

## *Pelargonium aridum*과 *P. zonale* 亞屬間的 原形質體融合

柳 順 南

大邱曉星가톨릭大學敎 植物育種學科

### Intersubgeneric Protoplast Fusion of *Pelargonium aridum* (*Ligularia*) and *P. zonale* (*Ciconium*)

Sun-Nam YU

Department of Plant Genetics and Breeding, Catholic Universtry of Taegu Hyosung, Kyungsan, Kyungbuk, 713-702

In an attempt to obtain intersubgeneric somatic hybrids of *Pelargonium aridium* and *P. zonale*, protoplasts isolated from the two species were fused by using polyethylene glycol (PEG) and electorfusion methods. Protoplasts were isolated from cotyledon and leaf tissues using MS medium containing 550 mM sucrose, 0.7% cellulase (Onozuka R-10) and 0.4% Macerozyme. The optimum number of protoplasts per mL of culture medium was  $6 \times 10^4$ . Protoplasts fused by the electrofusion method were more active than by PEG method. Heterokaryotically fused protoplasts formed calli when cultured in MS medium containing 550 mM glucose, 1 to 2 mg/L NAA, and 0.5 to 1 mg/L BA.

**Key words:** electrofusion, polyethylene glycol

*Pelargonium*은 유럽과 아메리카에서는 봄부터 초겨울까지의 가장 중요한 베란다, 花壇用 花卉作物로서 18세기 이후 지금까지 花卉 育種家의 매우 중요한 對象作物로 되고 있다(Clifford, 1970; Harney and Chow, 1971; Maatsch, 1977; Moore, 1971; Payet, 1982; Van Der Walt, 1977). 우리 나라에서는 제라늄으로 알려져 있으며 화훼작물로서의 중요성이 증대되고 있다.

최근에 다시 *Pelargonium*屬의 野生種에 대한 關心이 集中되고 있는데, 그 이유는 病蟲害, 花色 등 풍부한 野生種의 有用形質을 栽培品種에 導入하고자 하기 때문이다. *Pelargonium*屬의 栽培品種의 주요 系統은 P.-Zonale-Hybrids, P.-Peltatum-Hybrids와 P.-Grandiflorum-Hybrida로서 2,000餘品種에 이르며 이들은 18세기이후 交雜育種에 의해서 形成되었으며, 그 形質은 매우 雜多할뿐만 아니라, 그들의 兩親은 불분명하여(Chow and Harney, 1970; Clifford, 1970; Debergh and Maene, 1977; Moore, 1971; Oliver and Van Der Walt, 1984; Payet, 1982), 이러한 品種들에 野生種의 有用形質 導入을 위한 交雜育種 방법은 不稔이거나 또는

交雜不親和性이므로 쉽지 않다(Yu, 1985; Yu and Horn, 1984).

그러므로 *Pelargonium*屬의 品種間, 種間, 種과 品種間, 亞屬間交雜의 不親和性에 의한 交雜育種의 한계성이 있는 것을 보완하고자 體細胞雜種에 의한 新品種의 育種방법은 매우 바람직 하다고 볼 수 있다. 그러나 *Pelargonium*屬의 品種改良을 위한 原形質融合體培養에 관한 보고는 아직 없으며 다만 *P. aridum*과 다른 두재배 品種의 原形質體培養으로부터 植物體가 再生되었다는 보고가 있을 뿐이다(Abo El-Nil and Hildebrandt, 1976; Kameya, 1975; Koop et. al., 1983).

본 연구는 *Pelargonium*屬의 花色育種의 한방법으로서, 交雜育種으로는 어려운 *Ligularia*亞屬 *P. aridum*(노란색)과 *Ciconium* 亞屬 *P. zonale*(분홍, 적색계통)간의 원형질융합체 배양을 통해 노란색꽃 體細胞雜種 *Pelargonium*을 얻고자 하였다. 이들 식물의 기관발생을 통한 재분화 조건은 발표된 바 있다(Yu, 1995).

## 재료 및 방법

### 材料植物

材料植物은 *Pelargonium*屬 *Ligularia*亞屬의 *P. aridum* Dyer와 *Ciconium*亞屬의 *P. zonale* (L.)의 두 原種이며, 原種의 種子를 西獨 뮌헨대학에서 分讓받아 無菌播種하여 자엽, 본엽을 使用하였다.

### 原形質體培養

原形質體 및 融合體의 培養에 관한 實驗은 最小한 3回以上의 反復의 平均으로 나타내었다. 原形質體裸出 과정은 10 20個體의 幼苗에서 子葉과 本葉을 採取하여 약 0.1 mm 폭으로 길게 잘라서, 그리고 부드러운 綠色 캘러스는 잘게 分離하여 10 mL 酵素溶液을 넣고,  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 暗條件에서 (Weber and Lark, 1979) 14~16 時間 處理後에, 40 x g로 10 分間 遠心分離한후 上澄液을 PIM溶液(proto-plast-incubation-media)으로 2번 세척하고 마지막의 PCM용액(proto-plast-culture-media)으로 65 x g에서 15分間 遠心分離하여 沈澱된 原形質體를 培養溶液(PCM)에서 培養하였다. 원형질체배양 용액은 NAA 1 mg/L와 BA 1 mg/L가 포함된 MS기본배지에 550~800 mM 삼투압을, PIM용액은 sucrose로, PCM용액은 glucose를 맞추고 pH를 5.7로 하여 사용하였다.

培養條件으로 原形質體裸出과 培養培地는 MS培地와 B5培地(Gamborg et al., 1968)를 주로 使用하였으며, 原形質體裸出 酵素濃度는 0.7~1%의 cellulase (Onozuka R-10, Yakult) + 0.4~1%의 Macerozyme (Onozuka R-10, Yakult) 濃度에서 검토되었다. 材料植物부위가 子葉과 本葉인 경우 각각 1%용액을 使用하였다. 滲透壓調節劑로는 glucose와 mannitol을 使用하여 培養液의 滲透壓을 500~800 mM을 검토하였고(Model Osmat 030, Gonatec, Fed, Rep, Germany)나중에 原形質體分離와 初期培養培地의 濃度를 550 mM으로 고정하였다. 培養密度는 Fuchs-Rosenthal, depth 0.2 mm로 환산하였으며, 原形質體를 충분히 얻을 경우 培養密度를  $10^4$ ,  $2.5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^4$ ,  $10^5$ ,  $2.5 \times 10^5$ 로 실험하였다. 原形質體培養溫度는  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 였으며, 光度는 1~2일은 培養室의 간접광을 받는 곳에(700 lx) 두었다가 細胞分裂時는 光을 높여주었고, 콜로니가 形成되면 1100~1450 lx로 더 높여주었다. 培養培地는 液體培養으로 하였다. 植物生長調節劑의 濃度는 材料植物의 캘러스培養의 最適 濃度를 맞추어 1 또는 2 mg/L NAA와 0.5 또는 1.0 mg/L BA를 初期原形質體培養의 濃度로 하였고, 細胞가 分離段階로 안정이 되면 새로운 培養液을 添加할때 滲透壓과 함께 점차 그 濃度를 減少시켜주었다(Koop et al., 1983). 原形質體의 培養初期段階는 매일 inverted 顯微鏡으로 觀察하였다 (Inverted Microscope IM, Carl, Zeiss, Oberkochen, Fer. Rep.

Germany).

### Polyethylene Glycol(PEG)에 의한 原形質體融合

化學藥品에 의한 原形質體의 融合은 25%의 PEG (mol wt 6,000; Merck) (Kao, 1981)을 使用하였고 融合時間은 顯微鏡으로 觀察하여 融合이 이루어지면 洗滌을 하였으나 일반적으로 20~30분이 소요되었으며, 洗滌은 PCM溶液을 10 mg/L 添加하여 45 x g로 10분간 遠心分離하여 上澄液을 버리고 培養溶液(PCM)으로 培養하였다. 25% PEG solution(25%)은 12.5 g PEG 6,000에 fusion solution (0.1 M glucose, 10 mM CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5.7) 50 mL을 넣어 만들었다.

### Electrofusion

Fusion chamber는 function generator (Wavetek Model 145)와 pulse generator (Packard Model 214B)로 연결되어 있으며, chamber내에는 나란히 백금전선의 전선이 있으며, 그 내에서의 原形質體 融合과정은 200  $\mu\text{m}$  거리에 있는 양극사이 에 原形質體를 넣고 function generator로 낮은 강도의 전류를 -극에서 +극으로 보내주면 초기에 AC field 상태를 만들어 주어서 原形質體를 dielectrophoresis로 만들어(Bates et al., 1983) 'pearl chains' 상태가 되면, pulse generator로 높은 강도의 single DC square 파장을 주어서 原形質體를 순간적으로 融合시킨다(Yu, 1989). 融合狀態는 eletrofusion을 위해서는 mannitol solution을 使用하여야 하며, 電流의 세기는 초기의 AC field 상태때는 0.9 MHz를 使用하여 20초 후 높은 강도의 DC square의 pulse (1000 KHz, 10~15  $\mu\text{s}$ , 200 pulse)를 넣어 주었다. Mannitol solution은 0.5 M (550 mM)을 使用하였으며, chamber의 용량은 3 mL 정도이다. 融合後의 培地와 培養狀態는 原形質體培養 方法과 동일하였다.

## 결과 및 고찰

### 原形質體培養

原形質體 遊離, 細胞分裂 및 캘러스形成에 미치는 基本培地의 影響을 B5, MS 및 Kao培地(Kao, 1981)를 使用하여 *P. aridum*에서 검토해 본 결과 原形質體 遊離溶液엔 MS와 B5 無機鹽이 효과적이었다. 細胞分裂 및 캘러스形成엔 MS培地가 B5培地보다 그 分裂速度가 조금 빨랐다. 그러나 캘러스를 固體繼代培養으로 옮겼을때 MS培地가 더 빠르게 자랐다. Kao培地는 原形質體裸出 및 細胞分裂이 低調하였다.

*Pelargonium*의 原形質體培養에 使用한 基本培地로는 Kameya (1975)는 *P. hortorum*에 MS培地를 使用하였고

Yarrow (1987) 등은 callus suspension protoplast에서 Kao培地를 使用 하였던 바 본 실험과 같은 경향이였다. 滲透壓調節濟는 glucose나 sucrose가 sorbitol이나 mannitol보다 炭素原으로도 利用될 수 있어 效果의이라는 報告가 많다(Kartha et al, 1974). 一般的으로 原形質體培養에서는 pH를 높게 하는 것이 生存率이 높다고 하나 本 實驗에서는 培養培地의 pH는 5.7로 材料植物의 培養에서와 같은 濃度로 해주어 細胞에 抑制를 적게 주고자 하였는데 이는 Yarrow (1987)는 pH 5.6~5.8의 Kao培地를, Kameya (1975)도 pH 5.6~5.8의 MS培地를 使用하였으며 Abo El-Nil (1974)은 macroculture의 MS培地에 pH 5.5를 使用한 것과 差異가 없었다.

예비실험에서 培地의 mM濃度로서 酵素溶液의 滲透壓은 *P. aridum*을 材料로 하여 550, 660, 770, 800 mM을 實驗해 본 結果 濃度가 높을수록 原形質體裸出數가 많았다. 그러나 細胞分裂速度는 MS培地에서 550 mM은 第一次分裂이 5일 걸렸으나 800 mM은 8일이 소요된 것으로 觀察되었다.

原形質體裸出을 위한 酵素溶液은 식물체일 경우 0.7% cellulase와 0.4% Macerozyme가 좋았으며 ㅁ 효소용액(0.5% cellulase + 0.05% Pectolase + 5% Macerozyme)은 原形質體遊離가 低調하였다. 子葉이나 幼葉을 使用할 경우는 0.2% cellulase + 0.4% Macerozyme가 良好하였고, 캘러스를 使用할 경우는 1%의 cellulase + 1% Macerozyme 경우가 동일시간내의 原形質體數는 더 많았으며 低濃度의 酵素溶液에서는 原形質體裸出의 時間이 많이 所要되나 健康한 原形質體를 얻을 수 있을 때도 있었다(Table 1).

Table 1. The number of protoplasts isolated with an enzyme solution containing cellulase and Macerozyme.

	Cellulase	Macerozym	Cellulase	Macerozyme
	0.7% + 0.4%		1.0% + 1.0%	
Plant	37.42		31.78	
Callus	20.63		25.74	

Genotype과 材料部位에 따른 原形質體裸出率은 *P. aridum*는 子葉이 本葉보다, *P. zonale*은 本엽이 자엽보다 原形質體 유리수가 많았다(Table 2). 種에 따라서 原形質體遊離가 잘 되는 부위가 다르나, 幼葉이 캘러스조직보다 많은 량의 원형질체를 얻을 수 있었다. 또한 妙齡이 적은 것(4주전후)이 원형질체유리와 분열이 잘된다는 보고가 있었다.

培養濃度는  $2.5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^4$  등  $2.5 \sim 8 \times 10^4$ 사이가 적당하였다. 一般的으로 *Pelargonium*에서의 原形質體 獲得量이 充分하지 않은 關係上 全體를 使用하여 少量의 培養液으로 最大로 濃度를 높여 適正密度에 맞추어서 培養하였다. Yarrow (1987)는 *Pelargonium*의 培養密度를  $2.5 \times 10^4$  mg/L 로 使用하였고, Kameya (1975)는  $2 \times 10^4$  mg/L 細胞數에서 가장 良好하게 細胞分裂이 되었다.

Table 2. The number of protoplasts isolated from cotyledons, leaves, and calli of two *Pelargonium* species.

Species	Cotyledon	Leaf	Callus
<i>P. aridum</i>	42.9	7.6	13.4
<i>P. zonale</i>	- <sup>a</sup>	510.3	16.3

<sup>a</sup>- ; Not examined.

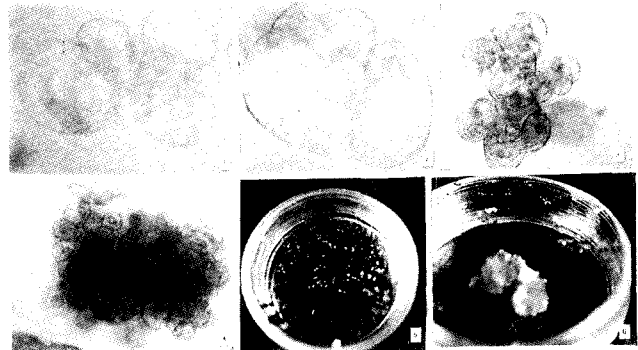


Figure 1. Culture of cotyledon protoplasts of *P. aridum* in a liquid medium. First cell division (1), second cell division (2), fourth cell division (3), after 2, 3, 4 weeks of culture, respectively: colony formation after 5 (4), 8 (5) weeks of culture: and callus formation after 12(6) weeks of culture (agar medium).

原形質體의 生存力과 細胞分裂 그리고 콜로니 形成에 있어서 genotype間 差異는 Figure 1에서 *P. aridum*은 B5培地(550 mM) (0.1:1:0.5 mg/L = NAA:BA:2.4-D)에서 培養 1日後 細胞膜이 形成되었고, 2日後 細胞第一分裂이 되었다. 細胞第一分裂 후 3日마다 3回 새培地를 稀釋하여 주었다. 培養 15日後부터는 440 mM로, 18日後는 360 mM로 稀釋 하였다. 培養 25日後에는 220 mM로 稀釋시킴과 同時에 NAA와 BA濃度를 달리하여(0.1~1 mg/L)培養하여 1~2 mm 콜로니가 形成된 것은 56日後 個體培地에 옮겨 캘러스를 培養하였다. 그리고 86日後에 캘러스再分化誘導培地에 옮겼다. *P. zonale*는 原形質體가 10일 가량밖에 生存하지 못하였다.

滲透壓調節濟의 濃度는 段階的으로 낮추어 주어서 細胞內 滲透壓에 맞게 해주지 않으면 細胞分裂이 中止하게 된다고 하였다(Kao, 1981). Kameya도 *Pelargonium*의 原形質體에서 細胞壁이 形成된 後에 無機鹽類의 量을 1/10로 낮추어 주었고, Yarrow (1987) 등은 培養 6日後에 새 培養液을 넣고, 15~20日後에 4.5% mannitol로 滲透壓을 調節하였다. 本 實驗에서는 細胞膜이 形成된 다음 새 培養液을 1/2 갈아주었고, 細胞第一分裂이 있는 後 滲透壓은 550에서 420 mM으로 떨어뜨려주며, 계속해서 MS液體培養의 mM (150 mM 정도임)에 가깝게 해준 것이 캘러스形成에 가장 效果의이었다. 培養液內의 生長調節濟濃度는 genotype에 따른 組織培養의 適正濃度와 같은 傾向이 있다. 原形質體 培養溫度는

25°C(Jelaska and Jelencic, 1980; Yarrow et al., 1987)이며, 光은 Yarrow(1987)는 700 lx의 持續光을, Kameya(1975)는 3000 lx로 해주었으며 本 實驗에서는 培養 1~2日은 100 lx 에 낮은 照度에 두었다가 1000 lx 光原下에서 培養하였다.

PEG에 의한 原形質融合體培養

25% PEG를 使用하여 原形質體를 融合시킨 뒤에 viability 는 PEG 溶液의 量과 融合時間 그리고 genotype에 따른 差異는 Table 3에 나타나 있다. *P. aridum* × *P. aridum* 間의 子葉原形質體의 融合時間은 PEG 溶液의 경우 47分이 所要 되었으며 13%의 경우 15分이 所要되었다. 이 경우 각각 4日과 11日동안 生存했으나 細胞分裂이 없었다. 그리고 子葉 × 캘러스, 子葉 × 子葉 혹은 캘러스 × 캘러스의 原形質體間 融合比率는 거의 비슷하였고 生存日數는 14일이었다 (Figure 2).

種間 原形質融合에서 *P. aridum* × *P. zonale*의 子葉 × 葉內原形質體間의 融合에서는 25% PEG 溶液量이 15%의 融合溶液이 되게 첨가되었고 融合所要時間은 15分 걸렸다. 수세 후의 培養 2日後 細胞壁이 形成되어 타인형이 觀察되었으나 細胞分裂은 觀察할 수 없었으며, 培養 24日後 새 培養培地를 添加해주고, 38日엔 450 mM이 되게 培養液으로 稀釋시켜 주었다. 그러나 形態가 계속 나빠져서 54日 後에는 細胞가 죽었다. 子葉 × 캘러스 原形質體間의 融合은 生存日數가 19일이고, 이때 PEG融合溶液에 原形質體를 14時間 두었을 때에 細胞가 죽게되는 것을 觀察하였다. 그리고 캘러스 原形質體間의 融合에서도 15%의 경우 15分이 所要되었고 15日間 生存하였다.

一般的으로 PEG融合에 使用하는 濃度는 25~30%로서 分子量은 1540, 4000, 6000이 있으나, 本 實驗에서는 PEG의 15% 정도에서 15分 정도로 所要되었고, 그 阻害가 심한 것으로 봐서 *Pelargonium*은 短時間에 融合을 해주어야 된다고 본다. PEG의 分子量이 높을수록 原形質體의 萎縮이 심하다고 하나, 種間의 原形質體融合에서는 分子量이 높은 PEG에 의해서 融合이 誘導될 수 있다고 하였다(Kao, 1981). *Pelargonium*屬에서의 原形質體融合에 관한 報告는 아직 없는 듯하다.

Electrofusion 培養

Electrofusion에 適用한 材料植物의 組合는 Table 4에 있고, 培養溶液은 MS 550 mM을 使用하였다. *P. aridum* × *P. zonale*의 子葉 × 葉內原形質體間에 캘러스가 誘起되었으며 그 過程은 electrofusion 4日後 細胞膜이 생기고, 17日後에 細胞第一分裂이 있었고, 새 培地를 添加하여 주었다. 21日째 細胞第二分裂이 있었고 450 mM로 培養溶液濃度를 稀釋해 주었다. 28日後 細胞第4分裂이 일어났고, 그후 적은 콜로니

Table 3. Viability of homokaryotically and heterokaryotically fused protoplasts in two species of *Pelargonium*.

Species	Tissues			Conc (%) of PEG	Time for treatment (min)	Viability (days)
	Cotyledon	Leaf	Callus			
<i>P. aridum</i> × <i>aridum</i>	x			4	47	4
	x			8	20	13
	x			13	15	11
<i>P. aridum</i> × <i>aridum</i>	x		x	4	50	7
	x		x	7	45	14
<i>P. aridum</i> × <i>zonale</i>	x	x		15	15	54
<i>P. aridum</i> × <i>onale</i>	x		x	16	15	19
		x	x	14	840	1
<i>P. aridum</i> × <i>zonale</i>			x	15	15	15
			x	15	840	1

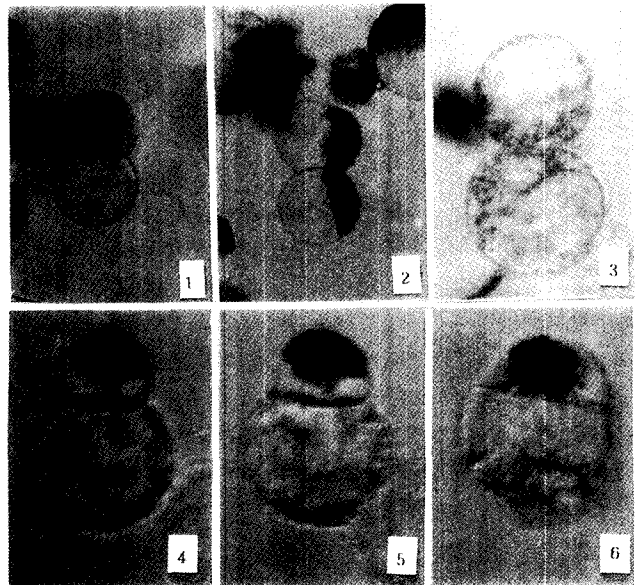


Figure 2. Stages in PEG-fusion of cotyledon protoplasts and callus protoplasts of *P. aridum* in a liquid medium.

- 1) Cotyledon protoplasts × callus protoplasts after 15 min.
- 2) Cotyledon protoplasts × cotyledon- protoplasts after 10 min.
- 3) Callus protoplasts × callus protoplasts after 12 min.
- 4) Cotyledon protoplasts × callus protoplasts after 23 min.
- 5) Cotyledon protoplasts × callus protoplasts after 30 min.
- 6) Cotyledon protoplasts × callus protoplasts after 36 min.

가 생겨서 배양 101日後 (1 mm 크기) 固體培地로 옮겼다 (Figure 3). 子葉 × 캘러스 그리고 캘러스 × 캘러스原形質體間의 融合에서는 細胞分裂이 없이 各各 12日, 17日간 生存하였다.

Electrofusion에서 제일 먼저해야 할 實驗은 두 原形質體間의 最高融合率을 낼 수 있는 最適 pulse強度와 pulse持續時間을 찾는 데 있다(Kohn et al., 1985). 本 實驗에서는 0.9 MHz의 AC-field (Zimmerman and Scheurich, 1981)로서 이

Table 4. Viability of electrofusion protoplasts for either two different species.

Species	Tissue			Viability (days)
	Cotyledon	Leaf	Callus	
<i>P. aridum</i> × <i>P. zonale</i>	×	×		Callus
<i>P. aridum</i> × <i>P. zonale</i>	×		×	20
<i>P. aridum</i> × <i>P. zonale</i>			×	17

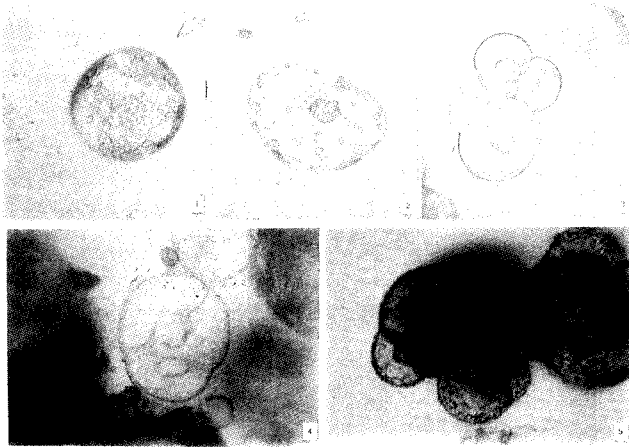


Figure 3. Cell division after electrofusion between leaf mesophyll protoplasts of *P. zonale* and cotyledon protoplasts of *P. aridum* in a liquid medium. Cell division of fused protoplasts after 4 days (1), 8 days (2), 17 days (3), 3 weeks (4), and 4 weeks (5) of culture.

때 原形質體의 密度가 높을수록 融合이 일어날 確率을 높이며, 이때 보통  $10^4$ 의 密度가 요구된다(Kohn et al., 1985). 本 實驗에서 使用한 培養密度에서는  $6 \times 10^4$ 이 適當하였다. Pulse의 세기는 1~2 Kv/m에서 시작하며 pulse持續時間을 50  $\mu$ s로 維持하면 最高融合率이 1.2~1.5 Kv/cm사이에서 나오는 반면 本 實驗에서는 1000 KHz에 10 ms로 比較的 낮은 pulse (1.6~2.5 Kv/cm)에서는 double-fusion의 融合率은 떨어지고 multi-fusion이 發生하기 때문이다. 2.5 Kv/cm에서는 모든 融合이 끝나며(Kohn et al., 1985) 그중 double fusion이 생기는 率은 5~16%, multi-fusion이 생기는 率은 25~30%였다(Kohn et al., 1985). 本 實驗에서는 multifusion의 率에 대해서는 別途로 調查하지 않았다.

體細胞雜種의 兩親의 組織培養을 繼代培養回數間에 比較해 보건데 조직배양에서 *P. aridum*과 *P. zonale*의 初代 1, 2次 繼代培養間의 캘러스形成量은 一致하였고, 再分化도 잘 되었으므로, 여기에 알맞는 生長調節濃度 배지를 사용하여 原形質融合體培養에서 나온 캘러스에서의 體細胞雜種植物體의 再分化는 앞으로 나올 것이다.

## 적 요

*Pelargonium aridium*과 *P. zonale* 아속간의 체세포 잡종을 얻기 위하여 이들로부터 원형질체를 유리하여 polyethylene glycol (PEG)와 electrofusion 방법으로 융합시켰다. 원형질체는 자엽과 본엽을 550 mM sucrose, 0.7% cellulase (Onozuka R-10), 0.4% Macerozyme이 함유된 MS 배지로 유리하였다. 배양밀도는 배지 mL당 원형질체수는  $6 \times 10^4$ 이 배양에 적당하였다. Electrofusion 방식으로 융합된 원형질체는 PEG 방식으로 융합된 것보다 세포분열이 덜 활발하였다. 두종간의 원형질융합체는 550 mM glucose, 1~2 mg/L NAA와 0.5~1 mg/L BA가 함유된 MS 배지에서 배양하였을 때 캘러스를 형성하였다.

사 사-이 연구는 대구효성가톨릭대학교 연구비지원에 의하여 수행된 결과입니다.

## 인용문헌

- Abo El-Nil MM (1974) Geranium viruses and *in vitro* induction of virus-free tetraploid and androgenetic haploid geranium plants. Diss The University of Wisconsin Madison Ref Diss Absra Int 35: 5221
- Abo El-Nil MM, Hildebrandt AC (1976) Cell wall regeneration and colony formation from isolated single geranium protoplasts in microculture. Can J Bot 54: 1530-1534
- Bates GW, Gaynor JJ, Shekhawat NS (1983) The fusion of plant protoplasts by electric fields. Plant Physiol 72: 1110-1113
- Chow TW, Harney PM (1970) Crossability between a diploid *Pelargonium x hortorum* Bailey cultivar and some of its putative ancestral species. Euphytica 19: 338-348
- Clifford E (1970) *Pelargoniums* including the popular 'Geranium'. Blandford Press 2nd edition London
- Debergh P, Maene L (1977) Rapid clonal propagation of pathogen-free *Pelargonium* plants starting from shoot tips and apical meristems. Acta Hort 78: 449-454.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res 50: 151-158
- Harney PM, Chow TW (1971) Crossability between some *Pelargonium* species. Euphytica 20: 286-291
- Jelaska S, Jelencic B (1980) Plantlet regeneration from shoot tip culture of *Pelargonium-Zonale*-Hybrid. Acta Bot Croat 39: 59-63
- Kameya T (1975) Culture of protoplast from chimeral plant tissue of nature. Jap J Gen 50: 417-420
- Kao KN (1981) Plant protoplast fusion and somatic hybrids. in: Plant Tissue Culture. Han, H.(Ed). pp.331-339, The pitman International Series in Applied Biology Proceedings of Beijing Symposium London

- Kartha KK, Gamborg OL, Constable F, Kao. KN (1974) Fusion of rapeseed and soybean protoplast and subsequent division of heterokaryocytes. *Can J Bot* **52**: 2435-2436
- Kohn H, Schieder R, Shieder O, (1985) Somatic hybrids in tobacco mediated by electrofusion. *Plant Sci* **38**: 121-128
- Koop HV, Weber G, Schweiger HG (1983) Individual culture of selected single cells and protoplasts of higher plants in microrodlets of defined media. *Z pflanzenphysiol* **112**: 21-34
- Maatsch R (1977) Botanische einfuhrung and Zuchterische entwicklung. *In: R Maatche, KH Weise, H Ganslichkeit. Pelagonien Geschichte Kultur Wirtschaftlichkeit und Zuchtung. Parey Verlag Berlin und Hamburg*, pp 9-35
- Moore HE (1971) Taxonomy of *Pelargoniums* in cultivation, *In: JW Mastalerz (ed) Germaiums penn Flower Grower* 14-52
- Olivier MC, Van Der Walt JJA (1984) The taxonomy of *Pelargonium peltatum* (L.) L'Herit complex. *JS Afr Bot* **50**: 1-14
- Payet J (1982) Etude des caracteres morphologiques, anatomiques et cytologiques des *Pelargonium* a feuilles edorantes et essai d'une classification numerique. *Diss Universite Paris-Sud*.
- Van Der Walt (1977) *Pelargonium* of southern Africa. Vol 1. Purnell & Sons Cape Town
- Weber G, Lark KG (1979) An efficient plating system for rapid isolation of mutants from plant cell suspensions. *Theor Appl Genet* **55**: 81-86
- Yarrow SA, Cocking EC, Power JB (1987) Plant regeneration from cultures cell derived protoplasts of *Pelargonium aridum*, *P. × hortorum* and *P. peltatum*. *Plant Cell Reports* **6**: 102-104
- Yu SN (1985) Research for interspecific compatibility and biosystematic on the genus *Pelargonium*. 1. Cytotaxonomy and compatibility. *재독 과기협 논문집 창간호*: 38-43
- Yu SN (1989) Callus Induction from in vitro tissue, Protoplast Cultures and Protoplast fusion Organelles for breeding of Genus pelagonium. *Diss Korea Univ*, pp 123
- Yu SN, Horn W (1984) Cross between *Pelargonium* spp. of different taxonomic sektionen. *Rep. Eucarpia meet. Potplant Breeding Svendborg DK*, pp 49-59
- Yu SN (1995) Organogenesis and plant regeneration in tissue cultures of *Pelargonium aridum* (*Ligularia*) and *P. zonale* (*Ciconium*). *Korean J Plant Tissue Culture* **22**: 307-310
- Zimmerman U, Scheurich P (1981) High frequency fusion of plant protoplasts by electrical field *Planta*. **151**: 26-32

(1995년 10월 10일 접수)