

인삼 캘러스와 독활 엽육조직의 원형질체 융합

박 종 범

신라대학교 생물학과

(2007년 10월 4일 접수; 2008년 2월 5일 채택)

Protoplast Fusion of *Panax ginseng* Callus and *Aralia Continentalis* Mesophyll

Jong-Bum Park

Department of Biological Sciences, Silla University, Busan 617-736, Korea

(Manuscript received 4 October, 2007; accepted 5 February, 2008)

Abstract

Protoplasts of *Panax ginseng* C. A. Meyer and *Aralia continentalis* K. (Araliaceae) were isolated from callus cells and mesophyll cells, respectively. The maximum yield of protoplasts isolated from callus cells of *P. ginseng* were obtained by incubation for 3 hrs in the enzyme mixture of 0.5% macerozyme, 1.5% cellulase, and 0.5 M mannitol as an osmoticum. In the case of mesophyll cells of *A. continentalis*, the highest yield of protoplasts were obtained by incubation for 5 hrs in the enzyme mixture of 1% macerozyme, 2% cellulase, and 0.6 M mannitol. A polyethylene glycol (PEG) treatment induced an intergeneric fusion of the protoplasts. The fusion products, that is, heterokaryocytes were obtained by treatment of 50% PEG containing 0.05 M Ca salts.

Key Words : *Panax ginseng*, *Aralia continentalis*, Protoplast, Fusion, PEG, Heterokaryocyte

1. 서 론

1960년 토마토 근단에서 처음으로 원형질체 분리 실험¹⁾이 시도된 이래 여러 고등식물을 실험재료로 하여 여러 각도에서 연구가 진행되어 왔다. 원형질체 분리에 대한 실험이 성공한 이후 원형질체를 적당한 배지에서 배양한 결과 세포벽이 재생되고 세포분열이 일어나는 현상이 보고되었다^{2,3)}. 이후 분리한 원형질체가 세포분열한 결과 캘러스를 형성하였고, 캘러스로부터 기관분화가 일어나 식물체 재생이 성공되었음이 보고되었다^{4,5)}. 나아가 분리된 원

형질체의 융합으로 종간 혹은 속간의 잡종형성에 대한 실험이 시도되어 이에 대한 많은 보고가 있다^{6,7)}. 그러나 이 잡종형성 실험은 대부분 융합실험에 그쳤는데, 그 중 Melchers 등⁸⁾은 불화합성종인 토마토와 감자의 잡종형성을 원형질체융합 실험에서 성공하였음을 보고하였다.

이상의 연구 결과를 살펴보면, 모든 식물이 원형질체의 분리 및 배양실험에 성공된 것이 아니며, 특히 원형질체 배양에 의한 소식물체형성 실험에 성공한 연구보고는 *Nicotiana* 속⁹⁾, *Solanum* 속¹⁰⁾, *Petunia* 속¹¹⁾, *Datura* 속¹²⁾, *Hyoscyamus* 속¹³⁾, *Atropa* 속¹⁴⁾, *Capsicum* 속¹⁵⁾ 등 45여종의 가지과 식물이 추가되고 그 외에 *Daucus* 속¹⁶⁾, *Asparagus* 속¹⁷⁾, *Brassica* 속¹⁸⁾, *Citrus* 속¹⁹⁾, *Ranunculus* 속²⁰⁾ 등 총 90 여종의 식물에

Corresponding Author : Jong-Bum Park, Department of Biological Sciences, Silla University, Busan 617-736, Korea
Phone: +82-51-999-5472
E-mail: jbpark@silla.ac.kr

한정되어 있다. 최근에는 식량문제 차원에서 경제성이 있는 콩과식물²¹⁾, 곡물류^{22,23)} 및 채소류^{24~26)}, 더 나아가 산림목의 개발을 위하여 여러 목본식물^{27,28)} 등을 재료로 하여 원형질체분리 및 배양과 소식물체 형성실험에 성공한 연구결과가 보고된 바 있다.

인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 의학적, 경제적으로 매우 유용한 식물이어서 품종개량과 육종을 위하여 조직배양 등 다양한 연구들이 이루어져 왔다. 그러나 인삼은 조직배양을 통하여 완전한 식물체로의 재생이 매우 어려운 식물 중의 하나이다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 다양한 연구가 시도되고 있는데, 원형질체 배양이나 원형질체 융합 등과 같은 실험도 이런 연구 중의 하나이다. 인삼에서 조직배양과 기관재분화를 통한 식물체 재생에 대해 많은 연구들이 이루어져 왔으나 아직까지 소식물체 형성에는 성공하지 못하고 있다. 최근에는 인삼의 원형질체 분리 및 배양실험에 관한 연구결과도 보고되어 있으나 인삼과 다른 종과의 원형질체 융합 실험은 아직 보고된 바 없다. 따라서 본 연구는 인삼과 같은 과인 두릅나무과에 속하는 독활(*Aralia continentalis* K.)을 재료로 하여 인삼과 독활의 중간 잡종형성으로 소식물체형성이 가능한지 조사해 보고자 2종의 식물로부터 분리한 원형질체의 융합실험을 실시하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

4~5년생 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)의 뇌두조직편을 조직배양하여 유도한 캘러스세포와 독활(*Aralia continentalis* K.)의 잎 엽육조직세포를 실험재료로 사용하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1. 인삼 캘러스배양 및 원형질체 분리

4~5년생 인삼의 뇌두를 2% sodium hypochlorite 용액으로 약 15~20분간 표면살균하고 멸균수로 3~4회 세척한 후 두께 2 mm 크기로 절단하였다. 뇌두 절편을 MS배지에 삼식한 다음 growth chamber 속에서 25±1℃로 배양하여 캘러스조직을 유도하였으며, 캘러스조직은 4~5주 간격으로 계속 새로운 배지에 계대배양하였다. 배지는 Murashige와 Skoog²⁹⁾

의 기본배지(MS)에 식물생장물질 2,4-D 5 mg/l 와 kinetin 1 mg/l 를 첨가하여 15 l에서 20분간 고압 멸균시켰다. 인삼 캘러스세포로부터 원형질체 분리는 Park³⁰⁾의 방법에 따라 macerozyme과 cellulase 효소용액을 사용하여 원형질체 현탁액을 유도하였다. 원형질체 현탁액에 0.45 M sucrose용액과 0.45 M mannitol용액을 첨가한 다음 5분간 밀도구배 원심분리(100×g)하여 순수한 원형질체만을 순수분리하였다. 순수분리한 원형질체는 Pasteur pipette로 모아서 MS배지로 2~3회 원심분리 세척한 다음 최종적으로 원형질체의 밀도가 5×10⁴~10⁵ protoplast/ml가 되도록 조절하였다.

2.2.2. 독활 잎 엽육조직의 원형질체 분리

독활의 어린 잎을 절단하여 70% ethanol에 1분간 담근 후 2% sodium hypochlorite용액에 5분간 표면살균하고 멸균수로 3~4회 세척한 다음 중늪을 제거하고 잘게 절단하여 잎 조직편을 얻었다. Petri dish에 잎 조직편 1 g과 macerozyme 및 cellulase용액 10 ml을 넣고 적당시간 진탕하여 원형질체 현탁액을 얻었으며 이로부터 인삼 캘러스의 원형질체 분리실험과 같은 방법에 의해 원형질체를 순수분리하였다.

2.2.3. 원형질체 융합

인삼 캘러스세포에서 분리한 원형질체와 독활 잎 엽육조직에서 분리한 원형질체를 각각 5 ml씩 혼합시킨 용액 0.5 ml을 petri dish에 넣고 약 20~30분 방치하여 원형질체가 안정되게 한 후 융합촉진제인 polyethylene glycol (PEG)용액을 소량 천천히 첨가하였다. 융합된 원형질체는 실온에서 30분간 방치한 다음 2 ml MS배지를 첨가하고, 30분 후 다시 2 ml MS배지를 첨가하여 PEG용액을 희석시켰다. 이 희석용액을 5분간 원심분리(100×g)하여 상등액은 제거하고 침전물만을 MS배지에 넣어서 현탁배양을 하였다. 융합촉진제인 PEG용액의 조성은 500 g/l PEG (M.W. 3350)에 0.5 M mannitol과 0.05 M CaCl₂ · 2H₂O를 혼합한 용액으로 pH는 5.8로 조절한 것이다.

3. 결 과

3.1. 인삼 캘러스세포의 원형질체 분리

인삼 캘러스세포로부터 원형질체를 분리하기 위하여 pectin의 분해효소인 macerozyme과 cellulose의

분해효소인 cellulase를 사용하였다. Macrozyme의 효과를 조사한 결과, 0.5% 농도에서 3시간 동안 처리하였을 때가 가장 효과적이었으며, 이 때 평균 1.7×10^6 개의 원형질체를 얻을 수 있었다(Fig. 1). 그러나 3시간 이상의 효소처리에서는 원형질체의 수가 점차 감소되어 효과적이지 못하였는데, 특히 7시간 처리에서는 6.8×10^5 개로 상당히 줄어들었다.

Cellulase는 1.5% 농도에서 3시간 처리하였을 때 매우 효과적이었으며 평균 1.7×10^6 개의 원형질체를 분리할 수 있었다(Fig. 2). Macrozyme에서와 마찬가지로 3시간 이상의 cellulase처리에서는 원형질체가 점차 감소되어 7시간 처리 후에는 7.4×10^5 개로 매우 감소하였다.

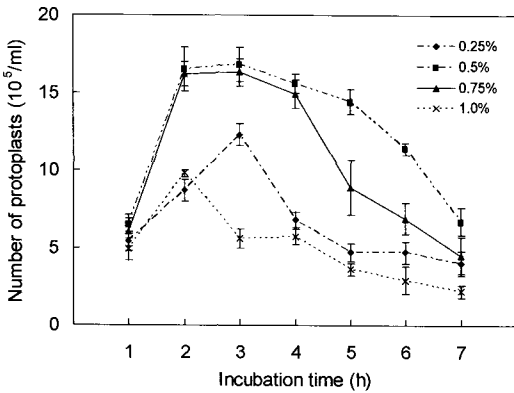


Fig. 1. Effect of macrozyme concentration and incubation time on the efficiency of protoplast isolation from *Panax ginseng* callus tissue.

원형질체를 분리하는 동안 효소용액의 삼투농도를 유지시켜 주기 위하여 삼투안정제로 D-mannitol을 사용하였는데, mannitol은 0.5 M 농도에서 가장 많은 양의 원형질체를 얻을 수 있어 이 농도가 최적 삼투농도임을 알 수 있었다(Fig. 3).

3.2. 독활 잎 엽육조직의 원형질체 분리

독활 잎의 엽육조직으로부터 원형질체를 분리하기 위하여 사용한 macrozyme과 cellulase의 효과를 조사한 결과, macrozyme은 1% 농도에서 5시간 동안 처리하였을 때 평균 7.4×10^5 개의 많은 원형질체를 얻을 수 있어서 가장 효과적이었다(Fig. 4). 그러나 5시간 이상의 효소처리에서는 오히려 분리된 원형질체의 양이 점차 감소되었다.

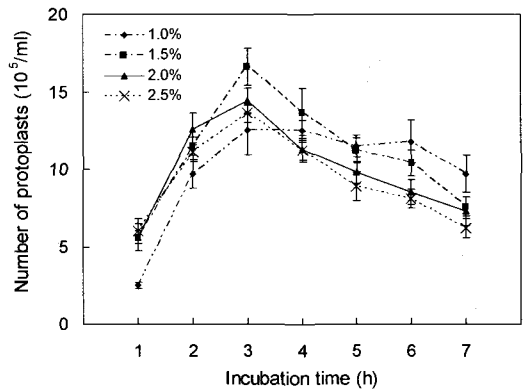


Fig. 2. Effect of cellulase concentration and incubation time on the efficiency of protoplast isolation from *Panax ginseng* callus tissue.

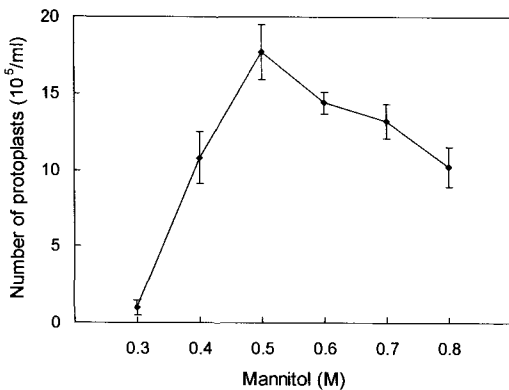


Fig. 3. Effect of mannitol concentration on the yield of protoplast from *Panax ginseng* callus tissue.

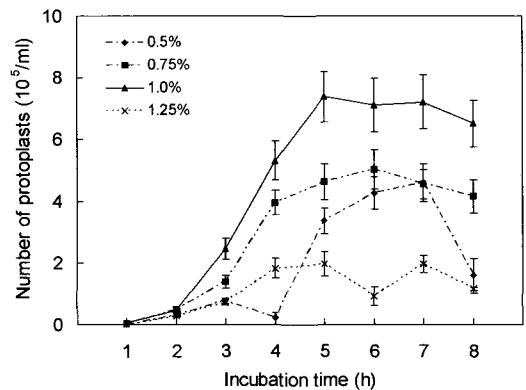


Fig. 4. Effect of macrozyme concentration and incubation time on the efficiency of protoplast isolation from *Aralia continentalis* mesophyll tissue.

Cellulase는 2% 농도에서 5시간 처리하였을 때 평균 7.5×10^5 개로 가장 많은 양의 원형질체를 얻을 수 있었다(Fig. 5). 그러나 5시간 이상의 효소처리에서는 원형질체의 양이 점차 감소되었다.

캘러스세포와 마찬가지로 삼투안정제로는 D-mannitol을 사용하였는데, mannitol의 농도별 효과를 조사한 결과, 0.6 M 농도에서 가장 많은 양의 원형질체를 분리할 수 있어 이 농도가 최적 삼투농도임을 알 수 있었다(Fig. 6).

3.3. 인삼 및 독활 원형질체의 융합

인삼 캘러스 원형질체와 독활 잎 엽육조직 원형질체를 융합시키기 위하여 일반적으로 가장 많이

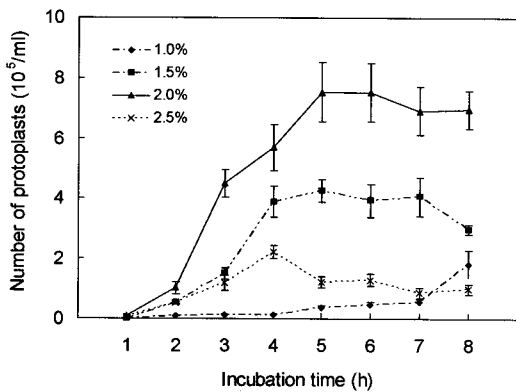


Fig. 5. Effect of cellulase concentration and incubation time on the efficiency of protoplast isolation from *Aralia continentalis* mesophyll tissue.

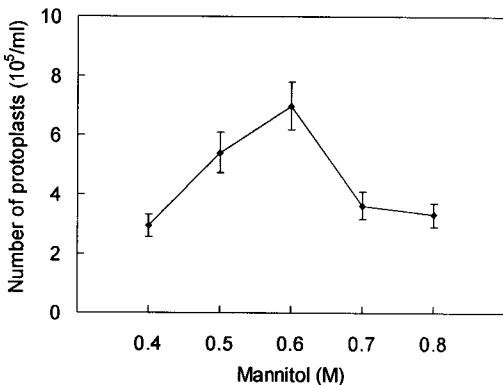


Fig. 6. Effect of mannitol concentration on the yield of protoplast from *Aralia continentalis* mesophyll tissue.

사용되고 있는 융합촉진제인 PEG와 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 을 사용하였는데, 이 방법은 원형질체가 Ca^{2+} 이온 속에서 응집되는 성질을 이용한 것이다. 인삼 캘러스세포로부터 분리한 원형질체들은 조밀한 세포질을 보여주었으며, 크기는 직경 25~65 μm 로 다양하였다(Fig. 7a). 독활 잎 엽육세포로부터 분리한 원형질체는 세포질 주변부위에 엽록체가 풍부하게 존재하고 있었으며, 그 크기는 평균 직경 $20.4 \pm 2.5 \mu m$ 로 대체로 균일하였다(Fig. 7b). 두 종류의 원형질체 간의 융합은 원형질체 간의 응집, 유착 및 융합과정을 거쳐 이루어진다. 본 실험에서는 먼저 PEG에 의해 인삼 캘러스 원형질체와 독활 잎 엽육조직 원형질체 상호 간에 강력한 응집과 유착이 생겼다(Fig. 7c). 다음으로 PEG용액을 MS배지로 희석하는 동안에 인삼 캘러스 원형질체와 독활 잎 엽육조직 원형질체 간에 융합이 일어나면서(Fig. 7d) 점차 한쪽 원형질체의 세포질이 다른 쪽 원형질체의 세포질 속으로 들어갔으며(Fig. 7e), 마지막으로 완전한 원형질체 융합체인 heterokaryocyte가 형성되었다(Fig. 7f).

4. 고 찰

인삼 캘러스 및 독활 엽육조직으로부터 원형질체를 분리하기 위하여 macerozyme과 cellulase 2종류의 효소를 본 실험에 사용하였다. Macerozyme은 식물과 조직에 따라 0.05%~2% 농도로 사용되고 있는데, 인삼 캘러스세포에서는 0.5%, 독활 엽육조직에서는 1% macerozyme이 원형질체 분리에 효과적인 농도였다(Figs. 1, 4). 이것은 여러 식물 및 조직에서 0.5%^{23,31,32} 또는 1%^{18,28,33}의 macerozyme이 원형질체 분리에 효과적이라는 연구 보고들과 일치하는 결과이다. Cellulase는 0.5%~5%의 농도가 사용되고 있는데, 인삼 캘러스세포에서는 1.5%, 독활 엽육조직에서는 2% 농도가 원형질체 분리에 효과적이었다(Figs. 2, 5). 이것은 여러 식물이나 조직에서 원형질체 분리를 위해 1%^{31,33,34} 또는 2%^{32,35,36}의 cellulase를 사용한 연구보고들과 매우 유사한 결과이다. 반면, 현탁배양세포로부터 원형질체를 분리하는 데에는 3% macerozyme과 3% cellulase가 효과적이라는 연구보고도 있다³⁷.

원형질체 분리에 소요되는 효소 처리시간은 식물

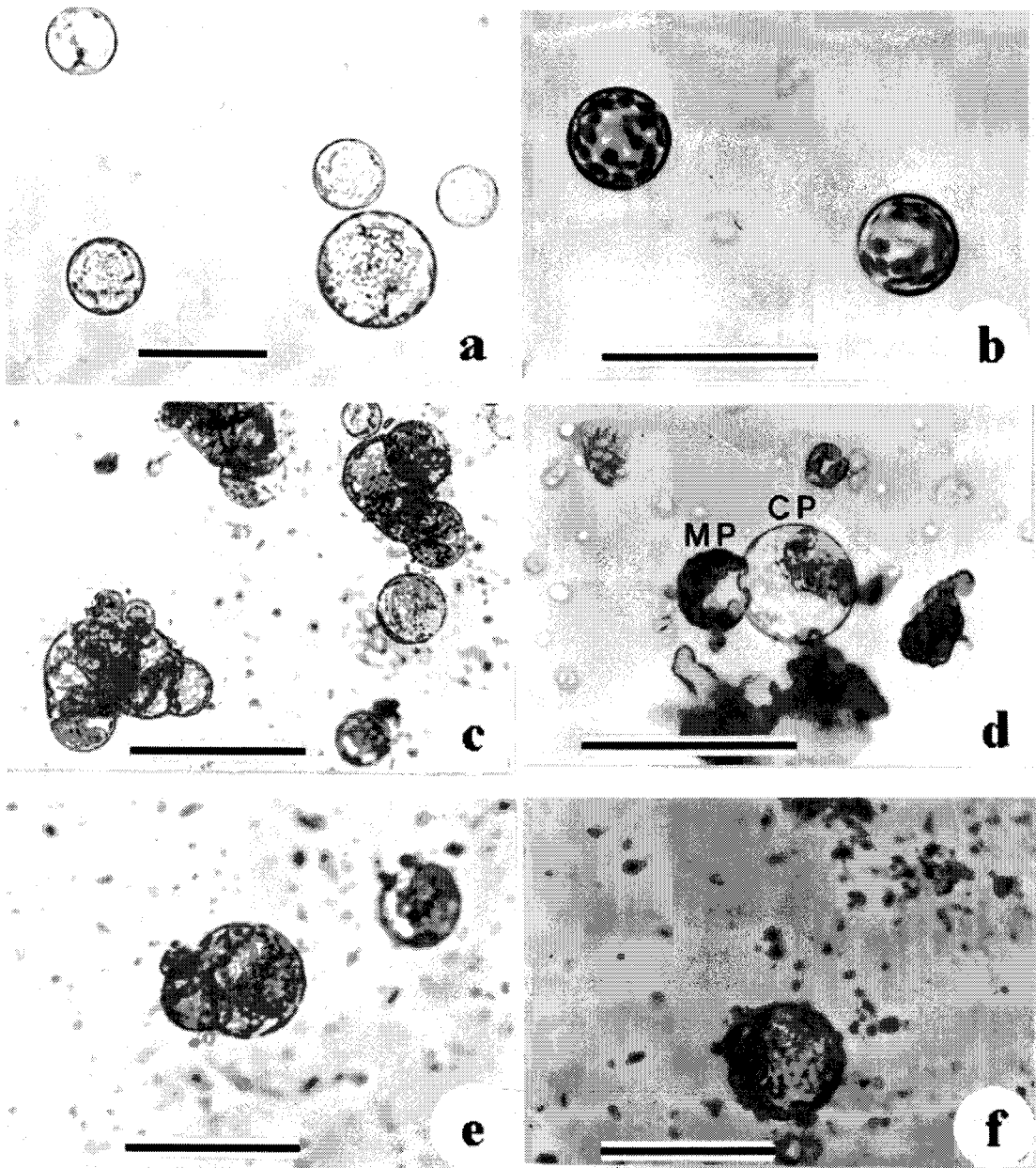


Fig. 7. Fusion of isolated protoplasts from *Panax ginseng* callus and *Aralia continentalis* mesophyll tissue. a, Protoplasts isolated from *P. ginseng* callus tissue; b, Protoplasts isolated from *A. continentalis* mesophyll tissue; c, Adherence of callus protoplasts and mesophyll protoplasts; d, Fusion of callus protoplast (CP) and mesophyll protoplast (MP); e, Heterokaryocyte formed by fusion of callus and mesophyll protoplast; f, Fusion product of callus and mesophyll protoplast. Bars=50 μ m.

이나 조직의 종류에 따라 많은 차이가 있는데, *Avena sativa* 자엽초³⁸⁾에서는 1~2시간 소요된 반면,

당근 캘러스²⁾에서는 10~12시간 소요되었다. 본 실험에서는 인삼 캘러스세포에서 많은 양의 원형질체

를 분리하기 위해 0.5% macerozyme과 1.5% cellulase가 혼합된 효소용액에서 3시간이 소요되었는데 (Figs. 1, 2), 이러한 결과는 배양한 담배세포를 2~3 시간 동안 효소처리하여 약 30%의 원형질체를 얻었다는 보고³⁹⁾와 고구마 캘러스세포를 3시간동안 효소 처리하여 많은 양의 원형질체를 분리한 연구보고²³⁾와 일치하고 있다.

한편, 독활 엽육조직에서 원형질체를 분리하는 데에 1% macerozyme과 2% cellulase가 혼합된 효소용액에서 5시간이 소요되었는데(Figs. 4, 5), 이는 담배 엽육세포를 4~6시간 효소처리하여 원형질체를 분리한 연구결과⁴⁾와 *Brassica juncea* 엽육조직을 5시간 효소처리하여 원형질체를 분리한 보고³⁴⁾ 및 *Digitalis obscura*의 엽육조직을 5시간 효소처리하여 원형질체를 분리하였다고 연구보고³¹⁾와 거의 유사한 결과이다.

인삼 캘러스세포의 효소처리에서 3시간 이상, 그리고 독활 엽육조직에서는 5시간 이상 등 적당시간 이상 처리하였을 때 오히려 분리된 원형질체의 양이 감소하는 결과가 관찰되었다(Figs. 1, 2, 4, 5). 이러한 결과는 Schenk와 Hildebrandt⁴⁰⁾에 따르면 효소내에 저분자량 물질이 상당히 존재하고 있어 이 물질이 효소용액 내의 삼투농도를 증가시키기 때문에 오랜 시간의 효소처리 동안에 어떤 독성을 나타냈기 때문으로 생각된다고 보고하였다.

원형질체의 삼투안정제로 D-mannitol을 사용하였는데, 이들의 최적 삼투농도는 0.3 M~0.8 M까지 다양하게 사용되고 있다. 인삼 캘러스세포에서는 0.5 M, 그리고 독활 엽육조직에서는 0.6 M mannitol이 원형질체분리에 최적 삼투농도인 것으로 나타났다(Figs. 3, 6). 이것은 식물 및 조직에 따라 다소 차이는 있으나 일반적으로 캘러스나 현탁세포같은 배양세포에서 원형질체 분리를 할 때 0.5 M이 최적 삼투농도라는 보고^{12,37)}와 잎의 엽육조직에서 원형질체를 분리할 때에는 0.6 M이 최적 삼투농도라는 보고^{34,41)}와 잘 일치하고 있다.

본 실험에서는 배양세포인 인삼 캘러스세포보다 생세포인 독활 엽육세포에서 원형질체분리에 더 높은 농도의 효소용액이 요구되었고 또한 효소용액 처리시간도 더 많이 소요되었다. 식물의 종이나 조직의 원형질체 분리에 영향을 미치는 요인들로서

효소의 종류나 농도, 처리시간 외에도 식물체 및 조직의 생리적 상태, 효소용액의 pH, 온도, 효소용액의 부피와 세포 양 등을 들 수 있다. 따라서 식물의 종이나 조직에 따라 원형질체 분리에 요구되는 효소의 농도와 효소 처리시간 및 삼투안정제의 농도가 다른 것은 식물의 종이나 조직을 구성하는 생리적 상태나 여러 환경조건이 각각 다르다는 사실에 기인되기 때문인 것으로 사료된다.

인삼 캘러스세포의 원형질체와 독활 엽육세포 원형질체의 융합을 촉진시키기 위하여 PEG용액에 Ca염을 첨가하였는데, 배양액의 pH가 높을 때 Ca^{2+} 를 첨가하면 원형질체 융합이 촉진된다는 연구보고^{33,42)}가 있다. 원형질체 융합촉진제인 PEG의 작용기작에 대해서는 원형질막을 해리시켜 분자간 교량역할을 함으로써 세포간 연결을 촉진시킨다고 알려져 있다^{43,44)}. 그러나 이러한 PEG에 의한 융합산물인 인삼과 독활의 잡종융합체를 배양하여 지속적인 세포분열에 의하여 캘러스덩어리가 형성되고 기관이 분화하여 잡종 소식물체로 발달되는 데에는 잡종융합체의 융합비율을 높이고 이들만을 선별할 수 있는 방법과 잡종융합체의 배양에 필요한 적정배지 및 배양 조건 등 해결해야 할 문제점들이 많이 남아있으므로 앞으로 더 많은 연구가 수행되어야 할 것이다.

5. 결 론

두릅나무과의 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)과 독활(*Aralia continentalis* K.)의 원형질체를 캘러스세포와 엽육세포에서 각각 분리시켰다. 인삼 캘러스세포에서는 0.5% macerozyme, 1.5% cellulase 및 0.5 M mannitol이 혼합된 효소용액에서 3시간 동안 처리하였을 때 가장 많은 양의 원형질체를 얻을 수 있었다. 독활 엽육세포에서는 1% macerozyme, 2% cellulase 및 0.6 M mannitol을 첨가한 효소용액에서 5시간 처리하였을 때 가장 많은 양의 원형질체를 얻을 수 있었다. 분리한 2종의 원형질체에 polyethyleneglycol(PEG)을 처리하여 속간 융합체를 유도하였는데, 0.05 M Ca염이 포함된 50% PEG처리를 하였을 때 완전한 원형질체 융합체인 heterokaryocyte를 얻을 수 있었다.

참고 문헌

- 1) Cocking E. C., 1960, A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles, *Nature*, 187, 962-963.
- 2) Grambow H. J., Kao K. N., Miller R. A., Gemborg O. L., 1972, Cell division and plant development from protoplasts of carrot cell suspension culture, *Planta*, 103, 348-355.
- 3) Horine R. K., Ruesink A. W., 1972, Cell wall regeneration around protoplasts isolated from *Convolvulus* tissue culture, *Plant Physiol.*, 50, 438-445.
- 4) Shepard J. E., Totten R. E., 1975, Isolation and regeneration of tobacco mesophyll cell protoplasts under low osmotic conditions, *Plant Physiol.*, 55, 689-694.
- 5) Gresshoff P. M., 1980, In vitro culture of white clover, callus, suspension, protoplast culture, and plant regeneration, *Bot. Gaz.*, 141, 157-164.
- 6) Evans D. A., Flick C. E., 1980, Somatic hybrid plants between species of the genus *Nicotiana*, *In vitro*, 16, 217.
- 7) Gleba Y. Y., Monot V. P., Cherep N. N., Skarzynskaya M. V., 1982, Intertribal hybrid cell lines of *Atropa belladonna* (x) *Nicotiana chinensis* obtained by cloning individual protoplast fusion products, *Theor. Appl. Genet.*, 62, 75-79.
- 8) Melchers G., Sacristan M. D., Holder A. A., 1978, Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts, *Carlsberg Res. Commun.*, 43, 203-218.
- 9) Flick C. E., Evans D. A., 1983, Isolation, Culture, and plant regeneration from protoplasts isolated from flower petals of ornamental *Nicotiana* species, *Z. Pflanzenphysiol.*, 109, 379-382.
- 10) Nelson R. S., Creissen G. P., Bright S. W. J., 1983, Plant regeneration from protoplasts of *Solanum brevifolium*, *Plant Sci. Lett.*, 30, 355-362.
- 11) Power J. B., Frearson E. M., George D., Evans P. K., Berry S. F., Hayward C., Cocking E. C., 1976, Isolation, culture and regeneration of leaf protoplasts in the genus *Petunia*, *Plant Sci. Lett.*, 7, 51-55.
- 12) Mii M., Seeni S., Fowke L. C., King J., 1985, The isolation and cultivation of protoplasts from cell suspensions of a pantothenate-requiring auxotroph of *Datura*, *Can. J. Bot.*, 63, 779-783.
- 13) Kohlenbach H. W., Bohnke E., 1975, Isolation and culture of mesophyll protoplasts of *Hyoscyamus niger* L. var. *annuus* Sims., *Experientia*, 34, 1281-1283.
- 14) Gosch G., Bajaj Y. P. S., Reinert J., 1975, Isolation, culture and induction of embryogenesis in protoplasts from cell suspensions of *Atropa belladonna*, *Protoplasma*, 86, 405-410.
- 15) Saxena P. K., Gill R., Rashid A., Maheshwari S. C., 1981, Isolation and culture of protoplasts of *Capsicum annum* L., *Protoplasma*, 103, 357-361.
- 16) Binding H., Nehls R., Kock R., Finger J., Mordhorst G., 1981, Comparative studies on protoplast regeneration in herbaceous species of the Dicotyledoneae class, *Z. Pflanzenphysiol.*, 101, 119-130.
- 17) Bui-Dang-Ha D., Mackenzie I. A., 1973, The division of protoplasts from *Asparagus officinalis* L. and their growth and differentiation, *Protoplasma*, 78, 215-221.
- 18) Robertson D., Earle E. D., 1986, Plant regeneration from leaf protoplasts of *Brassica oleracea* var. *italica* cv. Green Comet broccoli, *Plant Cell Reports*, 5, 61-64.
- 19) Vardi A., Speigel-Roy P., Galun E., 1982, Plant regeneration from *Citrus* protoplasts: Variability in methodological requirements among cultivars and species, *Theor. Appl. Genet.*, 62, 171-176.
- 20) Dorion N., Chupeau Y., Bourgin J. P., 1975, Isolation, culture and regeneration into plants of *Ranunculus sceleratus* L. leaf protoplasts, *Plant Sci. Lett.*, 5, 325-331.
- 21) Durieu P., Ochatt S. J., 2000, Efficient intergeneric fusion of pea (*Pisum sativum* L.) and grass pea (*Lathyrus sativus* L.) protoplasts, *J. Exp. Bot.*, 51, 1237-1242.
- 22) Szabados L., Gaggero C., 1985, Callus formation from protoplasts of a sugarbeet cell suspension culture, *Plant Cell Reports*, 4, 195-198.
- 23) Nishimaki T., Nozue M., 1985, Isolation and culture of protoplasts from high anthocyanin-producing callus of sweet potato, *Plant Cell Reports*, 4, 248-251.
- 24) Liu F., Ryschka U., Marthe F., Kloche E., Schumann G., Zhao H., 2007, Culture and fusion of pollen protoplasts of *Brassica oleracea* L. var. *italica* with haploid mesophyll protoplasts of *B. rapa* L. ssp., *Protoplasma*, 231, 89-97.
- 25) Hu Q., Hansen N., Laursen J., Dixelius C., Andersen B., 2002, Intergeneric hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus* containing traits of agronomic importance for oilseed rape breeding, *Theor. Appl. Genet.*, 105, 834-840.
- 26) Wang Y. P., Sonntag K., Rudloff E., 2003, Development of rapeseed with high erucic acid content by asymmetric somatic hybridization between *Brassica napus* and *Crambe abyssinica*, *Theor. Appl. Genet.*, 106, 1147-1155.
- 27) Vardi A., Hutchison D. J., Galun E., 1986, A protoplast-to-tree system in *Microcitrus* based on protoplasts derived from a sustained embryogenic callus, *Plant Cell Reports*, 5, 412-414.
- 28) Gupta P. K., Durzan D. J., 1986, Isolation and cell regeneration of protoplasts from sugar pine, *Plant Cell Reports*, 5, 346-348.

- 29) Murashige T., Skoog F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- 30) Park J. B., 1998, An electron microscopic study on the cell wall regeneration of cultured *Panax ginseng* callus protoplast, *Kor. J. Plant Tissue Culture*, 25, 495-500.
- 31) Brisa M. C., Segura J., 1987, Isolation, culture and plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Digitalis obscura*, *Physiol. Planta.*, 69, 680-686.
- 32) Hou S. W., Jia J. F., 2004, Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic calli of the forage legume *Astragalus melilotoides* Pall., *Plant Cell Reports*, 22, 741-746.
- 33) Jiang S. H., Guan R. Z., Tang S. Y., Xin R. Y., Zhang H. S., Zhao L. Q., Pan Q. Y., 2007, Somatic hybrids between *Rorippa indica* (Linn.) Hiern and *Brassica napus* L. through protoplast-fusion system, *Yi Chuan*, 29, 745-750.
- 34) Chatterjee G., Sikder S. R., Sen S. K., 1985, Regeneration of plantlets from mesophyll protoplasts of *Brassica juncea* (L.) Czern., *Plant Cell Reports*, 4, 245-247.
- 35) Kamlesh R. P., Shekhawat N. S., Berlyn G. P., Thorpe T. A., 1984, Isolation and culture of protoplasts from cotyledons of *Pinus coulteri* Don., *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 3, 85-90.
- 36) Barakat M. N., Cocking E. C., 1985, An assessment of the cultural capabilities of protoplast of some wild species of *Linum*, *Plant Cell Reports*, 4, 164-167.
- 37) Du L., Bao M., 2005, Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic suspension cultured cells of *Cinnamomum camphora* L., *Plant Cell Reports*, 24, 462-467.
- 38) Ruesink A. W., Thimann K. V., 1965, Protoplasts from the *Avena* coleoptile, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 54, 56-64.
- 39) Uchimiyama H., Murashige T., 1974, Evaluation of parameters in the isolation of viable protoplasts from cultured tobacco cells, *Plant Physiol.*, 54, 936-944.
- 40) Schenk R. U., Hildebrandt A. C., 1969, Production of protoplasts from plant cells in liquid culture using purified commercial cellulase, *Crop Sci.*, 9, 629-631.
- 41) Takebe I., Nagata T., 1984, Isolation and culture of protoplasts: Tobacco. In *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, Vasil, I. K. (ed.), Academic Press Inc. London, 328-339pp.
- 42) Keller W. A., Melchers G., 1973, The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion, *Z. Naturforsch.*, 280, 737-741.
- 43) Kao K. N., Michayluk M. R., 1974, A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts, *Planta*, 115, 355-367.
- 44) Yamagishi H., Landgren M., Forsberg J., Glimelius K., 2002, Production of asymmetric hybrids between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* utilizing an efficient protoplast culture system, *Theor. Appl. Genet.*, 104, 959-964.