

*Nicotiana tabacum*과 *N. glutinosa*간 原形質體融合 植物體에 있어서 葉綠體 DNA의 制限酵素斷片의 類型

金 滙 喆·崔 成 振

(江原大學校 生物學科)

Endonuclease Restriction Patterns of Chloroplast DNA in Somatic Hybrids Obtained by Protoplast Fusion of *Nicotiana tabacum* and *N. glutinosa*

Kim, Joon-Chul and Seong-Jin Choi

(Department of Biology, Kangwon National University, Chuncheon)

ABSTRACT

Mesophyll protoplasts of *Nicotiana tabacum* (NR⁻/SR⁺) and *N. glutinosa* were electrofused with AC field of 0.5 MHz and 1 kV DC pulse for 2 ms. Fused protoplasts were selected and cultured to the green cell clusters in MSNO₃ medium containing 1.2 mg/ml streptomycin sulfate. Four plant lines regenerated from selected colonies showed both parental morphological characteristics of leaf and flower and these plant lines were confirmed as somatic hybrids based on electrophoretic patterns of leaf peroxidase. In *Xho*I restriction patterns of chloroplast DNA, these hybrid plant lines expressed both parent common restriction sites and parent specific sites. One of these hybrid lines exhibited interspecific pattern of both parental chloroplast genomes, indicating nine both parent common sites, one *N. tabacum* specific site and two *N. glutinosa* specific sites.

緒 論

식물세포의 原形質體 融合은 遠緣間의 交雜이 불가능한 식물세포에 유전정보를 導入시킬 수 있고, 새로운 종의 생성 가능성으로 관심이 높아진 가운데, 電氣의 또는 화학적인 방법을 통하여 원형질체의 융합효율을 높이고, 융합 후, 體細胞雜種 식물체의 생성을 위해 異形 融合體의 選拔에 관한 많은 연구가 진행되고 있다(Evans *et al.*, 1980; Barton and Winston, 1983; Ichikawa and Imamura, 1990).

그러나 지금까지 原形質體 融合에 의해 얻어진 체세포 잡종식물은 식물체의 再分化가 가능한 種에 局限되어 보고되고 있고, 이 융합식물체의 形質發現도 屬間 雜種에서 性的 不和合性에 기인되어 多樣하게 나타나고 種間 雜種의 경우는 꽃의 형태 등 제한된 형질에서 모식물의 중간특성을

갖고 있는 것으로 보고되어 대부분의 형질에서 일정한 경향을 보여주지 않고 있는 실정이다(Harms, 1983; Kim *et al.*, 1987).

原形質體 融合植物의 잡종여부는 잎모양, 잎자루, 꽃의 색깔과 형태 등을 모식물체들과 비교하고 세포수준에서 同位酵素 pattern과 염색체 분석을 통하여 밝힐 수 있으나 (Evans *et al.*, 1980; Chien *et al.*, 1982) 최근 융합체의 세포질 유전자를 制限酵素로 절단하여 염색체 및 미토콘드리아의 DNA 斷片을 비교함으로써, 융합체에서 세포질 유전자의 再組合 또는 淘汰過程을 구명하고자 하는 많은 연구가 진행되고 있다(Medgyesy *et al.*, 1985; Thanh *et al.*, 1988). 식물의 성적 교잡(sexual crossing)은 세포질 소기관의 雌性 遺傳(maternal inheritance)으로 인하여 遠緣間 交雜이 불가능한 식물간 세포질 소기관의 再組合를 불가능하게 하나 原形質體 融合을 통해 이러한 제한성은 극복될 수 있다.

본 論文은 1989년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

본 실험은 原形質體 融合에 의해 두 모식물체에서 유래한 염록체 유전자의 전달여부를 밝히고자, 多電極을 통한 전기적 원형질체 융합 방법을 이용하여 *N. tabacum* NR⁻/SR⁺과 *N. glutinosa*간 체세포 잡종 식물체를 생성하고 이 융합식물체의 형질발현 양상과 제한효소 절단에 의한 융합식물체의 염록체 DNA 斷片의 類型을 비교한 것이다.

材料 및 方法

原形質體 分離, 融合 및 培養. *Nicotiana tabacum* (NR⁻/SR⁺)과 *N. glutinosa*의 완전 전개된 잎에서 Kim 등 (1990)이 사용한 방법에 의해 原形質體를 분리하였다.

양쪽 모식물체의 원형질체는 融合液(2 mM CaCl₂·2H₂O, 11% mannitol, pH 5.8)으로 原形質體 농도를 1×10⁶/ml로 조절하여, Kim 등(1990)의 방법에 준하여 융합시켰다. 融合된 原形質體는 AAP1 9 M 배지에 5×10⁴/ml의 농도로 조정하여 27°C에서 2,000 lux의 연속 형광등 하에서 배양하면서 2주마다 mannitol 농도를 3%씩 감소시켰다.

體細胞 融合植物體의 選拔. 배양 4주 후 생성된 colony들은 選拔培地인 MSNO₃(Hamill *et al.*, 1983) 배지에 streptomycin 1.2 mg/ml이 첨가된 'MSNO₃+STR 배지'에 옮겨 계속 증식되는 녹색 callus를 선별하고, 1.0 mg/l의 zeatin을 포함한 MS 고체배지에 이 callus를 옮겨 shoot를 형성시켰다. 이 shoot는 30 mm 정도 되었을 때 이를 절단하여 호르몬이 첨가되지 않은 MS 배지에 옮겨 뿌리발유도하였다. 무균상태에서 배양되었던 이들은 2주간의 환경에 대한 적응과정을 통해 온실에서 3월에서 7월까지 재배되었다.

融合植物의 外部 形態, 染色體 및 同位酵素 分析.

형태적으로는 꽃의 형태와 색깔, 잎의 형태 등을 비교하였으며, 염색체는 뿌리끝을 잘라 0.05% colchicine 용액에 24 시간 전처리 후 상온에서 acetic-alcohol 용액(ethanol/acetic acid(v/v)=3)에 18시간 고정하고, 60°C에서 10분간 1N HCl로 가수분해한 후 Schiff's reagent로 염색하여 압착법으로 관찰하였다. Peroxidase 동위효소는 Kim 등 (1987)이 사용한 방법에 의해 분석하였다.

염록체 DNA의 分離.

온실로 옮겨 자란 완전히 전개된 잎에서 Saltz와 Beckman의 방법(1981)을 변형하여 염록체 DNA(cpDNA)를 추출하였다. 잎을 2-3일간 4°C 암소에서 전처리하여 당을 줄인 후 g당 4 ml의 완충용액(350 mM sorbitol, Tris-base(pH 8.0), 20 mM EDTA, 0.1% bovine serum albumin (BSA), 3 mM mercaptoethanol)을 넣고 mixer를 사용하여 분쇄한 후 4점의 거어즈와 체로 걸렀다. 이 용액은 Sorvall GSA로 1,300×g에서 8분간 원심분리하고 침전물을 위의 완충용액으로 재현탁한 후 순수한 염록체 분리를 위해 위의 완충용액으로 만든 30 : 45 : 60% sucrose 구배에 옮긴 후 Beckman 초원심분리기의

SW 25.1 rotor로 75,000×g에서 60분간 원심분리하여 30 : 45% 사이의 염록체 밴드를 위해 BSA와 mercaptoethanol이 제외된 위의 완충용액은 넣은 후 원심분리하여 모았다. 이후 염록체는 TE 완충용액(50 mM Tris, 20 mM EDTA, pH 8.0)으로 현탁한 후 이 현탁액의 1/10 해당하는 20% sarkosyl과 ml당 100 μg의 proteinase K를 넣어 실온에서 6-10 시간 배양 후 phenol 1회 phenol/chloroform(1 : 1) 2회, chloroform 1회로 추출하여 DNA를 정제하였다. 정제된 DNA액은 이 액의 1/10에 해당하는 3 M sodium acetate와 2배의 100% Et-OH를 넣어 -80°C에서 20분간 침전시킨 후 60분간 미세원심분리기로 원심분리하여 모은 후 70% Et-OH로 씻은 다음 진공건조기로 건조하여 20-100 μl의 TE 완충용액(40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)으로 녹였다.

制限酵素에 의한 cpDNA의 分析. cpDNA는 KOSCO (한국제철화학)에서 구입한 *Xho*I과 *Pst*I을 5-10 unit를 넣어 Boeshore 등(1983)의 방법에 의하여 절단하였다. Sample과 0.25% bromphenol blue를 섞어 120×140 mm 크기의 0.7% agarose gel의 홈에 넣은 후 TBE 완충용액(89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA, pH 8.3)에서 60 V로 7-10 시간 전기영동하고 절단된 斷片의 크기는 *Hind*III로 자른 λ DNA 단편을 사용하여 비교하였고, ethidium bromide로 염색하여 U.V. transilluminator에서 type 667 Polaroid film으로 사진을 찍어 분석하였다.

結果 및 考察

原形質體의 融合. 原形質體 融合은 체세포 잡종의 형성을 목표로 하는데, 동형세포 사이에 자발적으로 일어나는 경우가 보고되었으나(Kuster, 1909), 자발적인 융합이 일어날 가능성은 매우 낮기 때문에 融合誘導 物質이 사용되어 원형질체의 상호접근을 유도하여 융합시키거나 dielectrophoretical하게 交流를 통과시켜 원형질체의 열을 이르게 한 후 직류의 충격을 주어 막의 可逆的 破壞를 통하여 융합시키고 있다(Senda *et al.*, 1979; Zimmerman and Scheurich, 1981).

*N. tabacum*과 *N. glutinosa*의 염록조직에서 분리된 원형질체(Fig. 1A)는 10⁶/ml의 농도로 조정된 각 원형질체의 혼합액에 100 V/cm, 0.5 MHz의 교류장을 15분간 형성시켜 원형질체 사슬을 만들었다. 여기에 2 ms 동안 1 kV/cm의 직류전기로 충격을 주어 원형질체가 융합체를 형성하도록 하였으며, 몇분이 지난 후 이 융합체는 타원형을 이루었다(Fig. 1B, C).

體細胞 雜種의 選拔과 再分化. *N. tabacum*과 *N. glutinosa*의 잎조직에서 분리된 원형질체를 전기융합하여, 5×10⁴/ml의 밀도로 배양한 3일 후부터 細胞分裂를 시작하였으며, 배양 1개월 후 녹색의 colony들이 형성되었다. 이 colony들은 이형 융합체 뿐만 아니라 동형 융합체 및 비용



Fig. 1. Homo- or hetero-plasmically (arrows) fused protoplasts between *Nicotiana tabacum* and *N. glutinosa*. A, Parental mesophyll protoplasts; B, Initial stage of electro-fused protoplasts with 1 kV DC pulse for 2 ms; C, Sphere-shaped fused cells in a few minutes after DC pulse. Bars=20 μ m.

합체도 함께 포함하고 있으며, 이 중에서 異形 融合體만을 選拔하기 위해 'MSNO₃+STR(streptomycin, 1.2 mg/ml)'의 선별배지에 옮겨졌다. 이 선별배지에서 *N. tabacum*에서 유래된 colony들은 葉素還元 酵素의 缺乏으로 갈변하여 分열하지 못하였고, *N. glutinosa*의 엽육조직에서 분리된 원형질체에서 유래된 colony들은 노란색의 callus를 형성시켰다(Fig. 2A, B). 배양 6주 후 이 융합처리된 세포들 중 MSNO₃+STR의 선별배지에서 갈변되지 않고 계속 증식하는 녹색의 callus가 관찰되었으며(Fig. 2C, D) 이 녹색 callus는 *N. tabacum*과 *N. glutinosa*의 융합세포의 相補의 補完을 통해 nitrate reductase의 nuclear genome과 streptomycin resistance에 관여하는 세포질 유전자를 갖고 있는 것으로 추정하였다. 이와 같은 추정은 Hamill 등(1983)이 보고한 streptomycin 저항성(SR⁺)의 세포질 돌연변이인 *N. tabacum*에 질산환원효소가 결여된 *N. tabacum* nia 130을 교배하여 negative(NR⁻)와 positive(SR⁺)한 선발표지를 갖고 있는 *N. tabacum* NR⁻/SR⁺의 식물을 이용하여

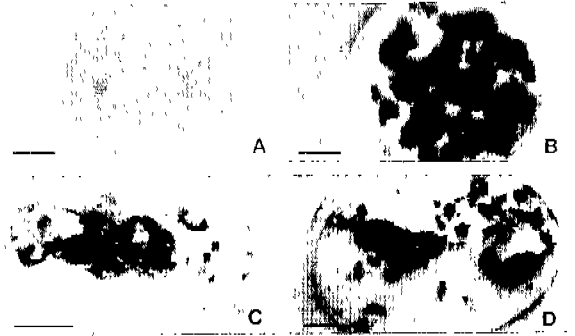


Fig. 2. Green calli derived from electrofused protoplasts and brown degenerated calli derived from non-fused protoplasts of *nicotiana tabacum* and *N. glutinosa* in MSNO₃ selection medium composed of MSNO₃ medium with 1.2 mg/ml streptomycin sulfate. A, Yellow calli of *N. glutinosa* in MSNO₃ selection medium; B, Selected green callus (arrow) and brown degenerated calli in MSNO₃ selection medium; C, and D, Selected green callus lines maintained in liquid MSNO₃ selection medium for 3 months. Bars=20 mm.

세포융합체를 선별할 수 있는 가능성에 기인하고 있다.

Fig. 2C & D의 이 녹색 callus들은 1.0 mg/l의 zeatin을 포함한 MS 고체배지에 옮겨 shoot를 형성시켰으며, 이 shoot는 호르몬이 첨가되지 않은 MS 배지에 옮겨 발근시켰다. 무균상태에서 배양되었던 이들은 2주간의 환경에 대한 적응과정을 통해 토양에 활착시켰다(Fig. 3C).

體細胞 雜種植物의 分析. *N. tabacum*과 *N. glutinosa*의 원형질체 융합을 통해 재분화된 체세포 잡종식물과 두 모식물체의 형태적인 특징 즉 꽃의 색깔, 모양, 크기, 잎의 모양, 엽병 및 엽맥의 형태들을 비교해 볼 때, *N. tabacum*의 꽃의 색깔이 분홍색이며, 꽃의 모양이 길고 *N. glutinosa*의 꽃은 연자주빛이며, 종모양으로 전체적인 꽃모양이 뚱뚱한데 비해 이들 사이의 융합체 식물계통들의 꽃의 색깔은 *N. tabacum*과 같은 분홍빛을 띠고 있고 꽃의 모양은 *N. glutinosa*의 종모양을 보여주었다. 또한 잎의 모양에 있어서는 *N. tabacum*의 잎이 길고 넓으며, 잎자루에까지 이어져 있어 짧은 엽병인데 비해 *N. glutinosa*는 잎이 작고 심장모양으로 엽병이 길다. 그러나 융합체 식물계통들은 모식물체인 *N. tabacum*과 *N. glutinosa*의 중간형태의 둥글고 긴 엽병에 엽신이 이어진 잎 모양을 갖고 있으며, 잎의 가장자리가 주글주글하고 엽맥은 *N. tabacum*을 닮았다(Fig. 3C & Fig. 4). 融合體 特性에 대한 지금까지의 연구 결과에서 꽃의 형태와 관련된 대부분의 형질이 중간형으로 나타나는 것으로 보고되었으며(Harms, 1983; Kim *et al.*, 1987) *N. tabacum*과 *N. glutinosa*간 체세포 잡종식물의 형태적 분석에서도 모식물체의 특성을 부분적으로 갖고



Fig. 3. Shoot from selected callus (A), somatic hybrid plant *in vitro* (B) and flowered whole plant (C) in pot derived from electrofused protoplasts between *Nicotiana tabacum* and *N. glutinosa*, and chromosome analysis (D) of roots in hybrid plant line, H3 ($2n=68$) between *N. tabacum*($2n=48$) and *N. glutinosa* ($2n=24$). Bars in A, B and C=20 mm, and Bar in D=10 μ m.

있고, 꽃의 크기와 잎의 형태에서 모식물체의 중간형을 보여 Kim 등(1987)의 보고와 비슷한 경향을 보였다.

융합체 식물계통의 염색체를 모식물체와 비교함으로써 잡종여부를 확인할 수 있으나 융합세포의 성적 불화합성 및 재분화 과정에서 염색체의 변이가 보고되었다(Chien *et al.*, 1982). *N. tabacum*과 *N. glutinosa*간 융합체 식물계통인 H3 계통의 염색체 분석에서도 $2n=68$ 개의 식별 가능한 염색체를 갖고 있었으며, *N. tabacum*($2n=48$)과 *N. glutinosa*($2n=24$)의 합인 72에 비해 4개의 염색체 缺失현상을 보였다(Fig. 3D).

모식물체와 체세포 잡종식물의 상호비교를 위하여 모식물체의 동위효소 유형이 상이한 효소가 이용되고 있고, 융합식물체의 동위효소는 양쪽 모식물체의 유형(banding pattern)을 합한 형태로 주로 나타나거나 일부의 band가 추가 또는 결실되는 것으로 알려졌다(Douglas *et al.*, 1981; Chien *et al.*, 1982; Kim *et al.*, 1987). Fig. 5에서와 같이

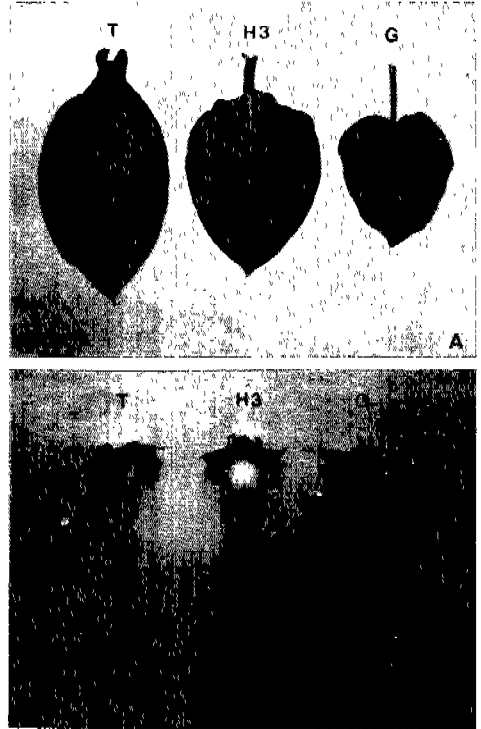


Fig. 4. Leaf shape (A) and floral morphology (B) of *N. tabacum* (T), *N. glutinosa* (G) and hybrid plant line (H3) between *N. tabacum* and *N. glutinosa*. Bars=20 mm.



Fig. 5. Electrophoretic patterns of peroxidase in the leaf of *N. tabacum* (T), *N. glutinosa* (G) and hybrid plant lines (H1, H2, H3 and H4) between *N. tabacum* and *N. glutinosa*.

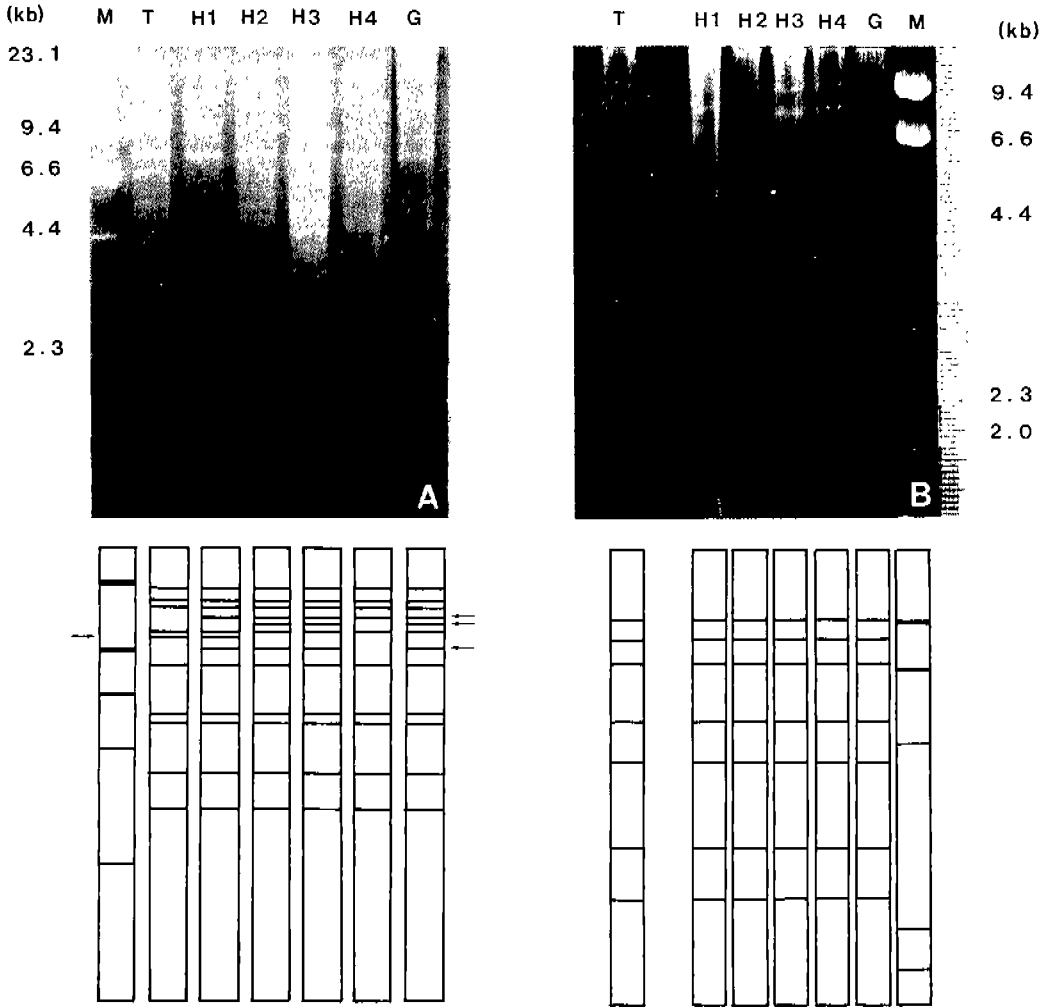


Fig. 6. *XhoI* (A) and *PstI* (B) restriction patterns of cpDNAs from *N. tabacum* (T), *N. glutinosa* (G) and hybrid plant lines (H1, H2, H3 and H4) between *N. tabacum* and *N. glutinosa*. Electrophoresis was carried out in 0.7% agarose gel at 60 V for about 7-10 h. M, markers.

일초직의 peroxidase를 분석한 결과(Fig. 5). *N. tabacum*과 *N. glutinosa*간 융합체 식물계통들(H1, H2, H3, H4)은 *N. tabacum*에서 유래된 Rf=0.20 밴드와 *N. glutinosa*의 Rf=0.27 밴드를 갖고 있어 양쪽 모식물체의 특성을 갖고 있음을 나타내고 있다.

葉綠體 DNA 分析. *XhoI*과 *PstI*의 제한효소 절단에 의한 엽록체 DNA(cpDNA) 斷片의 분석을 통하여 *N. tabacum*, *N. glutinosa*와 융합체 식물계통들인 H1, H2, H3 및 H4를 비교 분석한 결과 *XhoI*의 제한효소로 cpDNA를 절단하였을 때 융합체 식물계통들은 Fig. 6A와 같이 각각 相異한 유형의 단편을 나타냈다. 이 H1, H2, H3 및 H4의 융합체 식물계통들은 *N. tabacum*과 *N. glutinosa*에서 공

통되는 9개의 단편들을 보였으며, H1 계통은 *N. tabacum*의 1개 단편(12.5 kb)과 *N. glutinosa*의 2개 단편(16.5 kb, 9.4 kb), H2와 H3 계통은 *N. glutinosa*의 3개 단편(16.5 kb, 15.5 kb, 9.4 kb), H4 계통은 *N. glutinosa*의 1개 단편(16.5 kb)이 모식물체의 9개 공통단편에 추가되는 類型을 갖고 있었다. 이와 같은 *XhoI*에 의한 cpDNA 분석을 통해 H1 계통의 엽록체 게놈 조성은 *N. tabacum*과 *N. glutinosa*의 엽록체 게놈이 모두 포함되어 있는 특성을 보여주고 있고, H2, H3 및 H4 계통의 엽록체 게놈 조성은 *N. glutinosa*의 엽록체 게놈과 일치되고 있다는 것을 알 수 있다. 제한효소 *PstI*의 단편들에서는 Fig. 6B에서처럼 모두 같은 類型이었으며, 이는 *N. tabacum*과 *N. debneyi*의 융합체에서도 동

일한 類型的 단편이 나타났다는 결과와 일치하였다(Asahi *et al.*, 1988). 융합체의 cpDNA에 대한 대다수의 연구결과에서 융합 후 혼합된 엽록체의 cpDNA는 무작위적인 분리가 일어난다고 알려졌으나(Aviv *et al.*, 1980; Pelletier *et al.*, 1983; Belliard *et al.*, 1987), Medgyesy 등(1985)은 *N. tabacum*과 *N. plumbaginifolia*의 융합체에서 모식물체의 cpDNA 단편과 위치가 相異한 새로운 단편이 나타나고 융합체가 모식물체의 모든 단편들을 소유하지 않아 mitochondrial DNA처럼 재조합이 일어난다는 보고도 하였다. 본 실험에서도 *N. tabacum*과 *N. glutinosa*의 원형질체를 융합시켜 생성된 융합체들은 두 모식물체에서 나타나지 않은 새로운 단편을 찾을 수는 없었으나, *Xho*I의 제한효소 절단에서 두 모식물체의 단편들이 융합체 식물들에서 혼재되어 나타나고 있어 융합체 식물계통 H1은 양쪽 모식물체의 엽록체 유전자 특성을 갖고 있는 융합체임을 확인할 수 있었다.

摘 要

Nicotiana tabacum(NR⁻/SR⁺)과 *N. glutinosa*간 전기적(0.5 MHz의 AC와 2 ms 동안 1 kV DC) 원형질체 융합에서 선발은 1.2 mg/ml의 streptomycin이 첨가된 MSNO₃ 배지를 통하여 가능하였으며, 이 융합세포의 분열이 지속되어 형성된 녹색 세포괴를 얻었다. 이 녹색 세포괴에서 재분화된 4개의 식물 계통들은 꽃과 잎에서 모식물체의 특징을 보였으며, 엽조직의 peroxidase 동위효소 유형 분석에서도 양쪽 모식물체의 특성을 갖고 있었다.

*Xho*I의 제한효소 절단에 의한 융합식물체 계통의 엽록체 DNA의 분석에서도 융합체 식물계통들은 *N. tabacum*과 *N. glutinosa*에서 공통되는 단편과 모식물체 유래 단편을 보였고, 이 융합식물계통들 중 한 계통은 9개의 공통 단편에 *N. tabacum*의 1개 단편, *N. glutinosa*의 2개 단편이 추가되어 있는 類型을 보여 *N. tabacum*과 *N. glutinosa*의 엽록체 계통을 모두 소유하고 있다는 것을 보여주었다.

參 考 文 獻

- Asahi, T., T. Kumashiro and T. Kubo. 1988. Constitution of mitochondrial and chloroplast genomes in male sterile tobacco obtained by protoplast fusion of *Nicotiana tabacum* and *N. debneyi*. *Plant Cell Physiol.* **29**: 43-49.
- Aviv, D., R. Fluhr, M. Edelman and E. Galun. 1980. Progeny analysis of the interspecific somatic hybrids: *Nicotiana tabacum* (CMS)+*N. sylvestris* with respect to nuclear and chloroplast markers. *Theor. Appl. Genet.* **56**: 145-150.
- Barton, K.A. and J.B. Winston. 1983. Prospects in plant genetic engineering. *Science* **219**: 671-676.
- Belliard, G., G. Pelletier, F. Vedel and F. Quetier. 1978. Morphological characteristics and chloroplast DNA distribution in different cytoplasmic paraxial hybrids of *Nicotiana tabacum*. *Mol. Gen. Genet.* **165**: 231-237.
- Boeshore, M.L., I. Lifshitz, M.R. Hanson and S. Izhar. 1983. Novel composition of mitochondrial genomes in *Petunia* somatic hybrids derived from cytoplasmic male sterile and fertile plants. *Mol. Gen. Genet.* **190**: 459-467.
- Chien, Y.C., K.N. Kao and L.R. Wetter. 1982. Chromosomal and isozyme studies of *Nicotiana tabacum*-*Glycine max* hybrid lines. *Theor. Appl. Genet.* **62**: 301-304.
- Douglas, G.C., W.A. Keller and G. Setterfield. 1981. Somatic hybridization between *Nicotiana rustica* and *N. tabacum*. I. Isolation and culture of protoplasts and regeneration of plants from cell cultures of wild-type and chlorophyll-deficient strains. *Can. J. Bot.* **59**: 208-219.
- Evans, D.A., L.R. Wetter and O.L. Gamborg. 1980. Somatic hybrid plants of *Nicotiana glauca* and *N. tabacum* obtained by protoplast fusion. *Plant Physiol.* **48**: 225-230.
- Hamill, J.D., D. Pental, E.C. Cocking and A.J. Muller. 1983. Production of a nitrate reductase deficient streptomycin resistant mutant of *Nicotiana tabacum* for somatic hybridization studies. *Heredity* **50**: 197-200.
- Harms, C.T. 1983. Somatic hybridization by plant protoplast fusion. In, Protoplasts, I. Potrykus, C.T. Harms, A. Hinnen, R. Hutter, P.J. King, and R.D. Shillito (eds.), Birkhauser Verlag Basel, Boston. pp. 69-85.
- Ichikawa, H. and J. Imamura. 1990. A highly efficient selection method for somatic hybrids which uses an introduced dominant selectable marker combined with idoacetamide treatment. *Plant Sci.* **67**: 227-235.
- Kim, J.C., S.K. Lee and K.W. Lee. 1987. Intergeneric somatic hybrids by electrofusion of protoplasts between *Nicotiana tabacum* and *Petunia inflata*. *Korean J. Bot.* **30**: 1-9.
- Kim, J.C., D.H. Cho and C.D. Jin. 1990. Electrofusion of plant protoplasts by a multi-electrode. *Korean J. Plant Tissue Culture* **17**: 69-75.
- Kuster, E. 1909. Über die Verschmelzung nackter protoplasten. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **27**: 589-598.
- Medgyesy, P., E. Fejes and P. Maliga. 1985. Interspecific chloroplast recombination in a *Nicotiana* somatic hybrid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 6960-6964.
- Pelletier, G., C. Primard, F. Vedel, P. Chetrit, R. Remy, P. Rousselle and M. Renard. 1983. Intergeneric cytoplasmic hybridization in *Cruciferae* by protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* **191**: 244-250.
- Saltz, Y. and J. Beckman. 1981. Chloroplast DNA preparation from *Petunia* and *Nicotiana*. *Plant Mol. Biol. Newslett.* **2**: 73-74.
- Senda, M., J. Takeda, S. Abe and T. Nakamura. 1979. Intro-

- duction of cell fusion of plant protoplasts by electrical stimulation. *Plant & Cell Physiol.* **20**: 1441-1443.
- Thanh, N.D., A. Pay, M.A. Smith, P. Medgyesy and L. Marton. 1988. Intertribal chloroplast transfer by protoplast fusion between *Nicotiana tabacum* and *Salpiglossis sinuata*. *Mol. Gen. Genet.* **213**: 186-190.
- Zimmerman, U. and P. Scheurich. 1981. High frequency fusion of plant protoplast by electric fields. *Planta* **151**: 26-32.
- (1990. 11. 10 接受)