

벼와 담배의 원형질체 배양조건에 따른 식물호르몬의 변화

黃台益* · 閔庚洙* · 林賢玉* · 安裝淳*

Changes of Phytohormones in Rice and Tobacco Protoplasts under Different Cultural Conditions

Tay Eak Hwang*, Kyung Soo Min*, Hyun Ock Lim* and Chang Soon Ahn*

ABSTRACT : This study was carried out to establish simple and easy methods to judge the survival, senescence and death of the protoplasts in culture system by identifying the marker substance related to metabolic status of the cells. When rice and tobacco protoplasts were cultured in MS and KM-8P media containing 2,4-D or coconut milk ABA decreased especially in the media containing coconut milk, but GA₃, IAA and zeatin increased as the cultures progressed. The decrease of ABA and increase of zeatin was especially remarkable. When the supraoptimal amount of osmoticum (mannitol) was added to the culture media ABA decreased after a momentary increase, but other growth hormones slowly increased as the concentration of the osmoticum increased. Contents of individual hormones were contrasted when protoplasts rice and tobacco were cultured on the same medium containing 10mM supermine or NaCl. Tobacco protoplasts were more sensitive to NaCl stress and stopped protoplast division at the late stage of culture. Protoplast viability decreased greatly in 48 hours when the protoplast were at 32°C on a medium lacking several components. ABA content increased up to 10 days from incubation in negative proportion to the protoplast viability. On the other hand contents of other growth hormones, especially zeatin, decreased. The present results clearly showed that the contents of individual growth hormones in the plant protoplasts in culture varied sensitively in response to environmental factors that they are faced with. This indicates that the physiological states of the protoplast, such as survival, senescence or death can be simply judged based on the quantitative analysis of those hormones by ELISA.

Key words : Protoplast, ABA, GA₃, IAA, Zeatin, ELISA.

식물 원형질체 배양 기술의 발달은 학문적 뿐만 아니라 재배 이용의 측면에서도 중요한 가치를 지니고 있다. 식물 원형질체는 Cocking⁴⁾에 의해 효소에 의한 완벽한 나출 방법이 소개된 이후 이에 대한 연구는 대단히 활발하게 전개되고 있다. 식

물에서 나출된 원형질체는 외부로부터 유용한 유전자를 직접 도입할 수가 있으며 원형질체를 배양, 재분화시켜서 많은 돌연변이체를 얻을 수가 있고 다른 종속간의 원형질체 융합을 통하여 세포 잡종을 만드는 등 새로운 육종 연구 소재로서 그

본 연구는 학술진흥재단 연구비 지원에 의해서 수행되었음.

* 전남대학교 농과대학(College of Agriculture, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea)

〈'96. 8. 30 接受〉

리고 세포생리와 생화학 등에 널리 연구되고 있다(5,7,9).

이와 같이 식물 세포는 동물 세포와 다르게 전체형성능을 가지고 있어서 재분화가 가능함은 잘 알려진 사실이다. 그러나 전체 형성능의 발현이 모든 식물 원형질체에서 똑같이 발현되는 것이 아니고 불과 몇 가지 식물 종에서만 재분화가 이루어지고 있다(24,25,26).

원형질체 또는 융합 원형질체에 배양에 있어서 가장 중요한 과제는 재분화에 관한 문제이다. 식물체의 특성 때문에 대부분의 원형질체는 재분화되지 못하고 노화되어 고사한다. 특히 중요한 재배 작물의 경우 식물체로부터 분리되는 순간부터 급속히 노화되어 결국은 고사하고 만다(1,8,12,16,17).

따라서 원형질체의 생존력, 분열상태 또는 고사에 대한 판단을 위한 몇 가지 방법들이 이용되고 있다. 즉 Evan's blue 또는 몇 가지 형광물질의 염색 방법과 현미경적 관찰 등 간접적인 방법에 의존하여 세포 활력을 측정하고 있다. 따라서 이들 방법은 원형질체의 생존력을 직접 판단하기는 대단히 어렵다. 왜냐하면 염색을 하는 경우에 세포 활력과 관계없이 세포막이 완전하면 염색이 안 되는 경우가 많기 때문에 정확한 판단이 어렵고 상당히 노화가 진전이 되거나 생존력을 상실할 때에만 측정이 가능하다.

따라서 실제로 원형질체를 배양할 때는 노화의 판단이 어려워 상당 기간 경과 후에야 배양 상태를 알 수 있기 때문에 시간적 경제적 손실이 크다.

따라서 원형질체 배양 및 조직 배양 중에 생존에 대한 정확한 어떤 marker가 있다면 대단히 편리할 것이다.

생존과 고사를 조기에 판정할 수 있는 방법을 개발하기 위해서는 우선 marker는 원형질체의 세포 대사적, 생리적으로 민감한 활성물질이어야 하고 이를 조사하거나 관찰 또는 측정하기가 용이하여야 할 것이다.

생리 활성 물질은 대단히 많은 종류가 존재한다. 그러나 생리적으로 가장 민감한 반응을 나타내는 것은 식물의 성장과 억제에 관여하는 식물 호르몬일 것이다. 왜냐하면 억제 호르몬인 Absc-

isic acid의 경우 외부환경 stress에 가장 민감한 반응을 나타낸다(11,13,23). 반면에 auxin, gibberellin, cytokinin은 세포의 신장과 분열에 관계한다(6,14,15,20). 따라서 이들 호르몬의 상태를 정확하게 동정하는 것은 식물의 생존 상태를 직접 파악하는 방법이 될 수 있다. 그러나 어느 한 호르몬만 관찰하는 것은 식물 대사의 한편만 관찰하는 것이 되기 때문에 이들 모두를 관찰하여 적당한 호르몬만 선택하여 이를 marker로 사용하는 것이 보다 바람직할 것이다.

다만 문제가 되는 것은 이들 호르몬의 생체중 함량이 극히 낮아서 정확한 정량분석이 어렵다는 것이다. 주지하는 바와 같이 이들 호르몬은 모두 기기분석 방법에 의존하고 있다(2,19,21,22). 본 연구와 같은 생존상태를 측각 판단하고자 할 때는 이들 기기적인 방법으로는 부적합하다.

이러한 어려움은 면역측정 방법에 의해서 해결할 수가 있다. 면역측정 방법은 추출 후 정제없이도 단시간에 기기 분석 이상의 정확한 분석을 할 수가 있으며 하루에 수백 이상의 시료를 동시에 분석할 수가 있는 장점을 가지고 있다.

본 연구에서는 원형질체를 배양하면서 이들 배양 원형질체를 인위적으로 노화시켜가면서 앞에서 말한 4가지 식물 호르몬을 정량분석하였다. 그 결과 이들 호르몬을 판별할 수 있음을 확인하였다. 또한 면역 측정법의 정확성과 함께 편리성도 알 수가 있었다.

재료 및 방법

1. 재 료

담배의 버어리 21과 버는 낙동벼를 사용하였다.

항체의 대량 증식을 위해서 mouse는 Balb/c를 이용하였다.

Cellulase는 일본 Yacult사의 Onozuka R10, 그리고 pectinase는 macerozyme R10과 Sigma 제를, 그리고 Fetal bovine serum과 RPMI 1,640은 Gibco에서, 그리고 96 well titer plate는 Nunc제품을 사용하였다. 원형질체 나출을 위한

식물 시료는 28℃로 조정된 배양상에서 담배는 약 60일간, 그리고 벼는 2 주일간 생육시킨 잎을 사용하였다.

2. 방법

1) 멸균

식물체의 잎을 채취한 다음 칭량하고 70% EtOH에 30초 침지하고 멸균수로 세척하고 1% hypochlorite에 10분간 침지했다가 멸균수로 다시 세척하였다. 효소액은 0.2 μ m membrane filter를 통과시켰고 각종 기구 등은 고압 멸균(15psi, 20min)하였다.

2) 원형질체 나출

Min 등¹⁶⁾이 개발한 원형질체의 다량 나출 방법에 따라서 수행하였다. 즉 식물잎의 이면 표피세포를 박피한 후에 잘게 절단하여 100mg /1ml 효소액 (담배 : cellulase 1.5% + pectinase 0.05%, 벼 : cellulase 1.5% + Ma-cerozyme 0.5% + pectinase 0.01%)을 가하여 25℃에 1.5 시간 세포벽을 가수분해시켰다. 삼투압 농도는 담배는 0.4M로 조정하였다. 나출 후 분해되지 않은 조직을 걸러 내고 삼투압 농도가 조정된 MES buffer로 원심 세척하였다. 그리고 5~20% sucrose 농도구배 원심분리(300 \times g)하여 원형질체를 정제 분리하였다.

3) 원형질체 배양

상기 정제된 원형질체는 담배는 MS배지에 그리고 벼는 KM-8P 배지에 5 \times 10⁵씩 치상하여 25℃의 암중 배양실에서 배양하였다.

4) 식물 호르몬의 추출과 정제

분석하고자 하는 4종류의 호르몬(indole-3-acetic acid ; IAA, gibberellic acid A₃ ; GA₃, zeatin, abscisic acid ; ABA)의 추출과 정제는 그림 1과 같이 수행하였다³⁰⁾.

5) ELISA

상기 추출 정제된 호르몬은 Weiler 등의 방법

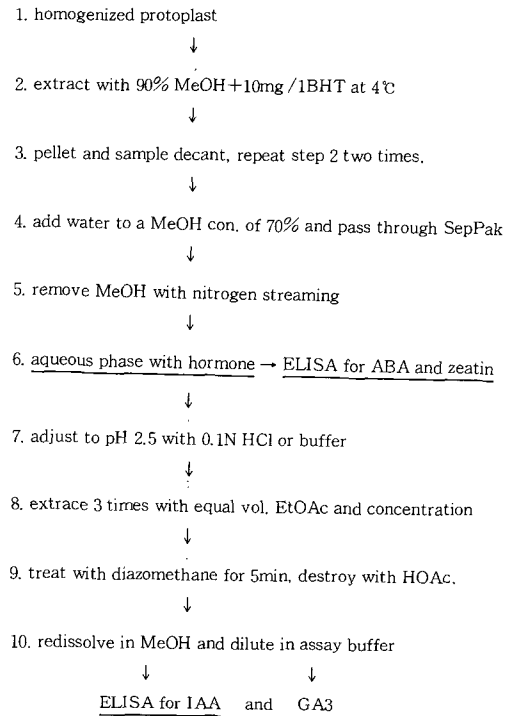


Fig. 1. Flow diagram for the processing of plant extracts prior to immunoassay.

과 같이 면역측정법에 따라서 정량분석하였다^{27, 28, 29, 30)}.

6) 원형질체 염색

원형질체 배양 중 세포벽의 재생부는 0.1% calcoflour white ST로 처리하여 3회 원심세척 후 과잉의 calcoflour white ST를 제거하고 형광현미경으로 관찰하였다¹⁸⁾. 한편 세포의 활력은 0.5% trypan blue를 처리하여 염색된 것을 세포 활력이 상실한 것으로 간주하였다.

7) 원형질체 계수

원형질체는 hemocytometer를 사용하여 계수하였다. 원형질체에 함유된 호르몬의 계산을 위해서 나출 직후부터 10 세포기 미만은 그대로 계수하였으며, 그 이후 즉 micro colony 상태의 때는 계수하기 어렵기 때문에 colony를 저농도 pectinase와 cellulase로 가수분해시켜서 단세포로 유리시켜 세포를 계수하였다.

결과 및 고찰

1. 기본배지에 첨가물 효과

전보¹⁶⁾에 보고한 바와 같이 담배는 기본배지를 MS로 하고 벼 원형질체는 KM-8P로 하였다. 여기에 growth factor가 함유된 conditioned medium(CM, protoplast 3×10^5 culture supernatant) 등을 첨가하여 원형질체 배양 중 호르몬 함량의 변동과의 관계를 조사하였다.

그 결과는 그림 2에 표시한 바와 같다. 담배의 원형질체는 나출했을 때 ABA의 함량은 32.3 (1.96) p mol / 1×10^6 cell이었다. 담배의 원형질체는 배양 직후 24시간까지는 약간 증가하는 경향이 있었다. 그러나 48시간 이후 배양시간에 비례하여

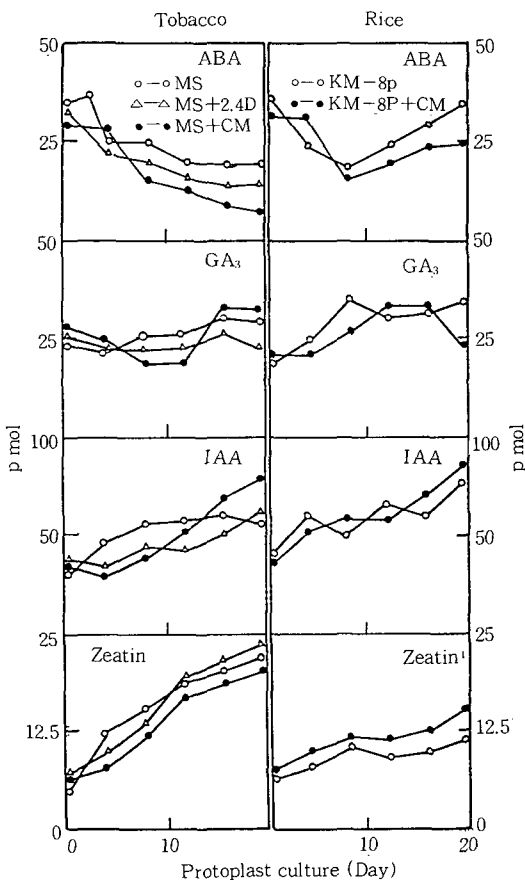


Fig. 2. Changes of hormones content at time of protoplast culture in tobacco and rice.

함량은 감소하였다. 48시간 이후 담배의 원형질체는 거의가 세포벽 재생이 이루어진 것이 관찰되었고, 세포분열이 시작되었다. 그 이후 시간의 경과에 따라서 세포는 수십 개의 세포로 분열된 모습이 관찰되었다.

GA와 IAA의 함량은 시간의 경과에 비례적으로 증가되었다. 그러나 정상생육 조건에서 zeatin의 증가율이 더욱 두드러져서 원형질체 나출 당시 8.5 pmol이던 것이 20일 배양 후에 25 pmol까지 증가하여 3배의 증가폭이 나타났다. 벼의 경우는 기본 배지를 KM-8P로 하였을 때와 여기에 CM을 첨가하여 원형질체 배양을 촉진시키고자 하였을 때 각각 호르몬의 함량 변화는 그림 2에 표시한 것과 같다. ABA의 경우에 배양 8일째까지는 감소하였다. 그러나 그 이후에는 증가하였다. 그 이유는 원형질체가 본 연구 조건에서 초기 4~8 세포기까지는 정상적으로 생육하였으나, 그 이후에는 생육이 중지되거나 고사하는 결과를 가져왔기 때문인 것으로 생각된다. GA에 있어서도 이러한 양상은 비슷하게 나타났다. 배양 초기인 7~8일까지는 함량은 증가되었으나, 그 이후는 오히려 감소의 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 IAA와 zeatin에서도 비슷해서 담배의 경우와 비교하여 증가율이 그리 크지 않았다.

담배와 벼 모두 CM의 처리에 의해서 세포분열의 증가(데이터 생략)가 관찰되었고 내생 호르몬의 변동에도 변화를 가져왔음을 알 수가 있었다. 또한 담배에 낮은 농도의 2,4-D를 처리하였을 때도 내생 호르몬 변동에 영향을 주고 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 이미 보고한 바 있는²⁷⁾ ABA의 원형질체 배양 중 변동에서와 같은 결과를 다시 확인하였다.

2. Osmotic stress

원형질체 나출부터 배양 중에 세포 내외의 삼투압 농도는 대단히 중요하다. 세포 내외의 삼투압 농도가 equilibrium상태가 되지 않으면 세포가 파괴되거나, 탈수 축압되는 현상이 나타난다¹⁶⁾. 따라서 osmoticum의 농도와 buffer의 pH 등은 원형질체 배양기술에 있어서 기본적으로 주의할 요한다.

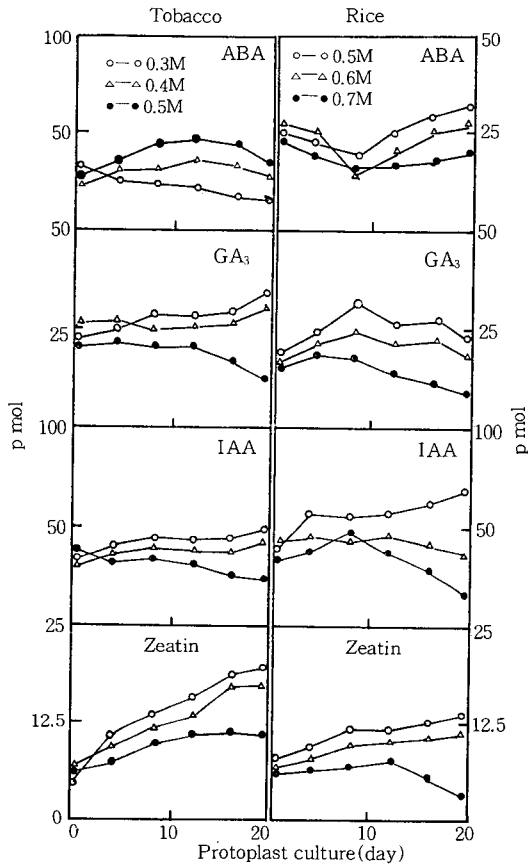


Fig. 3. Changes of hormones content on the osmotic stress induced with various mannitol concentrations.

그림 3에 표시한 바와 같이 담배의 적정 osmoticum의 농도 0.3M(mannitol), 벼는 0.5M로 하여 이보다 높은 농도 하에서 각각 배양하면서 호르몬 함량을 추적하였다. 그 결과 담배에서 ABA는 적정 농도 하에서는 앞에서 설명한 그림 2의 결과와 같이 정상적인 감소를 하였다. 그러나 농도를 0.4와 0.5M로 높였을 때 ABA는 오히려 증가하였다. 그러나 배양 10일이 지나면 감소의 결과를 나타냈다. 이러한 감소는 세포가 정상 생육이 되지 못하고 발육이 저지되거나 세포의 노화에 기인한 것이 관찰되었다. GA, IAA, zeatin의 경우도 그림 2의 결과와 비교했을 때 적정 농도 하에서 호르몬의 변동은 같은 결과이다. 그러나 인위적인 osmotic stress를 가했을 때 함량 변동은 큰 차이를 나타내었다.

뿐만 아니라 벼의 원형질체는 초기 노화가 높은 삼투압 농도에서 축진이 되었으며, 후기 생육도 대단히 불량하여 성장호르몬의 함량도 낮게 나타나고 있다. 특히 정상 생육에는 그림 2에서 zeatin 함량의 증가율이 대단히 높았는데 osmotic stress하에서 증가폭은 둔화되었다.

3. Polyamine과 NaCl 처리 영향

본 연구자 등은 원형질체 나출과 배양에서 polyamine의 처리가 효과적임을 이미 보고한 바 있다¹⁶⁾. 따라서 polyamine중 효과가 탁월한 것으로 알려진 supermine 10mM과 반대로 stress를 가할 수 있는 NaCl 0.01%를 각각 처리하여 호르몬의 변동 효과를 검색하였다.

그 결과 supermine 처리에 의해서 ABA는 성장과 비례적으로 감소, GA와 IAA, zeatin은

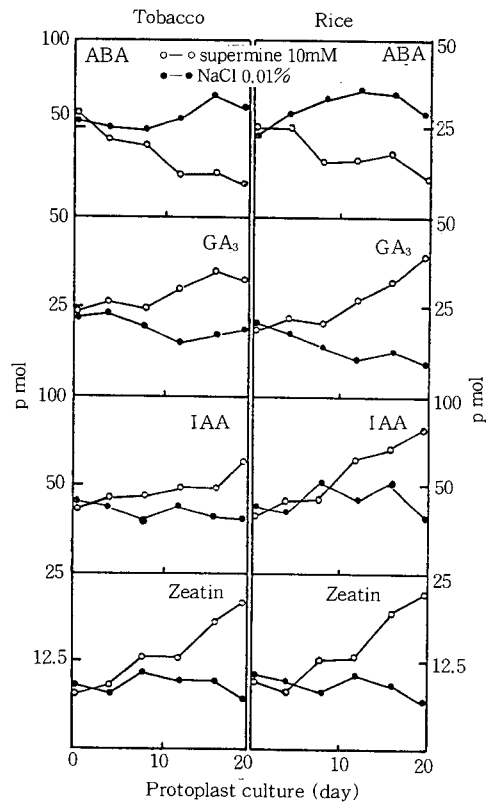


Fig. 4. Changes of hormones content on the supermine and NaCl treated in tobacco and rice protoplast.

높은 증가의 경향을 관찰할 수가 있었다. 그러나 NaCl의 처리에 의해서 원형질체는 생육이 지연되거나 시간의 노화가 심하게 나타났다. 대체로 10일 이후에는 전혀 생육이 관찰되지 못할 정도로 stress를 받았다(그림 4).

벼 원형질체 배양에 있어서도 담배와 같은 결과를 나타내었으나, NaCl에 의한 장애의 정도는 두드러지게 나타나지 않고 배양 초기에 약간의 장애가 나타났고 5일 이후부터 NaCl에 의한 장애는 거의 관찰되지 않았다.

이러한 polyamine의 효과는 supermine이 직접 호르몬에 관여하였다기 보다는 polyamine에 의해서 세포막이 안정화되며 RNase와 proteinase의 활성이 억제됨으로써 원형질체의 생존이 오래 간다는 Altman¹⁾의 보고로 해석이 가능하다.

4. 세포의 활력과 호르몬의 함량변동

세포의 활력과 호르몬의 관계를 조사한 결과를 그림 5에 표시하였다. 세포의 활력을 감소시키기 위해서 MS배지 조성 중에서 amino산과 KI를 제거하여 인위적으로 원형질체 생육을 억제시키고 배양실 온도를 32°C로 올렸다. 원형질체는 48시간 이후부터 급격하게 생존율이 떨어졌으며, 10일 이후 37%까지 떨어졌다. 원형질체 중의 내생

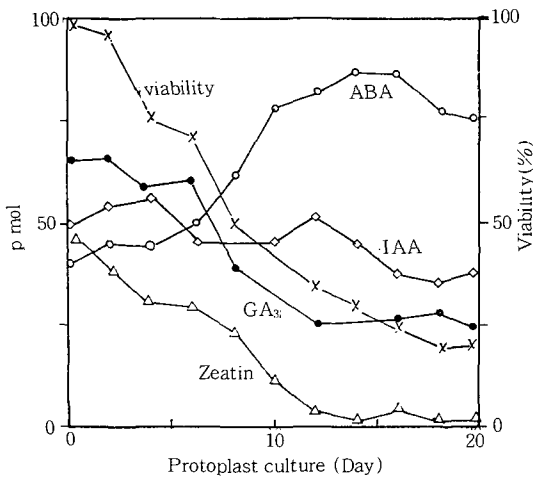


Fig. 5. Changes of hormones content and cell viability during protoplast culture in MS without amino acid and KI medium.

ABA는 원형질체의 생존을 감소와 반비례하여 급격하게 증가하였으며, 성장 호르몬인 IAA, GA는 감소하였다. 특히 zeatin은 감소율이 심하였으며, 10일 이후에는 극히 낮은 정도밖에 검출되지 않았다.

호르몬의 기기 분석에서도 분석에 간섭하는 물질이 문제지만 면역측정 특히 단클론 항체를 사용한 식물 호르몬의 정량분석의 경우에 간섭하는 물질이 문제가 된다. 일반적으로 gelatin 같은 물질은 항원 항체 결합을 양호하게 하지만 알코올 또는 여러 가지 당질은 간섭하는 물질로 알려져 있다. 특히 osmoticum으로 사용하는 mannitol 등은 많은 간섭이 있는 것으로 알려져 있다^{3,28)}. 그러나 본 연구에서는 MeOH로 추출하였기 때문에 당 성분을 제거할 수 있었으며, MeOH는 완전히 건조시켜 ELISA buffer를 가하여 분석하였다.

한편 원형질체 배양 중 본 연구와 같은 면역 측정법에 의한 여러 가지 호르몬을 동시에 분석한 경우는 거의 보고된 바가 없다. 다만 Grossman¹⁰⁾ 등에 의해서만 보고된 바 있다. 물론 이 보고도 tetracyclacis 처리에 의해서 내생 호르몬의 변동을 보고하고 있어서 본 연구와 함께 원형질체의 생존과 노화를 직접 관찰할 수 있다고 시사하고 있다.

원형질체의 노화에 관련된 식물호르몬 연구는 본 연구와 같이 억제 호르몬과 성장 호르몬을 동시에 분석 측정하는 경우는 대단히 찾아보기가 힘들다. 그러나 하나 또는 두 가지 호르몬의 분석에 호르몬 자체의 변화나 성장 상태의 판단을 시도한 보고는 많이 되어 있다^{15,29)}.

본 연구의 결과를 보면 ABA, GA₃, IAA, zeatin의 4가지 호르몬을 정량분석 하였는데, 배양 20일 동안 증감의 폭이 가장 큰 것은 ABA와 zeatin이었다. 경시적으로 보면 짧은 시간(12시간)에는 변동의 폭이 많아서 실제로 어떤 판단의 기준을 만들기는 어렵다. 반대로 20일 이후에는 벼의 경우에 별로 성장이 이루어지지 않았고 담배는 계속 성장을 하여 재분화까지 이루어졌다. 따라서 배양 초기 즉, 20일 이전의 호르몬 관찰에 의해서 원형질체의 운명을 판단할 수가 있음을

확인하였다.

배지 중에 용출된 호르몬의 측정에 의해서도 가능성은 있다. 그러나 본 연구에서는 CM을 사용하였고 CM으로부터 오염되는 호르몬이 있기 때문에 배지와 원형질체 모두를 분석에 이용하였다.

상기의 결과에 따라서 식물 호르몬의 4종 전부 또는 2종 정도의 변동을 면역측정법에 의해서 측정함으로써 원형질체의 생존과 노화의 상태를 판단할 수가 있고 이를 marker로 이용할 수 있음을 확인하였다.

적 요

작물 원형질체를 배양하면서 세포의 생존과 노화 그리고 고사의 상태를 대사적으로 정확히 판단이 가능한 marker물질을 확인하고 간편한 측정법을 확립하기 위하여 일련의 연구를 수행하였던 바 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 담배와 벼의 원형질체를 나출하여 MS와 KM-8P를 기본배지로 하여 2,4-K와 CM을 첨가하였던 바, ABA는 경시적으로 감소하였으며 CM첨가에 의해서 더 많이 감소하였다. GA₃, IAA, zeatin은 반대로 증가하는 경향을 나타내었다.
특히 ABA의 감소율과 zeatin의 증가율이 가장 크게 나타났다.
2. Osmoticum(mannitol)을 적정 농도 이상으로 처리하였을 때 ABA는 일시적으로 증가되었다가 감소되었고, 다른 성장 호르몬은 모두 증가폭이 농도가 증가될수록 둔화되었다.
3. Supermine 10mM과 NaCl을 처리하였을 때 담배와 벼에서 각 호르몬의 증감은 서로 반대로 나타났다. 특히 담배는 NaCl의 stress가 크게 나타났다. 그리고 배양 후반기에는 원형질체의 분열이 중지되었다.
4. 원형질체의 배지 성분을 제거하고 32℃로 고온 배양에 의해서 인위적으로 노화를 촉진시켰을 때 세포의 활력은 48시간 이후에 크게 감소되었다. 세포의 활력 상실과 반비례적으로 ABA는 배양 10일까지 크게 증가되었다. 이와 반대

로 성장 호르몬들은 모두 증가되지 않고 감소가 이루어졌다. 특히 zeatin의 감소가 크게 나타났다.

5. 이상의 결과에 따라서 식물 호르몬은 원형질체가 처한 환경 요인이나 부여된 어떤 조건에 따라서 민감하게 변동하고 있음을 확인하였다.

LITERATURE CITED

1. Altman A, Kaur-Sawhney R and A.W Galston 1977. Stabilization of oat leaf protoplasts through polyamine mediated inhibition of senescence. *Plant Physiol.* 60:570-574.
2. Bangerth F. 1982. Changes in the ratio of cis-trans abscisic acid fusing ripening of apple fruits. *Planta* 155:199-203.
3. Beletant H and F Fong. 1989. Abscisic acid ELISA ; Organic acid interference. *Plant Physiol.* 91:1467-1470.
4. Cocking E.E. 1960. A method for the isolation of plant protoplast and vacules. *Nature* 187:962-963.
5. Cuddihy A.E and P.J Bottino. 1982. Winged-bean protoplast; isolation culture to callus. *Plant cell, Tissue organ culture* 1:201-209.
6. Daniel S.G, D.L Rayle and R.E Cleland. 1989. Auxin Physiology of the tomato mutant diageotropica. *Plant Physiol.* 91:804-907.
7. Darvill A, M Mcneil, P Alberslceim and D.P Delmer. 1980. The primary cell walls of flowering plant. In the *Biochem. of Plants*(Academic press). 1:92-124.
8. Galun E. 1981. Plant protoplast as physiological tools. In *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32:257-266. *Ann. Rev. INC. U.S.A.*
9. David A and H David. 1979. Isolation and callus formation from cotyledon proto-

- plast of pine (*Pinus pinaster*). Z. Pflanzen-Physiol. 94:173-177.
10. Grossmann K, H.O Schmidt and J Jung. 1986. Changes in membrane permeability and mineral, phytohormone and polypeptide composition in rice suspension cells during growth retardant tetracyclis. Plant Cell Rep. 5:315-318.
 11. Guinn G. 1982. Fruit age and changes in abscisic acid content, ethylene production and abscission rate of cotton fruits. Plant Physiol. 69:349-352.
 12. Kaur-Sawhney R, W.R Adams Jr, Tsang J and A.W Galston. 1977. Leaf pretreatment with senescence retardants as a basis for oat protoplast improvement. Plant Cell Physiol. 18:1309-1317.
 13. Liu W.C and H.R Carns. 1961. Isolation of Abscisin an abscission acceleration substance. Science 134:384-385.
 14. Mathis J.N, J.A Bradburne and M.A Dupree. 1989. Gibberellic acid acid effects on greening in pea seedlings. Plant Physiol. 91:19-22.
 15. Meyer Y and Chartier. 1981. Hormonal control of mitotic development in tobacco protoplast. Plant physiol. 69:1273-1278.
 16. Min K.S, T.E Whang and C.H Bae. 1988. Senescence inhibition of protoplasts. Kor. Soc. Plant Tissue Cul. 15:1-5.
 17. _____ and _____. 1987. The fusion of protoplast of barley and bean species. Korean J. Breed. 10:(1)38-46.
 18. Nakata T and G Melchers. 1978. Surface change of protoplast and their significance in cell-cell interaction. Planta 142:235-238.
 19. Oden P.C, E.W Weiler, L Schwenen and J.E Graebe. 1987. Comparison of gas chromatography-mass spectrometry, radio-immunoassay and bioassay for the quantification of gibberellin Ag in Norway spruce (*Picea*). Planta 17:212-219.
 20. Piaggese A, P Picciarelli, B Lorenzi and A Alpi. 1989. Gibberellins in embryo-suspension of *Physelus coccineus* seeds at the beart stage of embryo development. Plant Physiol. 91:362-366.
 21. Rajasekaran K, S Vine and M.G Mullins. 1982. Dormancy in somatic embryos and seed of vitis; Changes in endogenous abscisic acid during embryogeny and germination. Plant. 154:139-144.
 22. Rodriguez A and R.S Tames. 1985. Analysis of 3-indolacetic acid and abscisic acid by high-performance liquid chromatography and gas liquid chromatography. Anal. Biochem. 146:184-190.
 23. Samet S.S and T.R Sinclair. 1980. Leaf senescence and abscisic acid leaves of field-grown soybean. Plant Physiol. 66: 1164-1168.
 24. Takebe I, G Labib and G Melchers. 1971. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. Naturwiss. 58:318-320.
 25. Thomas E. 1981. Plant regeneration from shoot culture-derived protoplasts of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* CV. Maris Bard). Plant Sci. Lett. 23:81-88.
 26. Vasil I.K, V Vasil, W.D Sutton and K.Z Giles. 1975. Protoplasts as tolls from the genetic modification of plants. In; Proceedings International Symposium Yeast and Other Protoplasts. 82. Univ. of Nottingham.
 27. Whang, T.E and H.Y Lim. 1987. Quantitative analysis of abscisic acid by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) during protoplast culture. Kor. J. Plant Tiss. Cul. 14:117-122.
 28. Wang T.L and Griggs P Cooks. 1985.

- Immunoassays for plant growth regulators—a help of a hinderance? In M Boop, ed. Plant growth substance. Springer-Verlag, Berlin, 26-34.
29. Weiler E.W, H Schabl and Hornberg. 1982. Stress related levels of abscisic acid in guard cell protoplast of *Vicia faba* L. *Planta* 154:24-28.
30. _____, J Eberie, R Nertens, R Atzorn, M Feyerabend, P.S Jourdan, A Arnscheidt and U Wiczorek. 1986. Antisera and Monoclonal antibody-based immunoassay of plant hormones. In immunology in plant science. 27-58; Cambridge Univ. Press.