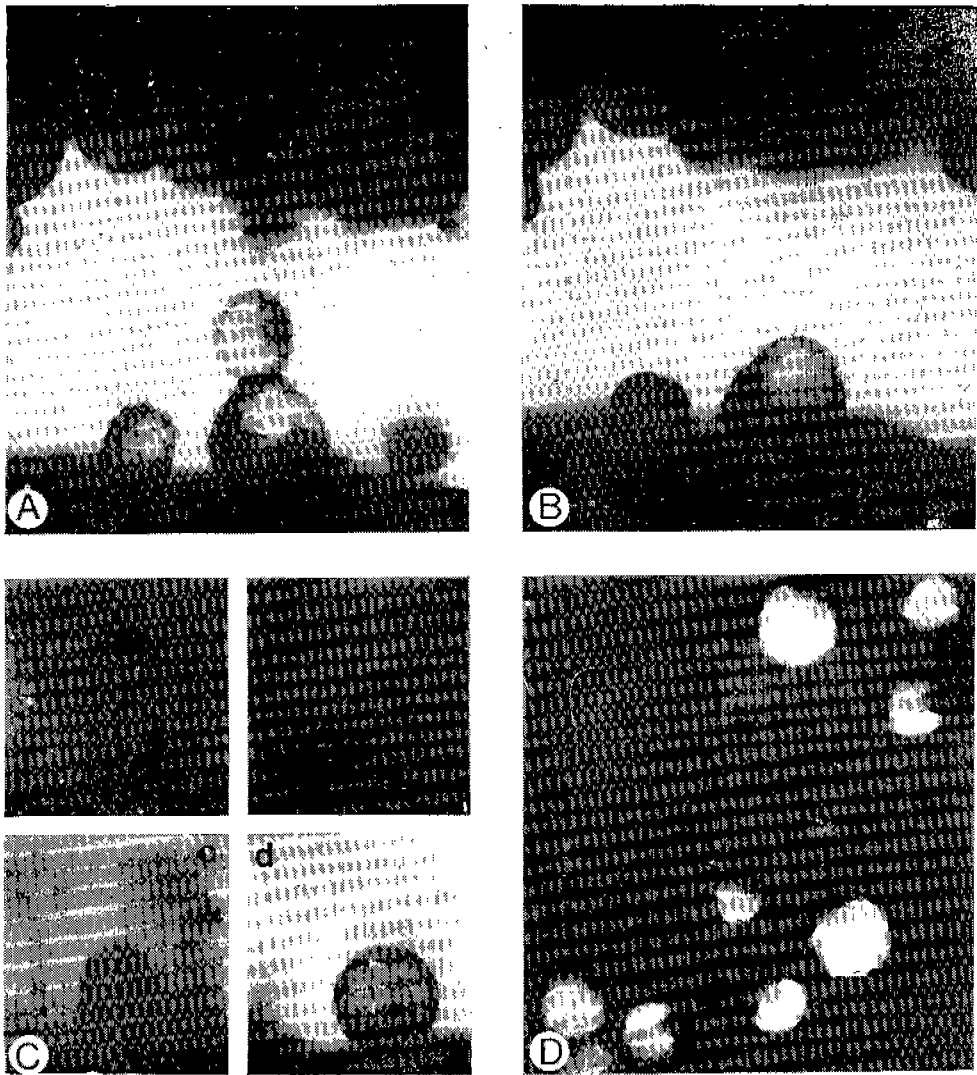


Fig. 2. A & B, induction of an electrofusion of tobacco mesophyll protoplasts. (350 \times); C, electrofusion process of pea mesophyll and tobacco mesophyll protoplasts. Micrographs were taken in time intervals of 0 (a), 10 (b), 15 (c), and 30 min (d) after field pulse application. (240 \times); D, viable tobacco protoplasts were stained (white ones) by Evan's blue for viability determination (240 \times).

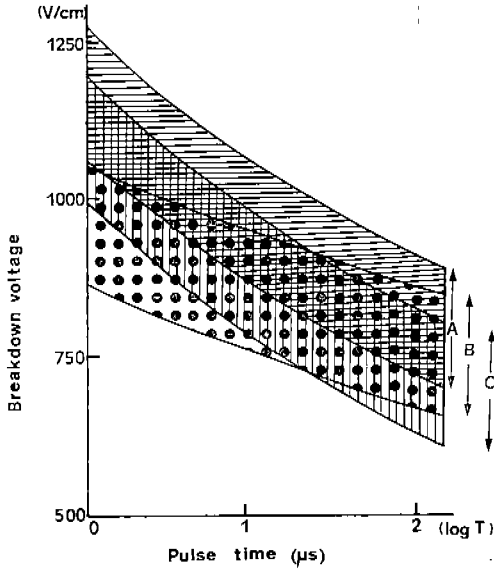


Fig. 3. Simulated breakdown voltage areas for electrofusion of protoplasts: A, tobacco callus protoplasts; B, tobacco mesophyll protoplasts; C, pea mesophyll protoplasts.

각 種의 원형질체를 융합시킬 때 필요한 square pulse의 최저 전기장의 세기와 시간과의 관계는, 담배 엽육조직 원형질체의 경우 $Y=857 \cdot \text{Exp}[-0.12x]$, $r=-0.98$ 이었고, 완두 엽육조직 원형질체의 경우에는 $Y=1068 \cdot \text{Exp}[-0.21x]$, $r=-0.98$ 이었다. 또한, 담배 칼루스의 원형질체 경우는 $Y=990 \cdot \text{Exp}[-0.23x]$, $r=-0.98$ 이었다. 이상의 최저 전압보다 200~250 V/cm 높은 값들이 최적 융합의 pulse 세기로 관찰되었다(Fig. 3). 1 kV/cm, 50 μ s의 최적 pulse를 주었을 때 중간 혹은 종내 원형질체의 융합률은, 담배 칼루스 경우의 56%로 최저를 나타냈고 나머지는 모두 60% 이상의 융합률을 보였다(Table 2).

PEG를 사용하여 담배 엽육 세포의 원형질체를 융합시켰을 경우(PEG 4,000, 50% 용액을

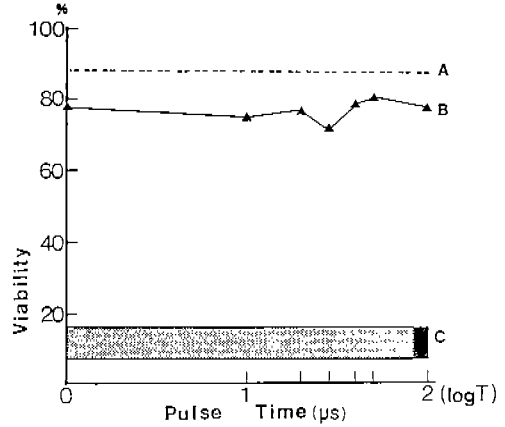


Fig. 4. Viabilities of tobacco mesophyll protoplasts determined by Evan's blue staining method. A, protoplasts before fusion; B, products after electrofusion as a function of pulse time duration; C, products after PEG-fusion.

Table 2. Electrofusion rates of intra- and interspecies in tobacco and pea

Species and tissues isolated protoplasts		Fusion rate ^a (%)
Pea mesophyll	(×) Pea mesophyll	74
Tobacco mesophyll	(×) Tobacco mesophyll	65
Tobacco callus	(×) Tobacco callus	60
Pea mesophyll	(×) Tobacco mesophyll	63
Tobacco mesophyll	(×) Tobacco callus	56

Fusion rate^a; Intra-species fusion rate (%) = $2(\text{No. of fused protoplasts}) / (\text{No. of protoplasts before fusion}) \times 100$.

Inter-species fusion rate (%) = $2(\text{No. of fused protoplasts}) / (\text{No. of protoplasts of two spp. before fusion}) \times 100$.

15분 처리)에는 20%로서 최고의 융합률을 보였다. 이 결과를 Table 2의 electrofusion에 의한 융합률과 비교할 때, 담배 엽육세포 원형질체의 경우는 65%로서 PEG에 의한 융합률보다 현저히 높은 것을 알 수 있다.

담배 엽육조직의 원형질체를 electrofusion 방법과 PEG 처리방법으로 자기 융합시켰을 때 viability는, PEG 처리구가 8~16%인데 비하여 electrofusion 방법을 사용했을 때는 모두 70% 이상을 보였으며 이 때 정제된 원형질체의 viability(Fig. 2, D)는 88%로 나타났다(Fig. 4).

考 察

담배 엽육조직으로부터 분리한 원형질체의 융합은 AC(sine wave) 600 V/cm, 800 kHz에서 50 μ s, 1 kV/cm의 square pulse를 주었을 때 최고의 융합률을 보였고, 완두 원형질체의 융합시에는 AC(sine wave) 600 V/cm, 700 kHz에서 50 μ s, 1 kV/cm의 square pulse를 주었을 때 최고의 융합률을 보였다. 이러한 square pulse의 전압과 시간에 대한 연구는 꾸준히 계속되어지고 있는데, 세포막을 구성하고 있는 지질과 단백질의 조성 및 세포벽의 제거상태에 의해 영향을 받는 것으로 알려졌다(Benz and Zimmermann, 1980, 1981a, b; Abidor *et al.*, 1982; Dimitrov, 1984). Electrofusion시의 실험 조건중 실내 온도가 중요한 요인의 하나인데, 온도가 낮을 경우에 세포막의 resealing process가 저해되기 때문인 것으로 보고된 바 있으며(Zimmermann *et al.*, 1981b, 1982; Benz and Zimmermann, 1981a), 실제로 10°C 이하 각한 영향을 주었다. 세포막의 resealing process는 2°C와 20°C 사이에서 10배 이상의 차이인 경우 융합률에 심플 보인다고 보고된 바 있다(Zimmermann and Vienken, 1982). Dielectrophoresis시 사용되는 용액은 10⁴ Ω 이상으로 저항이 큰 물질을 사용해야 하고, 특히 전해질이 적을수록 양호한데 1 mM KCl로도 심각한 영향을 준 사례도 있었다(Bates *et al.*, 1983). 실제 용액으로는 sorbitol과 mannitol이 사용될 수 있으나, 전기 저항이 높은 mannitol이 보다 효과적임이 밝혀졌다.

교류의 주파수가 낮은 경우는 원형질체들의 회전현상이 관찰되었는데, 이는 resonance현상이 충분히 일어나지 못해서 이들의 중성 입자화가 이루어지지 않은 결과이다(Zimmermann *et al.*, 1981b; Arnold and Zimmermann, 1982). 교류 전기장에서 원형질체가 적렬한 상태로 있을 경우, 과전압이 걸리면 세포막이 깨어져 내용물이 나오는 현상이 관찰되었는데, 1 kHz의 고주파에서 전압을 상승시키면 엽록체단 방출되어 나오는 현상이 일어났다. 이러한 현상을 이용하여 엽록체 분리 실험의 가능성이 보고된 바도 있다(Zimmermann *et al.*, 1982). Breakdown을 일으키는 square pulse의 전압과 시간과의 함수관계는, 시간축을 對數로 했을 때 exponential curve로 simulation한 결과 98% 이상의 근사율을 보여주었다. 이것은 인공의 이중지질막과 단세포藻類를 재료로 한 실험과 같은 양상을 보여주는 것이며(Benz and Zimmermann, 1980, 1981b; Zimmermann *et al.*, 1981a; Dimitrov, 1984), 지질막의 특성에 따른 數値의 해석에서도 exponential한 式이 유도된다는 결과도 보고된 바 있다(Jeltsch and Zimmermann, 1979).

Electrofusion에 의한 원형질체 융합의 방법이 PEG를 사용한 융합방법에 비해서 매우 효과적인 것으로 나타났다. 즉, 담배 엽육조직에서 분리한 원형질체의 경우, 융합률은 3

배 이상, viability는 최고 8배 정도 electrofusion이 有利한 것으로 나타났다. Zimmermann 등을 비롯한 다른 연구자들에 의한 실험에서는 90% 이상의 융합률을 보인 경우도 있으며, 생리적 조건도 PEG를 처리한 경우보다 electrofusion이 매우 효과적인 상태에서 진행될 수 있다고 알려졌다(Scheurich and Zimmermann, 1981; Zimmermann and Vienken, 1982; Halfmann *et al.*, 1983).

본 연구에서는 담배 및 완두 원형질체의 electrofusion을 유도하는 조건들을 구하고, 그 양상을 조사함으로써 이러한 전기장하에서의 융합방법이 기존의 방법인 PEG를 사용하는 것보다 융합률과 viability에 있어서 매우 효과적이라는 것을 알았다. 앞으로 이러한 전기장하에서의 원형질체 융합기법은, 대규모로 연속적인 융합을 실시할 수 있는 조건의 구명, 전기조건의 변화에 의한 세포내소기관의 분리방법, 또한 electrofusion에 의한 융합 산물의 배양연구 등이 본 연구의 다음 단계로 이어져야 할 것이다. Electrofusion에 의하여 획득된 *Nicotiana plumbaginifolia*와 *N. tabacum* 'Xanthi'의 원형질체 융합산물의 배양으로써 전기장하에서의 융합이 植物體의 재분화에 매우 有利하다는 사실이 최근에 보고된 바 있다 (Bates and Hasenkampf, 1985).

摘 要

Electrofusion技法에 의하여 담배(*Nicotiana tabacum* cv. Virginia 115)와 완두(*Pisum sativum* cv. Sparkle)의 種內 및 種間 原形質體 融合을 實施하였다. 담배 및 완두 原形質體의 最適 osmoticum(0.5 M)에서, 電氣場下에서의 융합조건으로, 담배 種內 原形質體 融合의 경우 AC(sine wave) 600 V/cm와 周波數 800 kHz에서 dielectrophoresis가 일어나 *pearl chain*이 형성된 후 1 kV/cm의 DC (square wave) pulse를 50 μ s 동안 加함으로써 效率的인 융합이 이루어졌다. 이 때 60% 이상의 融合率을 보였는 바, 이는 polyethylene glycol (PEG) 4,000 처리시 최적 조건이었던 50%에서 15分間 처리하여 얻은 20%의 융합률에 비하여 매우 높은 것이었다. 완두 種內 融合의 경우에는 600 V/cm, 700 kHz에서 dielectrophoresis가 관찰되었고 담배의 경우와 같이 1 kV/cm의 square wave pulse와 50 μ s로서 效果的인 electrofusion을 이루었다. 담배 및 완두의 種間 原形質體 융합은 600 V/cm, 700 kHz에서 *pearl chain*을 형성하고, square wave pulse 1 kV/cm로 50 μ s에서 융합체를 형성시켰다. 담배 및 완두 원형질체의 효과적인 전기장하 융합을 위한 square wave pulse의 세기와 시간과의 관계를 1 μ s에서 100 μ s까지 구하였다. Evan's blue 염색법으로 viability를 측정된 결과 전기장하에서 얻어진 담배 융합체의 경우는 70% 이상의 生存率을 나타냄으로써 PEG 처리시에 보인 8~16%보다 매우 높았다. 이르게 electrofusion技法은 담배 및 완두 원형질체의 융합에 효율적일 뿐만 아니라, 다른 여러 종류의 식물 원형질체 융합시에도 매우 유용할 것으로 思料된다.

參 考 文 獻

- Abidor, I.G., L.V. Chernomordik, S.I. Sukharev and Yu.A. Chizmadzhev. 1982. The reversible electrical breakdown of bilayer lipid membranes modified by uranyl ions. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 9: 141-148.
- Arnold, W.M. and U. Zimmermann. 1982. Rotation of an isolated cell in a rotating electric field. *Naturwissenschaften* 69: 297-298.

- Bates, G.W. 1985. Electrical fusion for optimal formation of protoplast heterokaryons in *Nicotiana glauca*. *Planta* 165: 217-224.
- Bates, G.W., J.J. Gaynor and N.S. Shekhawat. 1983. Fusion of plant protoplasts by electric fields. *Plant Physiol.* 72: 1110-1113.
- Bates, G.W. and C.A. Hasenkampf. 1985. Culture of plant somatic hybrids following electrical fusion. *Theor. Appl. Genet.* 70: 227-233.
- Benz, R. and U. Zimmermann. 1980. Pulse-length dependence of the electrical breakdown in lipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 597: 637-642.
- Benz, R. and U. Zimmermann. 1981a. The resealing process of lipid bilayers after reversible electrical breakdown. *Biochim. Biophys. Acta* 640: 169-178.
- Benz, R. and U. Zimmermann. 1981b. High electric field effects on the cell membranes of *Halocystis parvula*. A charge pulse study. *Planta* 152: 314-318.
- Dimitrov, D.S. 1984. Electric field-induced breakdown of lipid bilayers and cell membranes: a thin viscoelastic film model. *J. Membrane Biol.* 78: 53-60.
- Finaz, C., A. Lefevre and J. Teissié. 1984. Electrofusion. A new, highly efficient technique for generating somatic cell hybrids. *Exp. Cell Res.* 150: 477-482.
- Gimmer, H., R. Schirling and U. Tobler. 1977. Cation permeability of the plasmalemma of the halotolerant alga *Dunaliella parva*. *Z. Pflanzenphysiol.* 83: 145-148.
- Halfmann, H.-J., C.C. Emeis and U. Zimmermann. 1983. Electro-fusion of yeast protoplasts. In *Protoplasts 1983*, Poster proceedings. I. Potrykus, C.T. Harms, A. Hinnen, R. Hutter, P.J. King, R.D. Shillito eds., Birkhäuser Verlag, Basel. pp.290-291.
- Jeltsch, E. and U. Zimmermann. 1979. Particles in a homogeneous electrical fields: a model for the electrical breakdown of living cells in a coulter counter. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 6: 349-384.
- 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. 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.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 431-497.
- Pilwat, G., H.-P. Richter and U. Zimmermann. 1981. Giant culture cells by electric field-induced fusion. *FEBS Lett.* 133: 169-174.
- Scheurich, P. and U. Zimmermann. 1981. Electrically stimulated fusion of different plant cell protoplasts. *Plant Physiol.* 67: 849-853.
- Senda, M., J. Takeda, S. Abe and T. Nakamura. 1979. Induction of cell fusion of plant protoplasts by electrical stimulation. *Plant & Cell Physiol.* 20: 1441-1443.
- Toister, Z. and A. Loyer. 1973. The mechanism of cell fusion. II. *J. Biol. Chem.* 248: 422-432.
- Verhoek-Köhler, B., R. Hampp, H. Ziegler and U. Zimmermann. 1983. Electro-fusion of mesophyll protoplasts of *Avena sativa*. *Planta* 158: 199-204.
- Vienken, J., R. Ganser, R. Hampp and U. Zimmermann. 1981. Electric field-induced fusion of isolated vacuoles and protoplasts of different developmental and metabolic provenience. *Physiol.*

- Plant.* 53: 64-70.
- Vienken, J. and U. Zimmermann. 1982. Electric field-induced fusion: electrohydraulic procedure for production of heterokaryon cells in high yield. *FEBS Lett.* 137: 11-13.
- Vienken, J., U. Zimmermann, R. Ganser and R. Hampp. 1983. Vesicle formation during electrofusion of mesophyll protoplasts of *Kalanchoë daigremontiana*. *Planta* 157: 331-335.
- Volsky, D.J. and A. Loyter. 1978. Role of Ca^{2+} in virus-induced membrane fusion. *J. Cell Biol.* 78: 465-479.
- Yamada, Y., Y. Hara, H. Katagi and M. Senda. 1980. Protoplast fusion: effect of low temperature on the membrane fluidity of cultured cells. *Plant Physiol.* 65: 1099-1102.
- Zachrisson, A. and C.H. Bornman. 1984. Application of electric field fusion in plant tissue culture. *Physiol. Plant.* 61: 314-320.
- Zakai, N., G. Kulka and A. Loyter. 1977. Membrane ultrastructural changes during calcium phosphate induced fusion of human erythrocyte ghosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 2417-2421.
- Zimmermann, U., G. Küppers and N. Salhani. 1982. Electric field-induced release of chloroplasts from plant protoplasts. *Naturwissenschaften* 69: 451-452.
- Zimmermann, U., 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. and P. Scheurich. 1981. High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. *Planta* 151: 26-32.
- Zimmermann, U. and J. Vienken. 1982. Electric field-induced cell-to-cell fusion. *J. Membrane Biol.* 67: 165-182.
- Zimmermann, U., J. Vienken and G. Pilwat. 1981b. Rotation of cells in an alternating electric field: the occurrence of a resonance frequency. *Z. Naturforsch.* 36: 173-177.

(1986. 1. 18. 接受)