

煙草 原形質體의 生存率과 細胞壁 再生에 미치는 植物生長調節物質의 效果

金 溶 玉 · 崔 光 泰* · 金 南 源* · 李 浩 俊
(建國大學校 理科大學 生物學科, 韓國人參煙草研究所*)

Effects of Phytohormones on the Viability and Cell Wall Regeneration of Tobacco Protoplasts

Kim, Yong-Ok, *Kwang-Tae Choi, Nam-Won Kim and Ho-Joon Lee
(Department of Biology, Kunkuk University, Seoul and *Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon)

ABSTRACT

In order to clarify effects of phytohormones on the viability and the cell wall regeneration of protoplasts isolated from *Nicotiana tabacum* L. var. BY4, protoplasts isolated from mesophyll tissue were cultured on the Murashige-Skoog liquid media supplemented with auxin (2, 4-D, NAA, IAA) and/or cytokinin (kinetin, BAP, 2ip). Viability of protoplasts was higher in the culture medium containing auxin and cytokinin, especially in the combination of 2, 4-D and BAP. The effectual cell wall regeneration of protoplasts was observed when the protoplasts were cultured on the medium supplemented with auxin alone, especially with IAA. Cell wall regeneration started from 2-3 days after culture and was not detected at budding regions. When the protoplasts were cultured on the phytohormone-free medium, the viability of protoplasts dramatically decreased 4 days after culture.

緒 論

原形質體의 裸出率과 生存率은 植物의 生理的인 狀態에 따라 크게 차이가 있으며 (Shepard and Totten, 1977), 이들은 또한 原形質體의 培養 및 融合에 막대한 영향을 미친다 (Larkin, 1976). 그리고 裸出 原形質體는 培養中 細胞壁이 再生되어 正常細胞의 形態로 갖추어 지는데 (Pojnar *et al.*, 1967), 이 細胞壁 再生能은 裸出 原形質體의 安定性を 결정하는 중요한 要因 (Schilde-Rentschler, 1977)으로서, 이는 原形質膜의 表面狀態 (Ruestink, 1973; Willion, 1976), 植物生長調節物質의 種類 (Baker and Ray, 1965)에 따라 變化하며, 특히 植物生長調節物質은 細胞分裂에 필수불가결한 것 (Cocking, 1972; Meyer and Cooke, 1979)으로 밝혀졌다. 一般적으로 裸出된 原形質體의 cell cycle을 誘導하는 主要物質로서 植物生長調節物質을 들 수 있는데 (Meyer and Cooke, 1979; Meyer *et al.*, 1984), 原形質體 培養時 添加되는 植物生長調節物質의 要求度는 植物의 種에 따라 자기 다르며, auxin類와 cytokinin類 사이에도 많은 差異가 있다 (Nagata and Takebe, 1970; Sink and Power, 1977; Scott *et al.*, 1978).

原形質體 培養 時 原形質體의 生存率 및 細胞壁 再生能에 미치는 植物生長調節物質의 影響을 究明하기 위하여 auxin과 cytokinin을 單用 혹은 混用하여 裸出 原形質體를 培養하였던 바 그 結果를 이에 報告한다.

材料 및 方法

實驗材料. *Nicotiana tabacum* L. var. Bright Yellow4의 幼苗를 溫度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 濕度 70%로 유지되는 恒溫室에서 8~12주 동안 栽培하여 완전히 展開된 中葉을 材料로 使用하였다.

原形質體의 裸出. 煙草의 中葉을 70% ethylalcohol에 6~8초간 沈漬한 후 1% sodium hypochlorite 溶液에서 15分間 表面殺菌하여 滅菌水로 4회 水洗하였다. 葉肉 部位을 넓이 0.5~1mm로 잘게 자른 뒤 0.7M mannitol이 添加된 洗滌液(CPW: cell and protoplast washing solution, 0.2mM KH_2PO_4 , 1mM KNO_3 , 1mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $1 \mu\text{M}$ KI, $0.1 \mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 및 1mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)에 1時間동안 沈漬하였다. 그 후 原形質體 裸出을 위하여 cellulase(Onozuka R-10) 1%와 Macerozyme(Onozuka R-10)0.1% 溶液 20ml 넣어 28°C 暗條件下에서 35rpm으로 18時間 진탕한 후 $35 \mu\text{m}$ course sieve로 debris를 除去하였으며, 裸出된 原形質體는 CPW 13M로 3회 水洗($100 \times \text{g}$, 5分間)한 후 0.6M sucrose를 添加한 CPW溶液(CPW21S)으로 $150 \times \text{g}$ 에서 15分間 遠心分離하여 原形質體를 精製하였다(Uchimiya and Murashige, 1974; Sink and Niedz, 1982).

原形質體의 培養. 精製된 原形質體를 植物生長調節物質이 添加되지 않은 液體培地(MS basal salts + 13% mannitol + 3% sucrose, pH5.8)를 使用하여 $100 \times \text{g}$ 에서 5分間 遠心分離시킨 후 MS 培地에 auxin으로는 2,4-D, NAA, IAA를 各各 3mg/1 씩, cytokinin으로는 kinetin, BAP, 2ip(IPA)를 各各 1mg/1 씩을 單用, 혹은 混用한 培養基에 5×10^4 protoplasts/ml로 稀釋하여 plastic petridish($60 \times 15\text{mm}$)에 3방울씩 떨어뜨려 10개의 group을 만들어 光度 800Lux, 25°C 에서 培養하였다.

原形質體의 生存率 및 細胞壁 再生 調查. 原形質體의 生存率은 FDA(fluorescein diacetate) 5mg을 acetone 1ml에 녹인 溶液을 CPW 13M를 이용하여 0.01%로 稀釋한 다음 分離된 原形質體에 떨어뜨려 5分후에 haemocytometer(American Optical, U.S.A)를 使用하여 螢光현미경(blue light) 下에서 觀察하였으며(Evans and Bravo, 1983), 生存率은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{生存率} = \frac{\text{螢光을 발한 原形質體의 數}}{\text{全體 原形質體의 數}} \times 100$$

原形質體의 細胞壁 再生能은 1% Calcofluor White ST(American Cynamid Co.)를 8% mannitol로 稀釋하여 haemocytometer로 螢光현미경 下의 ultraviolet light에서 調查하였으며(Evans and Bravo, 1983; Uchimiya and Murashige, 1976), 細胞壁 再生能은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{細胞壁再生} = \frac{\text{細胞壁이 螢光을 발한 數}}{\text{全體 原形質體의 數}} \times 100$$

結果 및 考察

煙草의 葉肉組織을 酵素溶液으로 處理하여 얻은 裸出 原形質體(Fig. 1)의 生死與否를 判別하기 위하여 FDA를 處理하였던 바 培養初期에는 80%이상이 螢光을 발하여 살아있는 原形質體로 判明되었으며(Fig. 2), 培養시간이 지남에 따라 生存率이 떨어지는 傾向을 보였다. 또한 培養 原形質體의 細胞壁 再生정도를 알아보기 위하여 Calcofluor White ST로 染色하여 觀察한 結果, 裸出직후에는 細胞壁의 再生이 觀察되지 않았고, 培養 2일후부터 螢光을 발하는 것으로 보아 細胞壁이 서서히 再生되기 시작하였으며, 培養 1주일 후에는 原形質體 모양이 球形에서 卵形으로 形態가 바뀌지기 시작하였으며, 이들 中 70% 이상이 螢光을 발하는 것으로 보아 細胞壁이 再生되고 있음을 알 수 있었다(Fig. 3). 培養 5일 후에는 細胞壁이 완전히 再生되지 않은 狀態에서 budding이 되었으며, 이들 中 대부분은 螢光을 발하였으나 budding부분(<표로 標示된 부분)은 螢光을 발하지 않았는데(Fig. 4B), 이런 點으로 보아 돌기가 形成된 부분은 아직 細胞壁이 再生되지 않았음을 알 수 있었다. 本 實驗에서 培養중인 原形質體는 一般的으로 培養 2일(Fig. 5A)부터 細胞壁이 再生되었고 培養 7일경(Fig. 5B)부터 돌기와 隔膜이 나타나면서 細胞分裂양상이 觀察되었으며, 培養 21일경(Fig. 5C)에는 旺盛한 細胞分裂로 인하여 colony가 形成되었다. 그러나 植物生長調節物質이 添加되지 않은 培地에서는 細胞分裂도 없었고 1주일 후에는 모두 死滅하였다.

裸出 原形質體의 細胞壁 再生能은 一般的으로 植物의 種에 따라 差異가 심하게 나타난다. *Marchantia polymorpha* L. 原形質體(Mori *et al.*, 1983)의 경우를 보면, 培養 24시간 후에 80%의 細胞壁이 再生되었고 48시간 후에는 95% 細胞壁이 再生되었으며, 완두 原形質體(Constable, 1974)의 경우에는 細胞壁 再生이 培養 2~3일내에 시작되었고 최대로 80%가 再生되었으며 煙草 原形質體 培養(Uchimiya and Murashige, 1976)에서는 88%의 細胞壁 再生率이 報告된 바 있는데 本 實驗에서도 90%이상의 比較的 높은 比率로 細胞壁이 再生되었다. 細胞壁 再生 機作을 보면 micro fibril이 처음 한번에 再生되는 것이 아니라 짧은 polymer로 再生된 다음 이것이 連結되어 細胞壁이 되며(Rruetstink, 1973; Asamizu *et al.*, 1967), 原形質體의 細胞壁이 불완전하게 形成되면 cytokinesis("Yeast-like" budding)와 같은 특별한 形態를 나타내는데(Bawa and Torrey, 1971), 이 cytokinesis는 cytoplasm이 細胞의 內部 壓力으로 밀려나와 母細胞와 돌기 사이에 유지되어진 細胞質의 連結에 의하여 膨脹되어진 것이다. 本 實驗에서 原形質體가

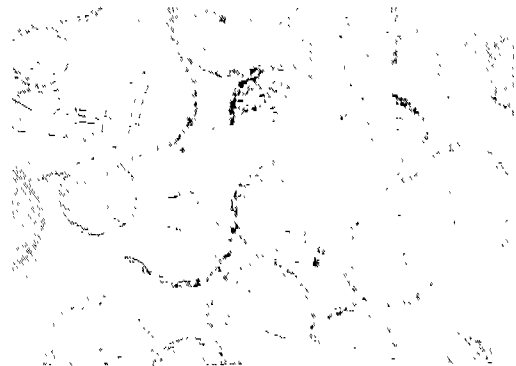


Fig. 1. Protoplasts isolated from the mesophyll tissue of *Nicotiana tabacum* var. BY4.

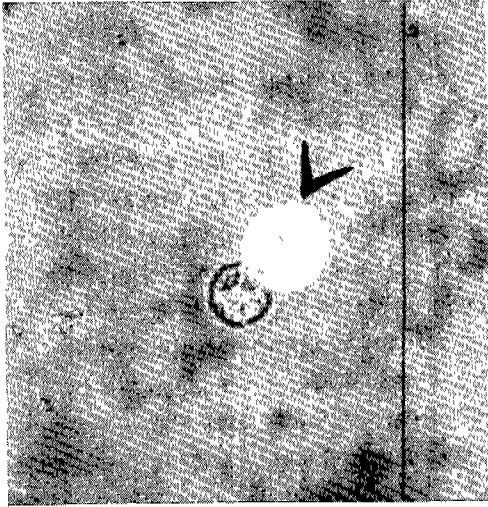


Fig. 2. Two protoplasts treated with fluorescent diacetate. Arrow shows fluorescence of viable protoplast.

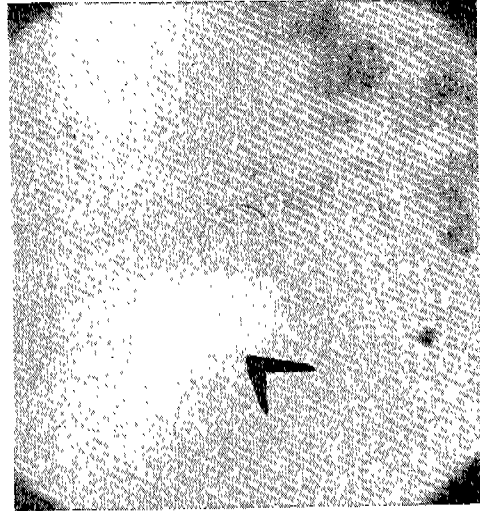


Fig. 3. Protoplasts with or without cell wall regenerated. Arrow shows fluorescence of regenerated cell wall of protoplast treated with Calcofluor White ST.

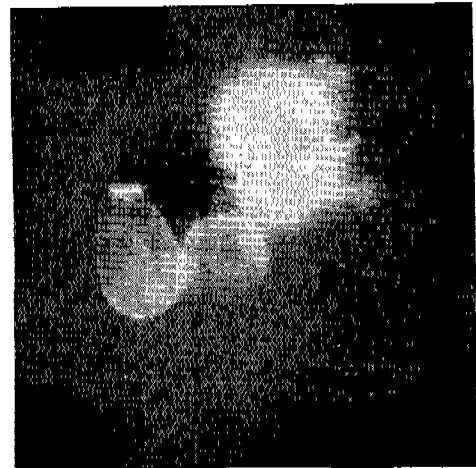
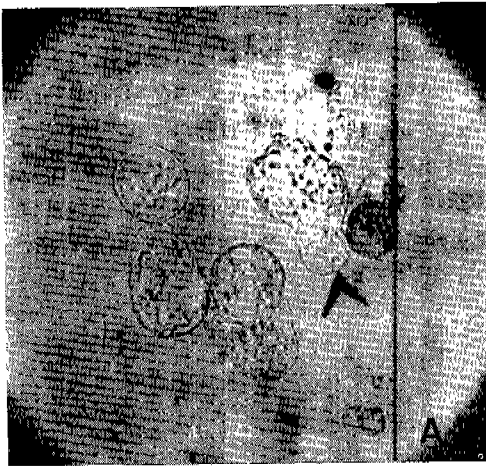


Fig. 4. Division and budding of protoplasts observed under light (A) or fluorescence (B) microscope after 5 days of culture.

A. Budding regions (arrow) was impossible to recognize whether cell wall was regenerated or not under light microscope.

B. Under the fluorescence microscope budding regions (arrow) was not observed.

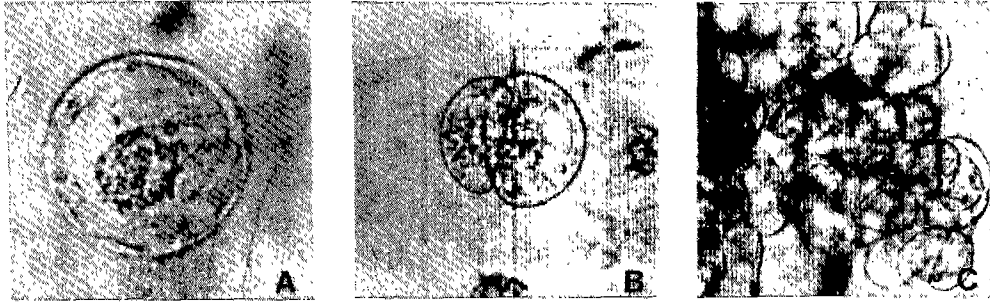


Fig. 5. Cell colony formation from tobacco mesophyll protoplast.

- A. Cell wall regenerated protoplast (2 days after culture).
 B. Unequarional division of cell (7 days after culture).
 C. Cell colony formed 21 days after culture.

球形인 것은 細胞壁이 再生되어 螢光을 발하는 반면에 Fig. 4에서와 같이 돌기가 形成된 部位는 螢光을 발하지 않은 것으로 보아 細胞壁이 再生되지 않았음을 알 수 있었다. 이와같은 現象에 관하여 Fowke and Gamborg(1980)은 細胞壁이 불완전하게 再生되어 pectin物質이 細胞壁內에 結合되지 않음으로 發生된다고 하였으며 Hankc와 Northcote(1974)는 새로 形成된 細胞壁의 약한 部位에서 細胞質이 밀려나와 形成된다고 하였는데 本實驗의 budding現象은 細胞分裂이 아닌 細胞壁 再生時 polymcr의 連結이 약한 部位로 細胞質이 밀려나와 돌기가 形成된 것으로 생각 되어진다.

原形質體의 生存率에 대한 植物生長調節物質의 效果를 구명하기 위하여 auxin과 cytokinin을 單用 혹은 混用 處理하여 生存率을 調査하였던 바 그 結果는 Figs. 6-10과 같다.

Auxin種類別 單獨效果를 보면 2,4-D 또는 IAA를 添加한 培地는 培養 4일까지 原形質體의 높은 生存率이 유지되다가 그 이후 급격히 떨어졌고 NAA를 添加한 培地에서는 培養 10일까지 50% 이상의 生存率을 나타내었다(Fig. 6). 또한 cytokinin種類別 單獨效果를 보면 kinetin과 2ip를 添加한 培地는 培養 初期부터 原形質體의 生存率이 급격히 떨어졌으나, BAP添加培地에는 약간 減少하였을 뿐 生存率의 甚한 減少는 보이지 않았는데(Fig. 7), 이는 Meyer와 Murashige의 報告와 같이 cytokinin處理보다 無處理區가, 無處理區의 培養보다 auxin의 單獨處理가 原形質體 培養에 적당하다는 것을 暗示해주고 있는 것이다. Melchers와 Labib(1974), Meyer와 Cooke(1979)는 auxin 또는 cytokinin만을 添加한 培地에서 培養 4일 이후 生存率이 급격히 떨어진 것은 培地내에 有毒한 抑制物質이 蓄積되어 細胞가 死滅하거나 破裂되는 것으로 報告하고 있다. auxin과 cytokinin을 함께 添加한 培地에서 培養한 原形質體의 生存率을 보면 cytokinin種類別로 NAA와 混用하였을 경우에는 培養日數가 경과함에 따라 生存率이 減少하는 傾向이었으며, 2ip와 BAP添加培地에서 生存率이 높았고(Fig. 8), cytokinin과 IAA를 混用處理한 경우에는 2ip가 높은 生存率을 보였으며(Fig. 9), 2,4-D와 cytokinin을 混用한 경우에는 cytokinin의 種類에 相關없이 培養日數가 경과하여도 生存率의 減少는 보이지 않은 채 90% 이상의 높은 生存率을 보였다(Fig. 10).

原形質體의 細胞壁 再生에 대한 auxin의 效果를 보면 3mg/l 석의 auxin을 添加한 培地는 原

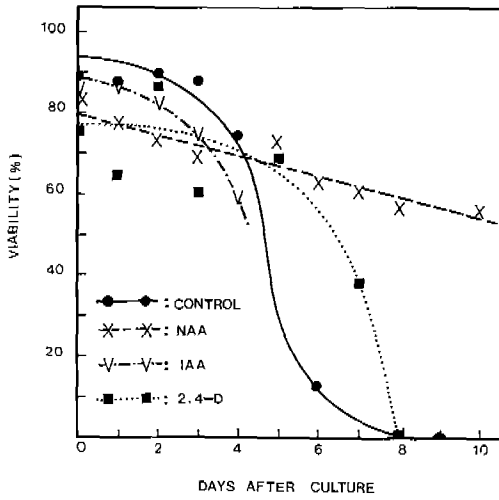


Fig. 6. Effects of auxins on the viability of protoplasts cultured on the cytokinin free media. Each concentration of auxin is 3 mg/l.

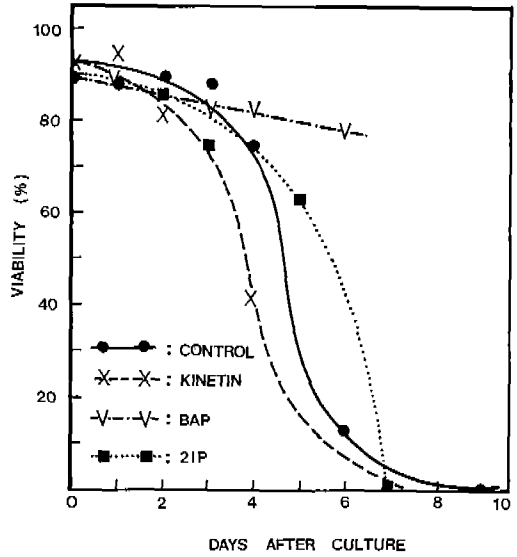


Fig. 7. Effects of cytokinins on the viability of protoplasts cultured on the auxin free media. Each concentration of cytokinins is 1 mg/l.

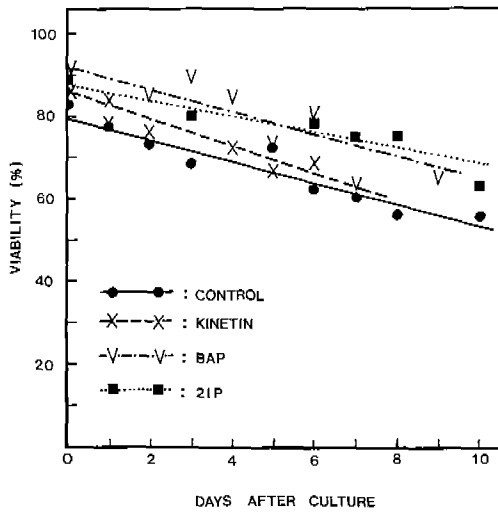


Fig. 8. Effects of cytokinins on the viability of protoplasts cultured on the media with 3 mg/l NAA. Each concentration of cytokinin is 1 mg/l.

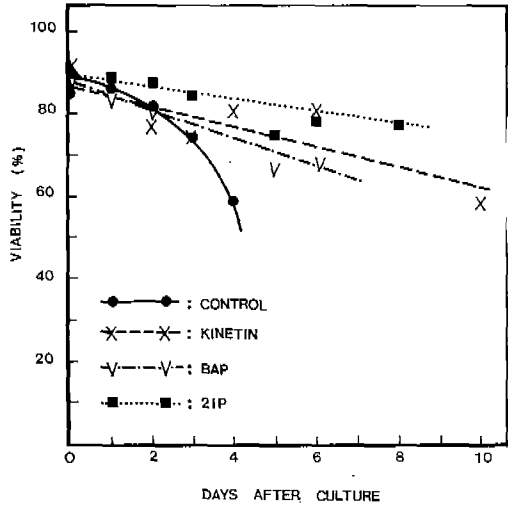


Fig. 9. Effects of cytokinins on the viability of protoplasts cultured on the media with 3 mg/l IAA. Each concentration of cytokinin is 1 mg/l.

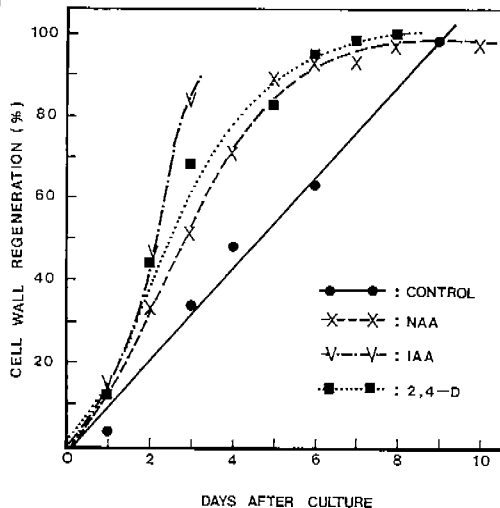
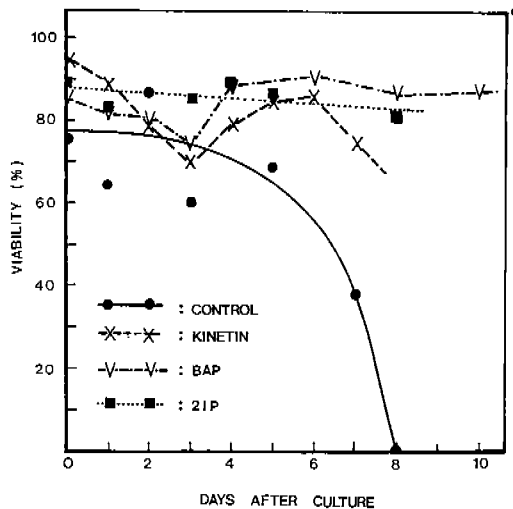


Fig. 10. Effects of cytokinins on the viability of protoplasts cultured on the media with 3 mg/l 2,4-D. Each concentration of cytokinin is 1 mg/l.

Fig. 11. Effects of auxins on the cell wall regeneration of protoplasts cultured on the cytokinin free media. Each concentration of auxin is 3 mg/l.

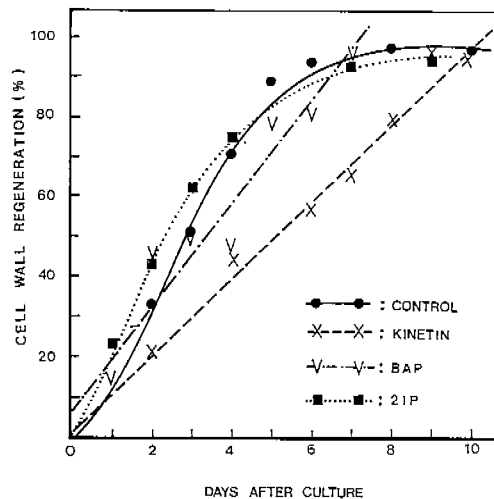
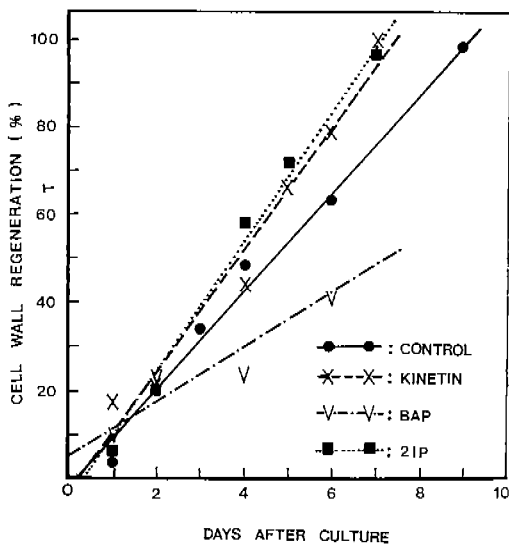


Fig. 12. Effects of cytokinins on the cell wall regeneration of protoplasts cultured on the auxin free media. Each concentration of cytokinin is 1 mg/l.

Fig. 13. Effects of cytokinins on the cell wall regeneration of protoplasts cultured on the media with 3 mg/l NAA. Each concentration of cytokinin is 1 mg/l.

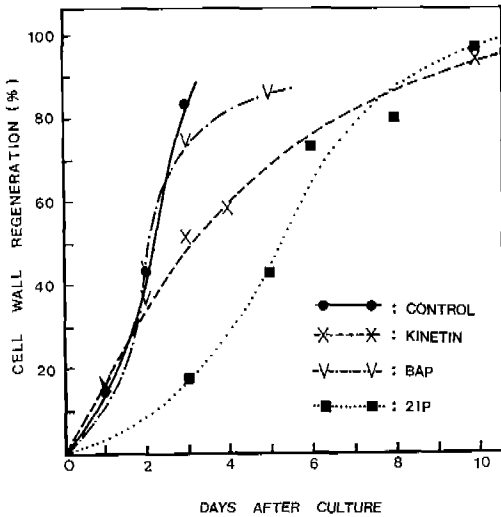


Fig. 14. Effects of cytokinins on the cell wall regeneration of protoplasts cultured on the media with 3 mg/l IAA. Each concentration of cytokinin is 1 mg/l.

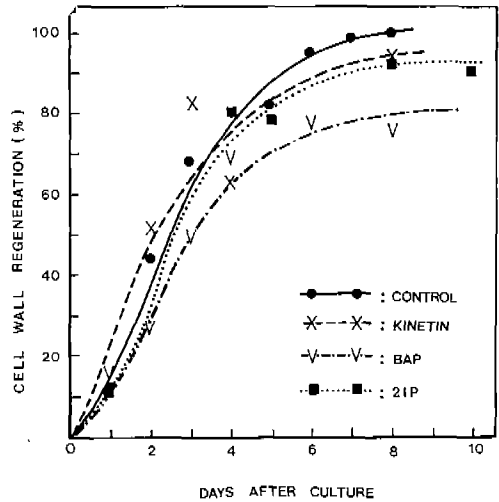


Fig. 15. Effects of cytokinins on the cell wall regeneration of protoplasts cultured on the media with 3 mg/l 2,4-D. Each concentration of cytokinin is 1 mg/l.

形質體의 細胞壁再生이 無添加區보다 빨랐고 IAA 添加培地가 NAA와 2,4-D 培養 6일 후에는 거의 100%의 再生率을 보였다(Fig. 11). 한편 細胞壁 再生에 대한 cytokinin의 單獨效果를 보면 無處理區는 培養 9일 후에 細胞壁이 100% 再生된 반면에 kinetin과 2ip를 各各 添加한 培地에는 無處理區보다 2일정도 빠른 培養 7일 후에 細胞壁이 100% 再生되었고 BAP를 添加한 培地는 無處理區와 기타 다른 cytokinin보다 그 效果가 훨씬 떨어져 培養 6일 후에도 40%정도 밖에 細胞壁이 再生되지 않았다(Fig. 12). Cytokinin을 auxin과 함께 添加한 培養基에서 培養한 原形質體의 細胞壁 再生을 보면, 一般的으로 auxin의 單用培地보다 細胞壁이 약간 늦게 再生되는 傾向이었으며, cytokinin을 IAA와 함께 添加한 培養基에서는 kinetin 添加區에서, NAA와 混用한 培養基에서는 2ip 添加區에서, 그리고 2,4-D와 混用한 培養基에서는 BAP 添加區에서 細胞壁 再生率이 비교적 낮은 傾向을 보였다(Figs. 13-15). 그러나 BAP處理의 경우는 NAA, IAA 및 2,4-D와 混用하였을때 BAP單用處理보다 細胞壁 再生率이 增加하는 傾向을 보여 auxin과 混用함으로써 BAP의 效果가 增加됨을 알 수 있었다. Meyer *et al.* (1984)은 auxin이 細胞壁 再生과 cell cycle에 필요하며 細胞壁 再生이 dichlorobenzonitrile에 의해 妨害될 때도 auxin(2,4-D)의 존재는 細胞壁을 再生한다고 하였으며, Horine과 Ruestink(1972)도 auxin은 細胞壁 再生에 影響이 있으나 cytokinin은 細胞壁 再生을 促進도 抑制도 하지않는다고 하였는 바 本 實驗에서도 이와같은 傾向을 보였다. 또한 原形質體 培養 初期에 auxin만 添加할 경우 細胞壁 再生은 가능하나 有糸分裂이 일어나지 않으며 高濃度의 auxin으로도 cytokinin을 대신할 수 없고(Meyer and Cooke, 1979), cytokinin만 添加할 경우는 無處理區보다 有毒하며, 시간이 흐름에도 불구하고 G₁ phase만 유지하는 것이 報告되고 있다(Meyer *et al.*, 1984). 細胞分裂에 있어서 auxin은 培養初期에, cytokinin은 培養後期에 필요하다고 하였으나(Jouanneau

and Tandcau de Marsae 1973; Mcyer and Cooke, 1979; Cooke and Meyer, 1981; Meyer *et al.*, 1984), 生存率을 유지하는데 培養後期에는 cytokinin이 有毒하고(Fig. 7) 細胞分裂에 필수적인 細胞壁 再生은 auxin과 cytokinin의 混用이 效果的(Figs. 13~15)이었으므로 煙草 原形質體 培養 時에는 培養初期에 auxin을 單用한 培養基에서 培養한 후 4일 경부터는 auxin과 cytokinin이 混用된 培養基로 옮겨서 培養하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

摘 要

煙草(*Nicotiana tabacum* L. var BY4) 葉肉組織으로부터 標出し킨 原形質體의 生存率 및 細胞壁 再生率과 細胞分裂에 미치는 auxin과 cytokinin의 影響을 구명하기 위하여 auxin(2,4-D, NAA, IAA; 3mg/l) 및 cytokinin (Kinetin, BAP, 2ip; 1mg/l)을 單用 혹은 混用한 MS 液體培地에서 原形質體를 培養하였다.

培養 中인 auxin 單獨處理에서는 煙草 原形質體의 生存率이 NAA 添加培地에서 比較的 높았으며, cytokinin 單獨處理에서는 BAP 混加培地에서, auxin과 cytokinin 混合處理에서는 2,4-D와 BAP 混用培地에서 가장 높게 나타났다. 細胞分裂 時에 필수적인 細胞壁 再生은 細胞質이 밀려나와 形成된 budding region 에서는 形成되지 않았으며, auxin 單獨處理에서 가장 좋았고 특히 IAA 添加培地가 效果的이었다. 植物生長調節物을 添加하지 않는 培地에서의 原形質體 生存率은 培養 3일까지는 높게 유지되다가 培養 4일 후부터는 급격히 떨어진 반면 細胞壁 再生은 培養 3일 이후에 활발히 再生되었으나 전반적으로 植物生長調節物을 添加한 培地의 경우보다 不良하였다.

參 考 文 獻

- Asamizu, T., K. Tanaka, I. Takebe and A. Nishi. 1967. Change in molecular size of cellulose during regeneration of cell wall on carrot protoplasts. *Plant Physiol.* **40**: 215-218.
- Baker, D. and P.M. Ray. 1965. Direct and indirect effects of auxin on cell wall synthesis in oak coleoptile tissue. *Plant Physiol.* **40**: 345-352.
- Bawa, S.B. and J.G. Torrey. 1971. "Budding" and nuclear division in culture protoplasts of corn, convolvulus and anion. *Bot. Gaz.* **132**: 240-245.
- Cocking, E.C. 1972. Plant cell protoplasts-isolation and development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **23**: 29-50.
- Constable, F. 1974. Isolation and culture of plant protoplasts. In, *Plant Tissue Culture Method*, eds. O. L. Gamborg and L. R. Wetter, N.R.C., Ottawa, pp. 11-16.
- Cooke, R. and Y. Meyer. 1981. Hormonal contrast of tobacco protoplast nucleic acid metabolism during "in vitro" culture. *Planta* **152**: 1-7.
- Evans, D.A. and J.E. Bravo. 1983. Protoplast isolation and culture. In, *Hand Book of Plant Cell Culture*. Vol. 1, pp. 124-176.
- Fowke, L.C. and O.L. Gamborg. 1980. Applications of protoplasts to the study of plant cells. *Int. Rev. Cytol.* **68**: 9-51.
- Hanke, D.E. and D.H. Northcore. 1974. Cell wall formation by soybean callus protoplast. *J. Cell Sci.* **14**: 29-50.
- Horine, R.K. and A. W. Ruestink. 1972. Cell wall regeneration around protoplasts isolated from convolvulus tissue culture. *Plant Physiol.* **50**: 438-445.

- Jouanneau, J.P. and N. Tandeau de Marsac. 1973. Stepwise effects of cytokinin activity and DNA synthesis upon mitotic cycle events in partially synchronised tobacco cells. *Exp. Cell. Res.* **77**: 167-174.
- Larkin, P.J. 1976. Purification and viability determination of plant protoplast. *Planta* **128**: 213-16.
- Meyer, Y. and R. Cooke. 1979. Time course of hormonal control of the first mitosis in tobacco mesophyll protoplasts cultivated in vitro. *Planta* **147**: 181-85.
- Meyer, Y., L. Aspart and Y. Chartier. 1984. Auxin-induced regeneration of protein synthesis in tobacco mesophyll protoplasts cultivated in vitro. I. Characteristics of auxin-sensitive proteins. *Plant Physiol.* **75**: 1027-1033.
- Melchers, G. and G. Labib. 1974. Somatic hybridization of plants by fusion of protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* **135**: 277-294.
- Mori, K., H. Matsushima and M. Takeuchi. 1983. A study of cell wall regeneration of protoplasts in *Marchantia polymorpha*. *L. Bot. Mag.* **96**: 281-289.
- Nagata, T. and I. Takebe. 1970. Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. *Planta* **92**: 301-308.
- Pojnar, E., J.H.M. Willison and E.C. Cocking. 1967. Cell wall regeneration by isolated tobacco fruit protoplasts. *Protoplasma* **64**: 460-480.
- Ruestink, A.W. 1973. Surface membrane properties of isolated protoplasts. *Collq. Intern. Paris, C. N. R. S.* Vol. 212, pp. 41-49.
- Schilde-Rentschler, L. 1977. Role of the cell wall in the ability of tobacco protoplasts to form callus. *Planta* **135**: 177-181.
- Scott, K.J., J.C. Chin and C.J. Wood. 1978. Isolation and culture of cereal protoplast. *In*, Proceeding of Plant Tissue Culture Beijing (Peking) Symposium, pp. 293-316.
- Shepard, J.F. and R.E. Totten. 1977. Mesophyll cell protoplasts of potato, Isolation, proliferation and plant regeneration. *Plant Physiol.* **60**: 313-316.
- Sink, K.C. and R.P. Niedz. 1982. Factors controlling planting efficiency in tomato. *In*, Proc. 5th Int'l Cong. Plant Tissue and Cell Culture, pp. 583-585.
- Sink, K.C. and J.B. Power. 1977. The isolation, culture and regeneration of leaf protoplasts of *Petunia parviflora* Juss. *Plant Sci. Lett.* **10**: 335-340.
- Uchimiyama, H. and T. Murashige. 1974. Evolution of parameters in the isolation of viable protoplasts from cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* **54**: 136-144.
- Uchimiyama, H. and T. Murashige. 1976. Influence of the nutrient medium on the recovery of dividing cells from tobacco protoplasts. *Plant Physiol.* **57**: 424-429.
- Willison, J.H.M. 1976. Synthesis of cell walls by higher plant protoplasts. *In*, Microbial and Plant Protoplasts. ed. J. F. Peberdy, pp. 283-298.

(1988. 3. 7. 接受)