

*Petunia hybrida*와 *Nicotiana sanderae*의 원형질체융합에 의한 잠정적 체세포잡종 식물체 생산

정재동* · 노영희 · 최수옥¹ · 지선옥²

경북대학교 농과대학 원예학과, ¹충청남도 농촌진흥원, ²중부대학교 원예학과

Production of Putative Somatic Hybrid of *Petunia hybrida* and *Nicotiana sanderae* by Protoplast Fusion

Jae Dong CHUNG*, Young Hee ROH, Soo Ok CHOI¹, and Sun Ok JEE²

Department of Horticulture, Kyungpook National University, Taegu 702-701;

¹ChoongNam Provincial Rural Development Administration, Taejon, 305-313; and ²Department of Horticulture, Joongbu University, Kumsan, 312-940. *Corresponding author.

The experiments were carried out to obtain a somatic hybrid through protoplast fusion between *P. hybrid* and *N. sanderae*. The isoenzyme pattern, the chromosome number and the phenotype were observed for genetic study on the regenerants obtained from the fusion product cultures. Putative somatic hybrids possessed all the bands that appeared in both mother plants. A specific band was found on the top of the banding pattern which was assumed to be a marker band of somatic hybrid between two genera. Aspartate aminotransferase isoenzyme bands which were found in both mother plants were also revealed in the putative somatic hybrids or deleted in the upper part of *N. sanderae* band pattern. The chromosome number of *P. hybrida* was $2n=14$, while *N. sanderae* was $2n=18$, but the number of the putative somatic hybrids ranged from $n=32$ to 36. The phenotype of putative somatic hybrids was intermediate of the mother plants.

Key words : aspartate aminotransferase, chromosome number, *Nicotiana sanderae*, peroxidase, *Petunia hybrida*, somatic hybrid

1970년대부터 식물원형질체를 이용한 연구가 여러 학자들의 관심의 대상이 되어 오던중 최근 20년동안 원형질체의 배양방법과 성적불친화성인 식물체간의 원형질체 융합방법이 확립됨에 따라 돌연변이의 선발 또는 체세포잡종식물의 획득이 가능하게 되었을 뿐만 아니라 내병성, 내충성 등의 유전인자, 세포소기관, 바이러스, 박테리아, 질소고정균 및 DNA 나 RNA와 같은 유전물질을 삽입시켜 완전한 기능을 가진 식물체를 재생시키는 기능도 개발됨으로써 신품종의 개발 및 가능성이 어느때보다 높아지고 있다. Carlson 등(1972)이 *Nicotiana* 종간 잡종식물을 얻은 후 Power 등(1980)은 *Petunia* 종간, Dudits 등(1977)은 *Daucus* 종간, Schieder(1978)는 *Datura* 종간 및 Schenck와 Robbelin (1982)은 *Brassica* 종간 체세포잡종식물을 얻었는데 지금까지 이외에도 다수의 종간 체세포 잡종식물체를 얻었다. 그리고 Melcher 등(1978)이 *Solanum tuberosum*과 *Lycopersicon*

*esculentum*간의 속간 체세포 잡종 식물을 얻은 이래 Krumbiegel과 Schieder(1979), Gleba와 Hoffmann(1980), Nagao(1982), Potrykus 등(1984), Toriyama 등(1987), Schweizer 등(1988) 및 Wan 등(1988)에 의해 속간 체세포 잡종식물체가 얻어졌다.

한편 페튜니아와 담배와의 속간 원형질체 융합에 의한 잡종식물의 획득은 Sun 등(1982)이 *N. glauca* 와 *P. hybrida* 간의 속간 체세포 잡종을, Li 등(1982), Huang 등(1984), Pental 등(1986) 및 Lee 등(1990)이 *N. tabacum*과 *P. hybrida* 간, Mullin과 Van(1989)은 *P. hybrid*와 *N. plumbaginifolia*간의 융합을 유도하여 체세포 잡종식물을 얻었다. 이와 같은 연구의 성과에도 불구하고 체세포잡종식물을 실제 재배면에 이용한다는 것은 대단히 어렵는데 이는 융합된 원형질체배양으로부터의 재분화 능력이 너무나 낮아 유용형질을 지닌 체세포잡종식물을 선발하는데 어려움이 있었으며 염색체의

소멸에 의한 돌연변이의 발생 및 양친의 중간형 또는 모본의 어느 한쪽형으로 발현되어 목적으로 하는 유용개체의 선발이 어렵게 되는 등 앞으로 해결해야 할 문제점이 대단히 많다.

본 연구에서는 *P. hybrida*와 *N. sanderae*간의 융합을 유도하여 속간 체세포잡종식물을 획득하고자 수행하였으며 이 결과 얻어진 식물체를 대상으로 동위효소 검정 및 염색체 검정 등의 유전분석을 하였던 바 체세포잡종식물일 것으로 판단되는 개체를 얻었기에 이를 보고코자 하는 바이다.

재료 및 방법

P. hybrida 'Titan Red'와 *N. sanderae*의 종자를 vermiculite에 파종하여 주간온도 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 85%, 광도 2,000 lx로, 16시간 조명한 생장상에서 재배하였다. 시비는 Murashige-Skoog배지의 무기염이 함유된 용액으로 매 2주마다 1회 엽면시비하였다.

30~40일간 재배해온 유묘의 완전 전개된 유엽을 채취하여 재료로 사용하였는데 재료의 살균 및 전처리는 *P. hybrida*의 경우 채취한 재료를 0.5% NaOCl 용액으로 10분간 살균한 후 살균수로 충분히 씻어 예리한 핀셋으로 하부의 표피조직을 벗긴다음 CPW 무기염이 첨가된 mannitol 0.6 M 용액으로 28°C 에서 1시간 전처리하였다. *N. Sanderae*의 경우, *P. hybrida*와 같은 방법으로 살균한 재료를 잘게 썰어 NH_4NO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 각각 1 mM을 NAA와 BA 각각 1 mg/L가 함유된 용액에 넣어 4°C 에서 16시간 전처리하였다.

원형질체 유리는 *P. hybrida*의 경우, Macerozyme R-10 (Yakuh Honsha Co, Japan) 0.5%(w/v), Cellulase Onozuka R-10 2.0%(w/v), MES buffer 0.01M, BSA 0.2%, mannitol 0.6 M 및 CPW 무기염이 함유된 효소용액의 pH를 5.8에 조정 한 효소용액 20 mL당 1 g의 시료를 넣어 28°C , 암상태로 4시간(50 strokes/min)동안 처리하였다. *N. sanderae*의 경우, Macerozyme R-10 0.5%, Cellulase Onozuka R-10 3.0%, MES buffer 0.01M, BSA 0.2%, mannitol 0.6 M 및 CPW 무기염이 함유된 효소용액 20 mL 당 1 g의 시료를 넣어 28°C 암상태로 4시간(50 strokes/min) 처리하였다.

원형질체의 수세와 회수는 두 종 모두 mannitol 0.6M 용액에서 500 rpm으로 5분간 수세한 다음 sucrose 0.6 M 용액에서 800 rpm으로 8분간 원심분리하였다. 본 실험에 사용된 CPW 무기염은 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,480 mg/L, KH_2PO_4 27.2 mg/L, KNO_3 101 mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 246.5 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mg/L, KI 0.16 mg/L을 함유한 용액을 사용하였으며, 효소용액 및 배지는 여과살균(pore size: 0.20 m membrane filter)하였다.

회수된 두 종의 원형질체를 Chung 등(1992)의 방법에 의

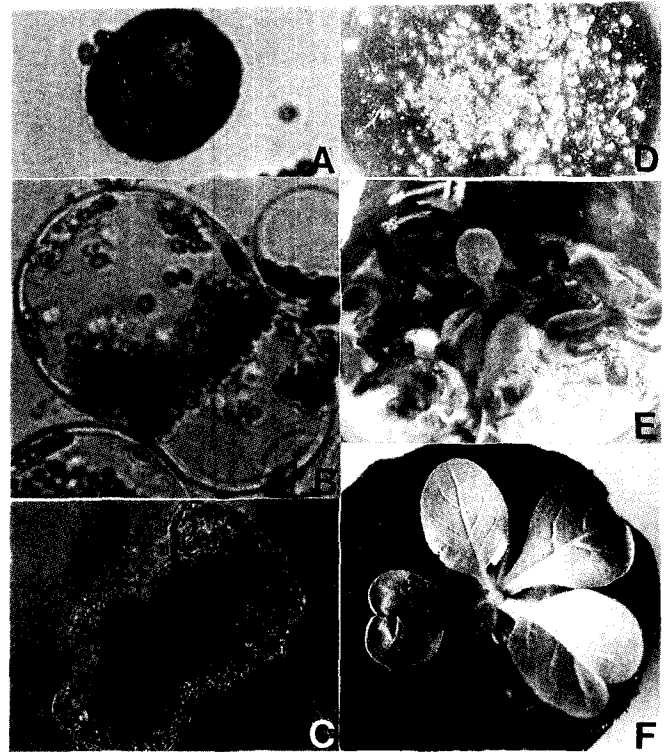


Figure 1. A: Stages in the fusion of *Petunia hybrida* + *Nicotiana sanderae*. B: Cell division from fusion product culture of *P. hybrida* + *N. sanderae*. C: Cell colony formation from fusion product culture of *P. hybrida* + *N. sanderae*. D: Callus formation from fusion product culture of *P. hybrida* + *N. sanderae*. E: Shoot regeneration from fusion product culture of *P. hybrida* + *N. sanderae*. F: Young plant of putative tetraploid.

해 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5.5 mM이 함유된 30%(w/v) PEG 6,000 용액으로 25°C 에서 10분간 처리한 후 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50 mM이 함유된 희석용액의 pH를 9.0으로 조절한 용액으로 희석시켜 융합을 유도하였으며 이들 융합산물의 초기배양은 mannitol 0.2 M과 glucose 0.3 M, NAA 1.5 mg/L, BA 0.5 mg/L, 2,4-D 0.2 mg/L가 함유된 8p-KM (Kao and Michayluk, 1975) 배지에서, 식물체의 재분화를 위해서는 Murashige-Skoog (Murashige and Skoog, 1962)배지에 ZiP 또는 Zeatin 2.0 mg/L, sucrose 30 g/L, Gelrite 2 g/L가 함유된 배지에 배양하였다(Figure 1. A-E).

*P. hybrida*와 *N. sanderae* 그리고 이들의 융합산물배양에서 재분화된 식물체를 버미큐라이트에 이식하여 활착시킨 후(Figure 1F) 부엽과 버미큐라이트를 혼합한 배양토에 옮겨 온실에서 재배 하면서 정단부위에 있는 어린 엽조직을 채취하여 전기영동 시료로 사용하였다. 검정은 Hames(1981)의 변형된 방법에 준 하였으며 시료 0.3 g과 0.05 M Tris (pH 8.0), 0.007 M citric acid, 0.1% cystein HCl, 0.1% ascorbic acid, 1 mM mercaptoethanol, 1.0% PEG 6,000의 추출buffer 300 L을 혼합하여 저온 마쇄한 다음 12,000 rpm으로 10분간 원심분리해서 얻은 상등액을 sucrose 60%

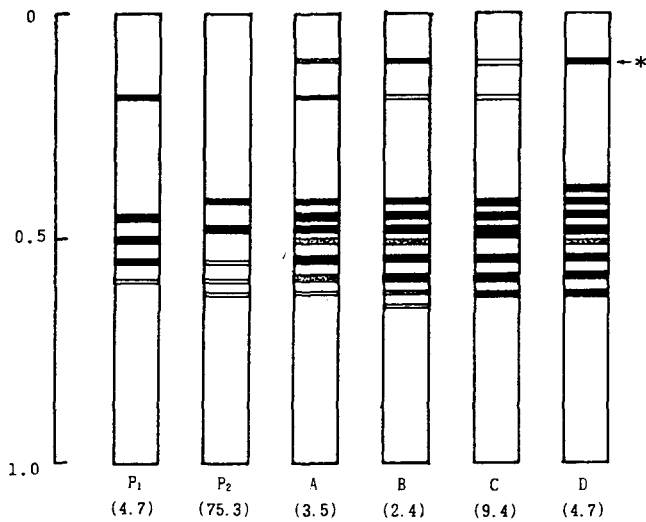


Figure 2. Electrophoretic patterns of peroxidase. P1: *Petunia hybrida*. P2: *Nicotiana sanderae*. A, B, C, D: *Petunia hybrida* + *Nicotiana sanderae*. ■: Dark intensity. ▨: Medium intensity. □: Light intensity. (): Figures in parenthesis are mean frequency of isozyme. Symbol (*): A marker band.

용액과 2:1로 혼합하여 수직영동의 평면 polyacrylamide 위에 loading하였다. Running buffer는 Tris base 0.025 M과 glycine 0.195 M (pH 8.0) 용액을 사용하였으며 전개시 온도는 4°C를 유지하여 2 mA/well로 5시간 전개시켰다. Peroxidase의 정색반응은 O-dianisidine 50 mg과 α-naphthol 30 mg을 acetone 20 mL로 녹인 후 0.01 M Tris acetate buffer (pH 4.0) 10 mL, 3% H₂O₂ 1 mL을 넣은 후 100 mL로 만든 염색용액에 전개한 gel을 담구어 37°C 정온기내에서 20-30분간 착색시켰다. Aspartate aminotransferase (AAT)의 정색반응은 전기영동이 끝난 gel slice를 Hamrick (1979)의 변형된 방법에 준하여 0.2 M Tris HCl (pH 8.0) 60 mL와 증류수 60 mL를 섞은 후 pyridoxal-5-phosphate 1 mg, aspartic acid 90 mg, α-ketoglutaric acid 70 mg, Na-dotite 10 mg 및 Fast blue BB salt 140 mg 을 넣은 효소 염색 시약을 사용하여 30°C로 조절된 항온 기내에서 염색시켰다. 염색이 끝난 후 흐르는 물에 씻어 고정용액(증류수: Methanol: Acetic acid = 5: 5: 1)에 gel slice를 넣어 고정 보관하였다.

염색체의 검경을 위해 6-7시간 동안 약광 하에 둔 재분화된 식물체의 잘 발달된 근단 2 mm을 채취하여 3 mM 8-hydroxyquinoline으로 18°C에서 3시간 전처리한 후 고정액(95% ethanol: glacial acetic acid = 3: 1 v/v)으로 4°C에서 16시간동안 고정한 뒤에 1N HCl용액을 채워 60°C에서 15초간 가수분해 시킨 후 증류수로 HCl을 씻어낸 다음 2.0% aceto-orcein squash 방법으로 염색하여 검경 하였다. 표현형은 재분화된 식물체를 온실에서 재배하면서 잎의 형태적 특성을 관찰하였다.

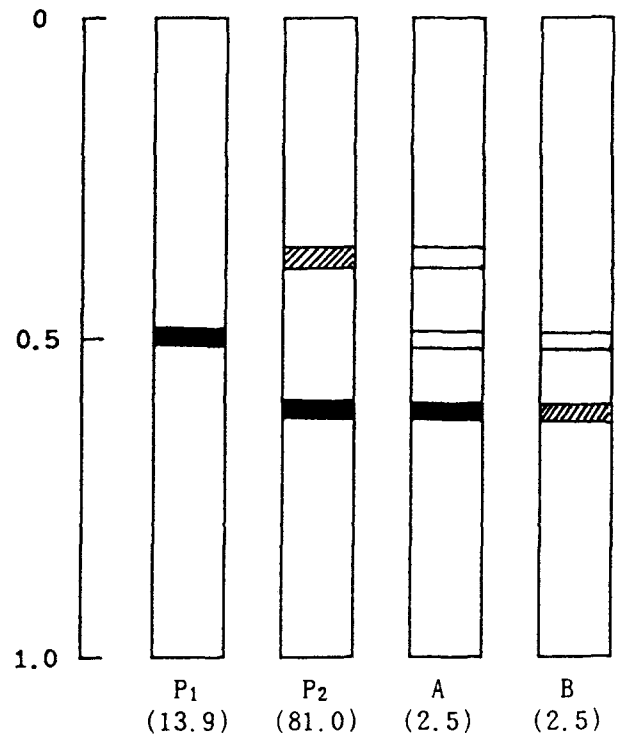


Figure 3. Electrophoretic patterns of aspartate aminotransferase (AAT). P1: *P. hybrida*. P2: *N. sanderae*. A, B: *P. hybrida* + *N. sanderae*. ■: Dark intensity. ▨: Medium intensity. □: Light intensity. (): Figures in parentheses are mean frequency of isoenzyme patterns of individual regenerants.

결과 및 고찰

*P. hybrida*와 *N. sanderae*의 융합산물의 배양에서 얻은 개체(Figure 1)가 체세포 잡종식물 인가를 판별하기 위하여 전기영동법을 통하여 peroxidase 동위효소의 활성을 검정한 결과는 Figure 2와 같다. *P. hybrida* (p1)는 상부에 1개의 band와 중부에 4개의 band가 나타났다. 그러나 *N. sanderae* (p2)는 중부에 거의 일정한 간격으로 5개의 band가 나타났는데 두개의 band는 효소활성이 높았고 나머지 3개의 band는 효소활성이 낮았다. 융합산물의 배양에서 얻은 개체중 융합의 가능성이 있는 개체의 band는 모두 4가지 양상(A-D)으로 요약될 수 있었다. A형은 상부에 2개의 band와 중부에 7개의 band가 나타났는데 이는 *P. hybrida*와 *N. sanderae*의 모든 band가 나타났으며 B형은 A형과 거의 동일하였으나 중부의 최하부에 모본에는 없는 1개의 band가 추가되었다. C형은 A, B형과 비슷하나 중부에 6개의 band가 나타났고 이중 3번째 band가 특히 강하게 나타나서 2개의 band가 중복되었을 가능성이 높았다. D형은 *P. hybrida*의 상부 band가 소멸되고 중부의 상단에 1개의 band가 추가되었으며 그외는 모본의 중부 band를 나타내었다. 특히

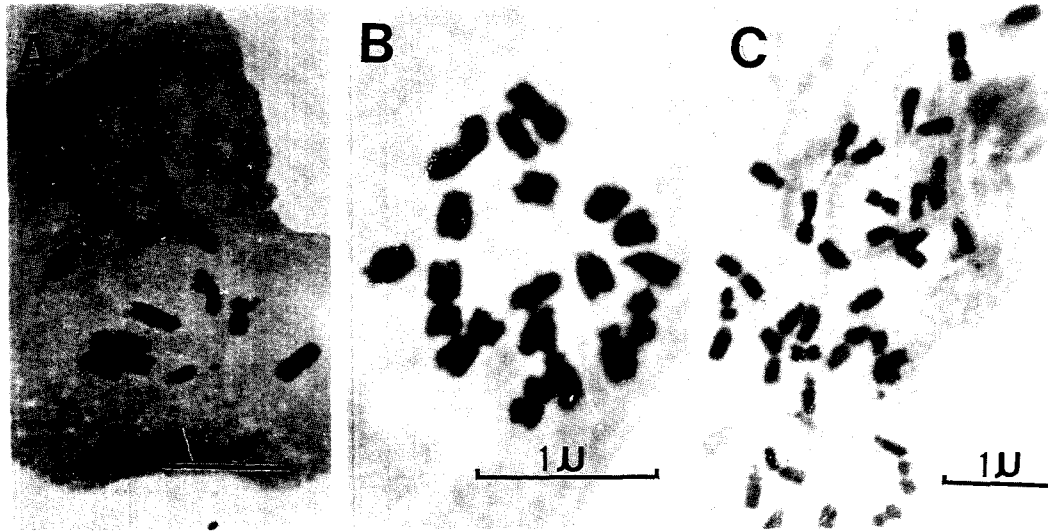


Figure 4. Chromosomes at metaphase in *P. hybrida*, *N. sanderae*, and Multifusion product. A: *P. hybrida* (2n=14). B: *N. sanderae* (2n=18). C: Multifusion product (chromosome number:n=32).

양친의 band를 모두 가진 개체(A형부터 D형)에서 나타난 band중 *P. hybrida*에서 나타난 band 이외에 최상부에 1개의 band가 추가되었는데 이는 융합을 판별할 수 있는 중요한 marker일 가능성이 있었다. 융합산물의 배양에서 얻은 340 개체에서 나타난 특정 band의 출현 빈도를 보면 A형 3.5%, B형 2.4%, C형 9.4%, D형 4.7%를 각각 나타내어 체세포 잡종식물의 출현율이 총 20%로써 대단히 높았으며, 융합되지 않은 세포로부터 재분화 빈도는 *P. hybrida*는 4.7%, *N. sanderae*는 75.3%가 출현하여 융합되지 않은 세포중 캘러스가 형성되어 이로부터 재분화가 일어나는 개체의 대부분은 *N. sanderae*였다.

Aspartate aminotransferase의 동위효소의 활성을 검정한 결과는 Figure 3과 같다. *P. hybrid* (P₁)는 중부에 1개의 band가 나타났고 *N. sanderae* (P₂)는 중상부와 중하부에 위치한 2개의 band가 나타났다. 융합산물의 배양에서 얻은 개체중 융합의 가능성이 있는 개체의 band는 양친의 band를 모두 나타내었거나 *N. sanderae*의 band중 중상부의 band가 소실되어 나타났으며 *N. sanderae*의 band는 활성이 높았고 *P. hybrida*의 band는 활성이 낮았다. 체세포잡종식물로 추정되는 식물체의 출현율은 총 79개체중 5%였고, 이들 중 모본의 모든 band가 함께 나타난 개체는 2.5%였고, 모본의 band중 *N. sanderae*의 상부 band가 소실된 개체는 2.5%였다. 융합되지않은 세포로부터 재분화빈도는 *P. hybrida*는 13.9%였고 *N. sanderae*는 81.0%였다. Itoh와 Futsuhara (1983)는 *P. hybrida*와 *P. parodii*의 체세포잡종식물을 재료로 polyacrylamide gel을 이용하여 동위효소 분석을 하였는데 peroxidase의 정색반응에서 *P. hybrida*와 *P. parodii*를 교잡해서 얻은 후대에서 각 모본에서 나타난 band가 모두 나타났으나 융합해서 얻은 식물에서는 몇 개의 band가 소멸되었다고 하였으며, Tabaeizadeh 등(1985)은 *P. hybrida*와 *L. peruvianum*을 융합하여 얻은 식물체를 polyacrylamide을 이

용하여 RUBPCase로 염색하여 pattern을 관찰한 결과 *L. peruvianum*의 pattern과 유사하였으며, Barsby 등(1984)은 *S. brevidens*와 *S. tuberosum*을 융합하여 얻은 식물체를 동위효소 분석한 결과, 체세포잡종식물에서 두 모본의 band가 모두 나타났으며 표현형이 중간형을 관찰하였다. Pental 등(1986)은 *N. tabacum*과 *P. hybrida*의 체세포잡종식물에서 peroxidase band를 검정한 결과 양친에 없는 새로운 band가 나타났다고 보고하여 본 실험의 결과를 뒷받침하였다. 이와 같이 동위효소 band는 융합개체에서는 모본의 band가 모두 있는 경우, 일부가 소멸되거나 추가되는 경우가 있는데 본 실험의 결과에서도 같은 현상이 관찰되었으며 특히 본 실험을 통해 얻은 특이한 점은 Pental 등(1986)의 결과와 같이 융합개체에서만 나타나는 특정 band가 발견되어 체세포잡종의 marker로 이용될 수 있을 것으로 생각되어진다.

재분화된 식물체들의 염색체 검정결과는 Figure 4와 같다. 모본인 *P. hybrida* "Titan Red"는 2n=14, *N. sanderae*는 2n=18개로 나타났으며, 동위효소검정에서 체세포잡종으로 추정되는 개체들의 염색체수는 2n=32-36으로 나타나 체세포잡종 또는 4배체인 것으로 추정되며 이들의 염색체에는 두 모본에서 발현되지 않은 부수체가 존재하여 배양과정에서 생긴 변이일 것으로도 생각된다.

Sakamoto와 Taguchi(1991)는 *L. esculentum*(2n=24)와 *S. muricatum*(2n=24)와의 원형질체를 융합하여 2n=48개의 체세포잡종식물을 얻었으나 변이체들은 관찰하지 못했기 때문에 이들은 속간체세포잡종으로서 복2배체였다고 하였으며, Sihachakr 등(1989)은 *S. melongena* L.(2n=24)와 *S. torvum*(2n=24)의 원형질체를 융합하여 2n=4x=46-48과 2n=4x=35-48개인 개체들은 형태학적 변이가 심하게 나타났다고 하였다. 이와 같이 융합식물 배양시 염색체수의 변이는 흔히 일어나는 것으로 본 연구결과에서도 염색체의 수적 차이가 있었는데 이들이 체세포잡종인지 4배체인지에

관해 명확한 구멍이 앞으로의 과제일 것으로 생각된다.

체세포잡종으로 추정되는 개체의 잎의 형태적 특징을 보면 엽병은 *P. hybrida*는 완전하고 *N. sanderae*는 없었으나 이들은 엽조직이 엽병부에 다소 발달하였다. 엽맥의 형태는 모두 망상엽맥이지만 *N. sanderae*는 엽맥이 대단히 뚜렷한 편이나 *P. hybrida*는 비교적 편편한 편이지만 이들은 중간 정도의 특징을 가지고 있었다. 잎의 성장상태는 모본은 편편하게 성장했지만 이들은 굴곡이 심하였다. *N. sanderae*의 잎을 만져보면 끈적끈적한 점성의 정도가 대단히 심한 반면 *P. hybrida*는 전혀 느끼지 못하였으나 이들은 다소 점성이 느껴졌고 이들의 엽조직을 유발에 같이 보아도 동일한 현상을 나타내었다. 또한 잎을 마쇄후 갈변정도는 *N. sanderae*는 대단히 심하였으나 *P. hybrida*는 갈변정도가 경미하였으며 이들은 중간정도였다. 체세포잡종식물의 표현형에서 Iwai 등(1980)은 *N. tabacum* + *N. rustica*의 원형질체 배양에서 나온 개체들의 표현형에서 꽃의 모양은 양친의 중간형이고 색깔 역시 중간형인 pinkish-yellow였다고 보고하였고 Gleddie 등(1983)은 *N. rustica* + *N. sylvestris*의 체세포잡종개체의 표현형은 양친보다 초장이 커졌고 잎수는 많아진 반면 크기는 작아지고 종종 비정상적인 잎이 나타났다고 하였으며, Uchimiya(1982)는 *N. tabacum*과 *N. glutinosa*에서 유래한 체세포잡종식물은 양친의 중간형을 닮는다고 하였다. 이와 같이 본 실험의 결과에서도 잎의 형질에 따라 양친의 중간형질을 나타내는 것도 있었으며 Gleddie 등(1983)의 관찰에서와 같이 잎의 만곡이 심하면서 비정상적인 성장을 하는 것이 관찰되어 체세포잡종식물임을 뒷받침해 줄 수 있는 여러 가지 현상이 나타났다.

지금까지의 결과로 보아 효소의 band양상, 염색체수, 표현형 등으로 미루어 볼때 융합산물의 배양에서 얻은 개체중 많은 개체들이 두 모본과 다른 양상을 나타내었으므로 체세포잡종식물인 것으로 판단되었는데 보다 구체적인 유전 분석을 통하여 미비점을 보완해야 할 것으로 생각된다.

적 요

*Petunia hybrida*와 *Nicotiana sanderae*의 원형질체를 융합하여 체세포잡종식물을 얻고자 융합산물의 배양에 의해 얻은 개체들에 대해 유전분석을 하였다. 재분화 개체중 융합된 것으로 인정되는 개체의 peroxidase pattern은 두 모본의 band를 모두 가진 개체(A-D patterns)에서 나타난 band중 *P. hybrida*에서 나타난 band 이외에 최상부에 1개의 band가 추가되었는데 이는 융합을 판별할 수 있는 중요한 marker로서 가능성이 있으며, aspartate aminotransferase isoenzyme pattern은 두 모본의 양상이 모두 나타나거나 *N. sanderae*의 상부 band가 소실된 개체도 있었다. 염색체 검정에서 *P. hybrida*는 $2n=14$, *N. sanderae*는 $2n=18$ 개로 나타났으며, 동

위효소검정에서 체세포 잡종일 것으로 추정되는 개체들은 $2n=32-36$ 으로 나타났다. 표현형 관찰에서 체세포잡종으로 인정되는 개체의 형태적 특징은 두 모본의 중간형태를 나타내었다.

사 사 -본 논문에는 1987년부터 1988년까지 2년간에 걸쳐 한국과학재단 일반 연구비 지원에 의해 수행된 과제가 포함되어 있음.

인 용 문 헌

- Barsby TL, Shepard JF, Kembie RJ, Wong R (1984) Somatic hybridization in the genus *Solanum*: *S. tuberosum* and *S. brevidens*. Plant Cell Reports 3: 165-167
- Carlson PS, Smith HH, Dearing RD (1972) Parasexual interspecific plant hybridization. Proc Nat'l Acad Sci 69: 2292-2294
- Chung JD, Roh YH, Jee SO (1992) Improvements of protoplast fusion efficiency between *Petunia hybrida* and *Nicotiana sanderae*. Agric Res Bull Kyungpook Nat'l Univ 10: 147-155
- Dudits G, Hadlaczky G, Levi E, Fejer D, Haydu Z, Lazer G (1977) Somatic hybridization of *Daucus carota* and *D. capillifolius* by protoplast fusion. Theor Appl Genet 51: 127-132
- Gleba YY, Hoffmann F (1980) "Arabidobrassica": a novel plant obtained by protoplast fusion. Planta 149: 112-117
- Gleddie S, Keller WA, Setterfield G, Wetter LR (1983) Somatic hybridization between *Nicotiana rustica* and *N. sylvestris*. Plant Cell Tissue Organ Culture 2: 259-283
- Hames BD (1981) Gel electrophoresis of proteins, a practical approach.(eds) Hames BD and D Rickwood. pp 28-30
- Hamrick JL, Allard RA (1972) Microgeographical variation in allozyme frequencies in *Avena barbata*. Proc Nat'l Acad Sci 69: 2100-2104
- Huang MJ, Li WB, Sun YR, Zhang W, Li KH (1984) Observation of somatic hybrid progeny between tobacco and petunia. Abs. Intl. Symp. Genetic Manipulation in Crop. Beijing, China. pp. 198-199
- Itoh K, Futsuhara V (1983) Restoration of the ability to regenerate shoots by somatic hybridization between *Petunia hybrida* and *Petunia parodii*. Japan J Breed 33: 130-137
- Iwai S, Nagao T, Nakata K, Kawashima N, Matouyama S (1980) Expression of nuclear and chloroplast genes coding for fraction 1 protein in somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *N. rustica*. Planta 147: 414-417
- Kao KN, Michayluk MR (1975) Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a low production density in liquid media. Planta 126: 105-110
- Krumbiegel G, Schieder D (1979) Selection of somatic hybrids after fusion of protoplasts from *Datura innoxia* Mill. and *Atropa belladonna* L. Planta 145: 371-375

- Lee CH, Power JB, Cocking EC (1990) Production and characterization of the first true stable "Nicotunia" by intergeneric somatic hybridization between *Nicotiana* and *Petunia*. *Abst J Kor Soc Hort Sci* 8: 204-205
- Li XH, Li WB, Huang HJ (1982) Somatic hybrid plants from intergeneric fusion between tobacco tumor B6S3 and *Petunia hybrida* W43 and expression of LpDH. *Scientia Sin* 25: 611-619
- Melchers G, Sacristan MD, Holder AA (1978) Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carsberg Res Common* 43: 203-218
- Mulin M, Van KTT (1989) In vitro flower formation from thin epidermal cell layers of a partial somatic hybrid between *Petunia hybrida*(Hort.) and *Nicotiana plumbaginifolia*(Viv.). A comparative study of the morphology of in vitro leaves and flowers of the hybrid and its parental lines. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 16: 195-206
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol* 15: 473-497
- Nagao T (1978) Somatic hybridization by fusion of protoplasts. 1. The combination of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana rustica*. *Jpn J Crop Sci* 47: 491-498
- Nagao T (1982) Somatic hybridization by fusion of protoplasts. III. Somatic hybrids of sexually incompatible combinations *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana repanda* and *Nicotiana tabacum* + *Salpiglossis sinuata*. *Jpn J Crop Sci* 51: 35-42
- Pental D, Hamill JD, Pirrie PA, Cocking EC (1986) Somatic hybridization of *Nicotiana tabacum* and *Petunia hybrida*. *Mol Gen Genet* 202: 342-347
- Potrykus I, Jia J, Lazar GB, Saul M (1984) *Hyoscyamus muticus* + *Nicotiana tabacum* fusion hybrids selected via auxotroph complementation. *Plant Cell Reports* 3: 68-71
- Power JB, Berry SF, Chapman JV, Cocking EC (1980) Somatic hybridization of sexually incompatible petunias: *Petunia parodii*, *Petunia parviflora*. *Theor Appl Genet* 57: 1-4
- Sakamoto K, Taguchi T (1991) Regeneration of intergeneric somatic hybrid plants between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum muricatum*. *Theor Appl Genet* 81: 509-513
- Schenck HR, Robbelin G (1982) Somatic hybrid by fusion of protoplasts from *Brassica oleracea* and *B. campestris*. *Z Pflanzenzucht* 89: 278-288
- Schieder O (1978) Somatic hybrid of *Datura innoxia* Mill.+ *D. discolor* Bernh and of *D. innoxia* Mill.+ *D. stramonium* L. var. *tatula* L. *Mol Gen Genet* 162: 113-119
- Schweizer G, Ganal M, Ninnemann H, Hemleben V (1988) Species-specific DNA sequences for identification of somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum acaule*. *Theor Appl Genet* 75: 679-684
- Sihachakr D, Haicour R, Chaput MH, Barrientos E, Ducreux G, Rossignol L (1989) Somatic hybrid plants produced by electrofusion between *Solanum melongena* L. and *Solanum torvum* Sw. *Theor Appl Genet* 77: 1-6
- Sun YR, Huang MJ, Li WB, Li XH (1982) Regeneration of somatic hybrid plants between *Nicotiana glauca* and *Petunia hybrida*. *Acta Genet Sci* 9: 284-288
- Tabaeizadeh Z, Perennes C, Bergounioux C (1985) Increasing the variability of *Lycopersicon peruvianum* Mill. by protoplast fusion with *Petunia hybrida* L. *Plant Cell Reports* 4: 7-11
- Toriyama K, Hinata K, Kameya T (1987) Production of somatic hybrid plants, "Brassicomoricaandia", through protoplast fusion between *Moricaandia arvensis* and *Brassica oleracea*. *Plant Sci* 48: 123-128
- Uchimiya H (1982) Somatic hybridization between male sterile *Nicotiana tabacum* and *N. glutionsa* through protoplast fusion. *Theor Appl Genet* 61: 69-72
- Wan XS, Wang FT, Wang GY, Yeng XF, Hsia CA, Chang XM, Liu FN (1988) Regeneration of somatic hybrid plants between tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and black nightshade (*Solanum nigrum* L.). In KJ Puite, JJM Dons, HJ Huizing, AJ Kool, M Koornneef, FA Krens, eds, *Progress in Plant Protoplast Research*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pp. 233-234

(1995년 3월 8일 접수)