

백합(*Lilium longiflorum* THUNB.)의 원형질체 분리 및 배양조건 설정

박수영 · 부지현 · 송관필 · 한태완 · 김성철 · 허인옥¹

Determination of culture condition and isolation of protoplast in *Lilium*

Park, Soo Young · Bu, Ji Hyun · Song, Gwan Pil · Han, Tae Wan
· Kim, Seong Cheol · Heo, In Ok¹

This study was carried out isolation and culture of protoplast from mesophyll tissues of lily(*Lilium longiflorum* Thunb), and protoplast fusion of Georgia and Macro polo for breeding of lily. The yield of protoplasts was the highest when cells are incubated in the enzyme solution of 0.5M mannitol, 1.0% Onozuka cellulase R-10, 1.0% Macerozyme R-10, and 0.1% Pectolyase for treatment of 2~3 hours. The protoplasts were most effectively cultured in the modified 1/2 MS medium without NH_4NO_3 with 1.0mg/L NAA and 1.0mg/L BAP, and also protoplasts survived the best on stabilized liquid layer. Colonies were obtained after 1 month of culture. The calli grew and regenerated shoots by transferring them on the same composition of the solidified medium. The protoplast fusion was performed with the PEG methods. The yield of protoplast fusion was the highest in the 50% PEG concentration treated for 20 minutes.

Lilium 속은 백합과에 속하는 단자엽 식물로 전세계적으로 130여 종이 알려지고 있으며 꽃의 모양이나 꽃색이 아름다워 널리 이용되고 있다(김 등, 1990).

백합은 외부 인편이 없이 다만 인편이 겹쳐 있는 무피인경(인편상인경, Scaly bulb)에 속하며, 신품종 육종은 주로 교잡에 의해 이루어져 왔으나 자가불화합성 때문에 최근에는 체세포를 이용한 품종개발이 시도되고 있다. 한편 원형질체의 배양은 유전적으로 순수한 단세포성 조직을 얻을 수 있으므로 cell line의 선택이 가능하게 되며, 동일한 유전적 조성을 갖는 세포를 다량으로 획득할 수 있는 이점이 있어 이들 세포의 대량생산 및 신품종 육종에 이용가치가 큰 것으로 알려지고 있다(정 등, 1995). 체세포에서 유래된

원형질체배양에 대해서는 이미 여러 식물에서 성공적으로 수행되어 원형질체로부터 완전한 식물체로의 재분화가 이루어진 바 있다(Gamborg 등, 1973 : Gleba 등, 1984). 그러나 원형질체 배양에 요구되는 조건과 그 배양법은 아주 중요한 요인이 되고 있는데, 특히 배양배지의 조성과 식물호르몬의 선택이 결정적인 경우가 많다. Nagata와 Takebe(1971)는 담배(*N.tabacum* L.cv. Xanthi)엽육 원형질체 배양에서 MS기본배지의 무기염류 양을 일부 조정된 배지를 사용하여 식물호르몬 NAA와 BAP를 첨가시켜 원형질체의 세포분열 유도에 성공한 바 있다.

백합은 1950년대 조직배양에 의한 대량생산의 가능성이 보고된 이래(Emsweller, 1957) 여러 부위로부터

조직배양에 의한 육종가능성이 보고되는 등 많은 연구가 이루어졌으며(Simmonds 등, 1976). 종·속간 교배와 배배양에 의한 품종개량이 시도되고 있으나 원형질체 분리 및 배양에 관한 연구는 거의 없는 실정이다(최, 1994).

이에 본 연구는 백합의 원형질체 분리, 배양 조건을 설정하고 원형질체 융합을 시도함으로써 신품종 육성의 기초자료로 삼고자 실시하였다.

재료 및 방법

원형질체 분리 및 정제

본 연구에 사용된 백합(*Lilium longiflorum* Thunb)은 제주농업시험장 조직배양실에서 생장점 배양을 거쳐 기내에서 인편 배양 중인 건강한 시료를 분양 받아 사용하였다. 원형질체 분리는 먼저 Georgia의 염육조직을 얇게 자른 후, 효소용액 농도(0.5, 1.0, 1.5% Cellulase, 0.5, 1.0, 1.5% Macerozyme, 0, 0.1, 0.2% Pectolyase)를 각각 달리하여 처리하였고, CPW용액을 원형질체의 전처리, 세척제로 사용하였으며(Frearsen 등, 1973), 효소 용액내 첨가물로써 MES를 사용하였다. 그리고 효소를 28°C인 곳에서 2~3시간 정도 암 처리 후 각각의 재료를 pore직경이 45µm 되는 철망으로 세포피를 제거시켜 원심분리(500rpm, 6분)를 하여 상정액을 제거시켰다. 얻어진 원형질체에 CPW 21% sucrose 용액을 가하여 혼탁시킨 후 CPW 9% mannitol 용액을 첨가하여, 원심분리(700rpm, 10분)를 한 후 sucrose 용액과 mannitol 용액 사이에 떠 있는 원형질체를 채취하여 혈구측정기를 이용하여 그 밀도를 조사하였다.

원형질체 배양

원형질체 배양조건을 알아보기 위한 배양배지로는 MS배지를 기본배지로 하여 1/2 MS배지와 NH₄NO₃가 첨가되지 않은 1/2 MS수정배지를 사용하였다. 삼투조절은 0.5~0.7M의 mannitol, 1.0~1.3%의 sucrose을 첨가하였으며, 초기배양에 이용한 호르몬 농도는 1.0mg/L NAA와 1.0mg/L BAP, 1.0mg/L zeatin을 사용하였다. 배양방법으로는 액체배지(Kao 등, 1971), 반고체배지(Cella 등, 1980), 그리고 액체배지와 고체배지(Ahuja 등, 1983)를 동시에 이용하는 방법 등을 병행하여 실시하였다. 원형질체 초기분열 이후의 배양은 25±2°C, 2,000Lux, 광주기 16/8시간으로 유지하면서 세포분열 및 분화를 유도하였다. 계대배양은 1주일을 주기로 하였으며, 삼투조절제인 mannitol 농도를 점차 줄여 나갔다. 배양 5주 후 형성된 세포피는 새로운 배지로 옮겨 캘러스를 유도하였다.

원형질체 융합

인편 배양에서 얻은 Longiflorum 계통의 Georgia 캘러스와 Oriental계통의 Marco Polo 염육조직에서 분리된 각각의 원형질체를 1:1로 혼합한 후 배양배지를 가해 원심분리(500rpm, 5분)하여 상정액을 제거시켰다. 배양배지와 pellet을 10:1 비율로 섞어 혼탁시킨 다음 petri dish(55×15mm)에 1~2방울 정도 떨어뜨려 5분간 방치 후 PEG solution(Table 1)을 원형질체의 표면 위에 1~2방울 떨어뜨려 8분간 처리하였다. 그리고 다시 Solution A와 Solution B의 용액을 9:1로 하여 12분간 처리한 후 배양배지를 가하면서 서서히 PEG 용액을 제거시켰다(Grosser 등, 1990). 최종적으로 배양배지를 12~15방울 정도 더 떨어뜨려

Table 1. Composition of PEG solution for the fusion of protoplasts

Composition	PEG solution	Solution A	Solution B
PEG(MW 1.450)	50 g/100mL		
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.97 g/100mL	0.97g/100mL	
Glucose	5.41 g/100mL	7.2g/100mL	
DMSO		10mL/100mL	
Glycine			2.25 g/100 mL
pH	6.0	6.0	10.5

1mm의 두께로 얇게 썬다. parafilm으로 밀봉한 후 배양온도를 28°C로 하여 암배양하였다.

결과 및 고찰

원형질체 분리 및 정제

원형질체 분리를 위한 효소처리에 따른 결과(Table 2)로서, 효소농도 처리별 원형질체의 수율을 보면 효소농도 1.0% cellulase, 1.0% macerozyme, 0.2% pectolyase 에서 가장 좋았고 또한 0.1% pectolyase 일 때도 효소 처리 시간이 2~3시간대로 수율이 높게 나타났다. 그러나 효소농도가 증가함에 따라 생존율이 감소하는 경향을 보였으므로 효소농도 0.1% cellulase, 0.1% macerozyme, 0.1% pectolyase를 효소 적정 농도로 선택하였다. 재료의 조제에 있어서는 잎의 크기와 효소 용액내에 침지시의 크기도 수율에 큰 영향을 주었는데 재료의 잎 크기가 클수록 그리고 얇게 절단될수록 유리가 잘 되었고, 처리 시간도 단축되었다. 그러나 처리 시간이 3시간 이상 지속되자 유리된 원형

질체는 활력이 감소되어 원형질체 정제시 수율이 급격히 낮아짐을 보였다.

효소용액이 원형질체의 수율에 미치는 영향을 보면 삼투조절제와 효소 용액내 첨가물이 중요하게 작용하게 되는데, 본 실험에서는 삼투조절제로서 0.5M mannitol 이 적정 농도로 나타났으며(Table 3), 이는 杉浦(1993)의 보고와 일치하였다. 보통 재료에 따라 mannitol, sorbitol, sucrose, glucose등을 사용하는데 이러한 처리 목적은 원형질 분리를 일으켜 원형질막과 세포벽이 유리, 격리되면서 보다 용이하게 원형질체가 나출되도록 하고, 효소용액의 세포내 침투를 억제시켜 나출된 원형질체의 자발적 융합을 방지하기 위한 것이다(Evans 등, 1983). 효소내 첨가물로는 MES 6mM를 사용하였는데, 효소 용액내에 한 종류 또는 수 종류의 유기물과 무기물을 첨가함으로써 원형질체의 안정성과 파열을 방지하여 건전한 원형질체를 얻을 수 있다. 꽃 토마토에 BSA, PDS나 MES을 첨가했을 때 원형질체의 수량이 현저히 증가되어 효과적이었다고 보고 한 바 있다(Verma 등, 1983).

원형질체 유리시 온도 역시 상당히 중요한 요인 중에 하나로 작용하는데, 효소활성의 최적 온도는 40~

Table 2. Isolation of protoplasts from lily by enzyme treatments

Cellulase	Treatment (%)		Time (hours)	Yield
	Macerozyme	Pectolyase		
0.5	1.5	0.1	4~5	++
1.0	1.0	-	4~5	+
1.0	1.0	0.1	2~3	+++
1.0	1.0	0.2	2~3	+++
1.5	0.5	0.1	3~4	++

+++ : good, ++ : moderate, + : poor

Table 3. Composition of enzyme solution for the isolation of protoplasts

Composition	Concentration
Cellulase (Onozuka R-10)	1.0 %
Macerozyme (Onozuka R-10)	1.0 %
Pectolyase Y23	0.1 %
Mannitol	0.5 M
CaCl ₂	25μm
NaH ₂ PO ₄	1.4mM
MES	6mM
pH	5.6

50°C이지만 고온은 세포활성에 악영향을 미칠 우려가 있어 본 실험에서는 원형질체 배양을 28°C에서 실시하였다.

원형질체의 정제과정은 mannitol과 sucrose의 비등차를 이용한 비등수세법을 이용하였는데, 효소내 삼투조절제의 mannitol의 적정농도가 0.5M이었으므로 이에 맞추어 CPW 9% mannitol과 CPW 21% sucrose 농도로 하여 실시하였다. 이 방법은 수세하여 효소액을 완전히 제거하고 양질의 원형질체를 회수할 수 있다는 것이 장점이다(정 등, 1995).

원형질체 배양

조직배양에 폭넓게 이용되는 MS배지를 기본으로 하여 1/2MS배지, 1/2MS배지에 NH_4NO_3 를 첨가하지 않은 1/2MS 수정배지를 원형질체 배양배지로 선정하였다. 원형질체 초기배양은 1mg/L NAA와 1mg/L BAP 그리고 1mg/L zeatin 농도를 사용하였다. 그 결과는 Fig. 1에 나타났다. MS기본배지는 원형질체의 생존력에 치명적인 영향을 미쳐서 배양 5일째 되면서 초기분열이 일어났으나 거의 모든 원형질체는 생존력을 잃어 갈변화 현상이 나타났다. 1/2MS배지에서는 배양 5일째 되면서 초기분열이 일어나 배양 12일 정도 경과하자 MS배지와 변함없이 갈변화 현상이 발생하여 모두 괴사하였다. 그러나 1/2MS배지에 NH_4NO_3 를 첨가하지 않은 1/2MS 수정배지에서는 MS배지나

1/2MS배지보다 원형질체의 생존력이 비교적 높게 유지되어 배양한지 한 달 후에는 육안으로 확인할 수 있을 정도의 세포괴가 형성되었다. 이 결과로 보아 NH_4NO_3 의 양적 조절은 원형질체 생존에 매우 중요하게 작용됨을 알 수 있었으며, 한편 이러한 보고는 감자 원형질체 배양에서도 보고(Bokelmann 등, 1983)된 바 있고, Zapata 등(1981)은 토마토 원형질체 배양에서 최량의 NH_4NO_3 가 원형질체 배양에 사용될 때 세포내 중요 대사경로인 TCA회로가 교란되어 세포내 대사 및 세포분열이 억제된다고 보고하였다. 그러나 세포내 암모늄이온의 결핍은 세포벽 재생에 필요한 물질의 생산이 억제됨으로서 정상적인 세포분열을 일으키지 못함도 지적되었다(Meyer 등, 1975). 원형질체 배양은 세포벽의 재생과 세포분열의 유도에 따른 복잡한 제반 조건들이 요구되어 초기부터 많은 어려움이 제기된 바 있다(Gamborg 등, 1973; Gleba 등, 1984). 제반 조건들 중에서 특히 적절한 배양배지와 호르몬의 선택은 원형질체 배양의 결정적인 요인으로서, 많은 연구자들에 의해 조직배양배지로 고찰된 기본배지에 대한 검사와 수정이 이루어졌다.

배양방법에 따른 원형질체 배양의 결과는 Table 4에 나타났다. 세가지 방법 중 액체배지에 원형질체를 현탁시켜 배양하는 방법이 배양배지의 조건에 관계없이 양호하게 나타났으며, 세포분열도 빨리 일어났다.

배양 후 초기분열(Fig. 2-C, D)이 일어나자 호르몬 농도를 1.0mg/L NAA와 1.0mg/L BAP, 1.0mg/L NAA

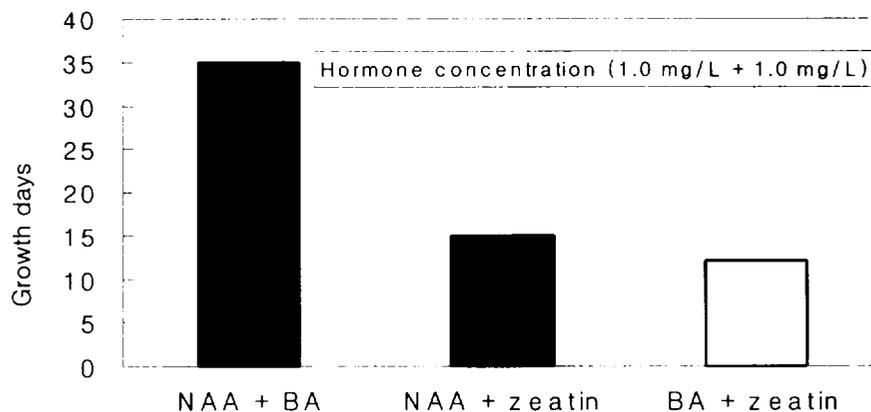


Fig. 1. Effect of hormones on survival of protoplasts from lily.

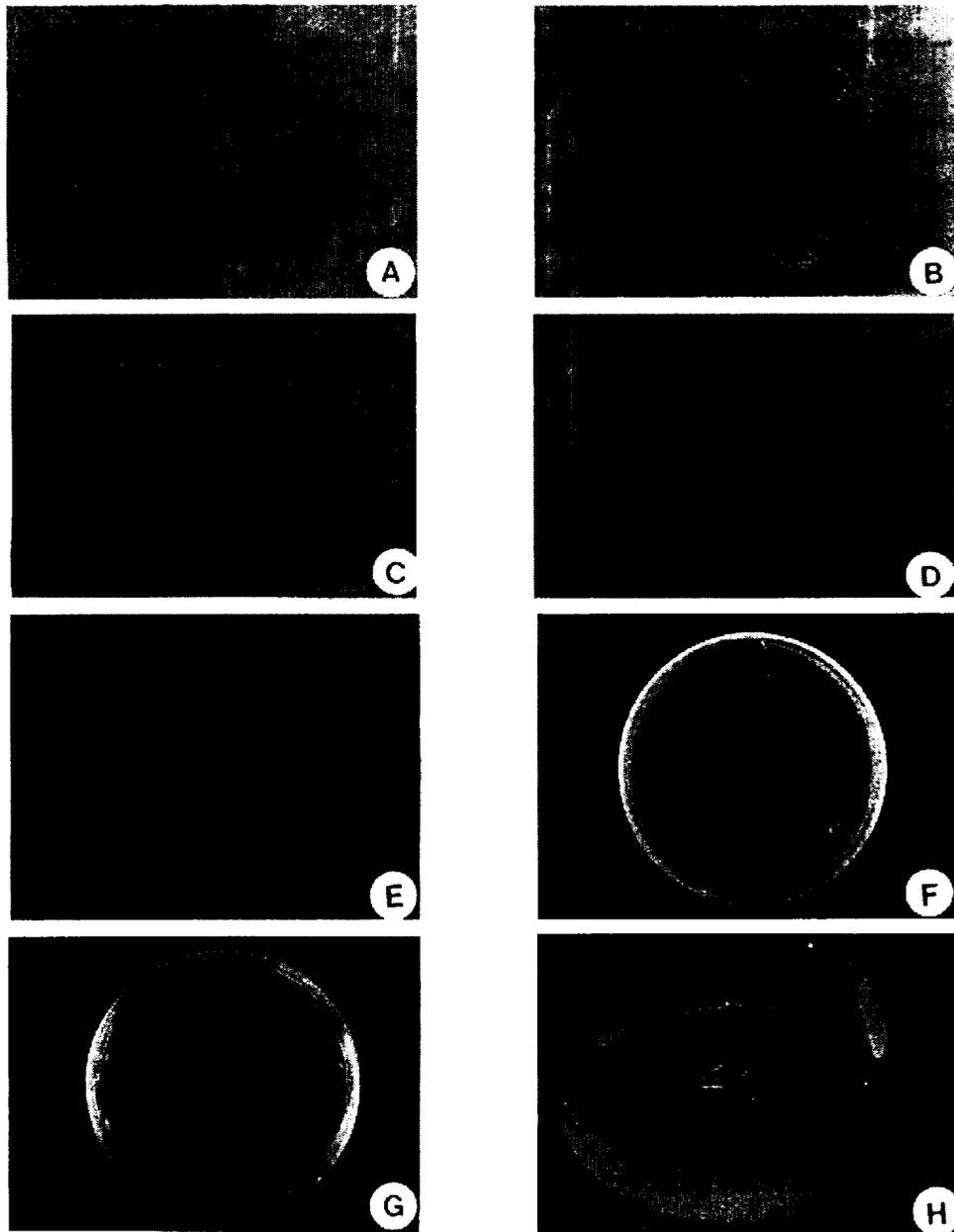


Fig. 2. Developmental stages of protoplasts obtained from lily.

- A: Isolated protoplasts($\times 300$)
- B: Protoplasts after 5 days of culture($\times 300$)
- C-D: Cell division after 7 days of culture($\times 300$)
- E: Cell division after 15 days of culture($\times 300$)
- F: Colony formation in liquid-over-solidified medium
- G: Callus formation after 2 months of culture
- H: Plantlet regeneration from the callus after 3 months of culture

Table 4. Effect of culture method on protoplast division in lily

Elements	Cell division (%)		
	MS	1/2MS	1/2MS
Liquid layer ^{a)}	+	++	+++
Embedding-in-agarose ^{b)}	-	+	+
Liquid-over-solid ^{c)}	+	++	++

* : modified medium without NH₄NO₃

+++ : good, ++ : moderate, + : poor, - : none growth

a) Liquid medium containing protoplasts was poured into petri-dishes

b) Liquid medium containing protoplasts was mixed with an equal volume of melted agarose medium (0.3% agarose) that had been kept 40°C, than 1-2ml protoplast samples were poured into petri-dishes

c) The agar medium poured into a petri-dish and solidified, then 1.0ml of liquid medium containing protoplasts was poured on to the agar layer

Table 5. Effect of PEG concentration and treatment time on protoplast fusion

Time(minutes)	Concentration(%)		
	30	40	50
10	+	+	++
15	+	++	+++
20	++	+++	++++

Data were carried out protoplast fusion between Georgia and Marco polo

++++ : excellent, +++ : good, ++ : moderate, + : poor

와 1.0mg/L zeatin 그리고 1.0mg/L BAP와 1.0mg/L zeatin로 하여 2,000Lux, 16시간 조명하에서 배양하면서 캘러스 유도 및 재분화시켰다. 호르몬 농도에 따른 결과(Fig. 1)를 보면 NAA 1.0mg/L와 BAP 1.0mg/L에서 생존율이 가장 높았고 가장 빨리 shoot가 형성되었다. 다른 호르몬 농도에서는 초기분열 후 15일 정도 경과하자 생존력을 잃어 더 이상 분열되는 것을 관찰 할 수 없었다.

원형질체 융합 및 잠종세포의 배양

PEG법을 이용하여 백합 원형질체 융합 조건을 알아보기 위해 PEG농도를 30, 40, 50%로 하여 처리한 결과(Table 5), 그 융합빈도는 그다지 높지 않았지만 PEG 50%용액에서 가장 좋았으며, 이는 정 등의 보고와 비슷한 결과를 보였다. 그러나 적정 처리시간이 20분 정도로 다소 차이를 보였고, PEG의 분자량이 높을수록 원형질체의 접촉율이 높아진다고는 하나,

본 연구에서는 PEG 1,450이 적당하였다. 담배와 완두의 엽육조직 원형질체 융합인 경우 적당한 PEG (4,000) 농도는 50%였고, 가장 좋았던 처리시간으로는 15분이었으며(서 등, 1986), 감자와 담배인 경우는 50% PEG(1,450)에서 가장 적당하였고 처리시간은 15분이었다(정 등, 1987).

수세후 세포벽이 형성된 타원형의 원형질체를 관찰할 수 있었으며, 배양 2일 후 새로운 배지를 첨가해주었다. 그리고 1주일을 주기로 하여 계대배양하면서 mannitol 용액을 점차 희석해 주었다. 앞의 원형질체 배양 실험에서 가장 양호하였던 NH₄NO₃를 첨가하지 않은 1/2 MS수정배지에 1mg/L NAA와 1mg/L BAP를 혼용처리 하여 배양한 결과, 배양 7일째에 초기분열(Fig. 3-D, E)이 일어났으나 배양 15일 이후 생존력을 잃어 원형질체가 갈변화되면서 괴사하기 시작하였다. 원형질체 총 생존일수는 18일이었으며 세포분열이 일어난 원형질체는 융합체 중 20% 정도였다.

최근 식물세포의 유전학적 분석과 체세포의 교잡체

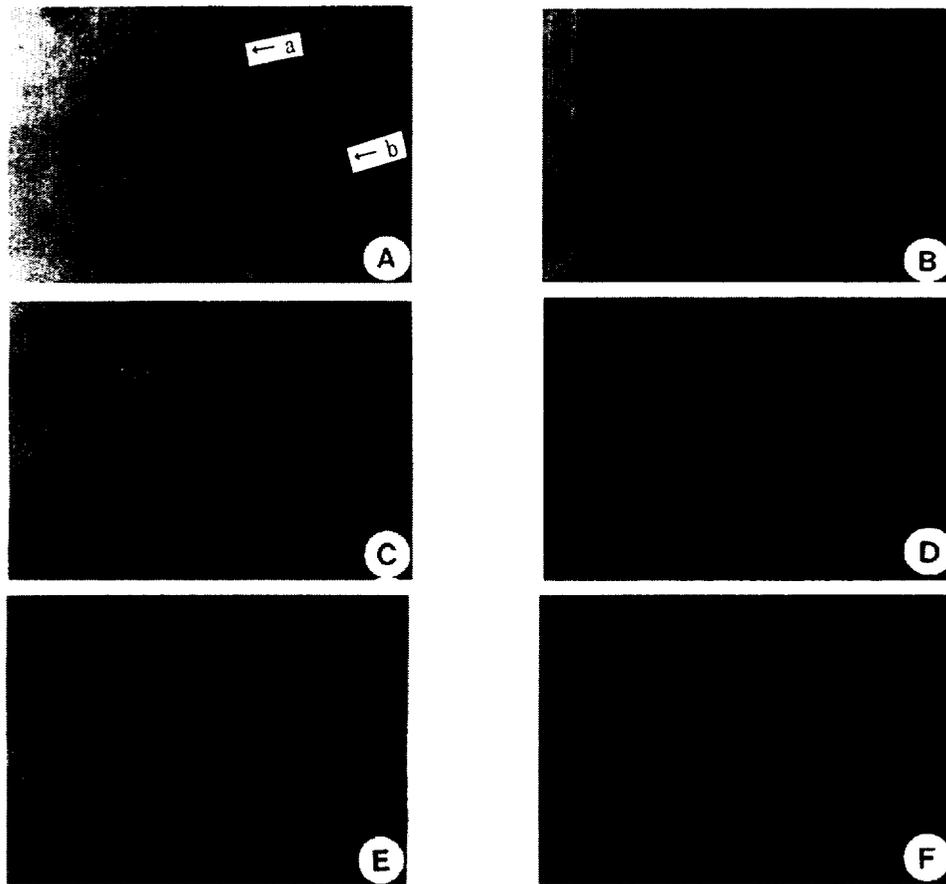


Fig. 3. Division stages of protoplasts after PEG treatment.

- A: Isolated protoplasts($\times 300$)
 - a- Protoplast from mesophyll of Macro polo
 - b- Protoplast from callus of Georgia
- B-C: hybrid cell after PEG treatment
- D-E: Cell division after 7 days of culture($\times 300$)
- F: Cell division after 15 days of culture($\times 300$)

육성을 위하여 효과적이고 재생능력이 있는 세포융합체의 획득 기법에 관하여 중점적인 연구가 진행되고 있는데, Carlson 등(1972)은 *Nicotiana glauca*과 *N. langsdorffii*의 원형질체를 얻었으며, Melcher 등(1978)은 *Solanum tuberosum*과 *Lycopersicon esculentum*의 원형질체를 융합하여 순간 체세포 잡종식물을 얻는데 성공한 바 있다. 그러나 콩, 옥수수 등과 같은 농작물이나 화훼류에서는 아직 재현성 있는 식물체 분화의 예는 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 백합 품종간

의 원형질 융합이 양호하게 이루어짐을 확인할 수 있었으며, 융합된 원형질체를 배양하여 초기 세포분열 과정을 거쳐 식물체 재분화까지는 이루지 못하였으나 Georgia의 원형질체 배양시 재분화된 식물체를 얻을 수 있었다.

적 요

본 연구는 백합육종의 기초자료로 삼고자 Longiflorum

계통의 Georgia 염색조직으로부터 원형질체를 분리, 배양함으로써 재생여부를 확인하고 Georgia와 Macro polo의 원형질체 융합을 시도하였다. 원형질체 분리 적정농도를 알아보기 위해 Onozuka cellulase R-10, Macerozyme R-10, 그리고 Pectolyase를 효소농도별로 처리해본 결과 삼투조절제는 0.5M mannitol, 효소 농도는 1.0% Cellulase, 1.0% Macerozyme, 0.1% Pectolyase를 처리시 2~3시간대로 분리가 가장 잘 되었다. 원형질체 배양은 NH_4NO_3 를 첨가하지 않은 1/2MS수경배지에 1.0mg/L NAA와 1.0mg/L BAP를 혼용처리하였을때가 가장 좋았으며, 액체배지를 이용할 때 원형질체의 생존율 및 세포분열이 가장 양호 하였다. 초기배양 한달 후 세포괴가 형성 되었고, 그 후 한천배지로 계대배양하여 재분화를 유도하였다. PEG에 의한 원형질 융합은 그 융합빈도는 높지 않았으나 PEG 50%용액에서 약 20분간 처리시 융합 빈도가 가장 높게 나타났다.

참고문헌

- Ahuja, P. S., S. Hadiuzzaman, M. R. Dauvey and E. C. Cocking. 1983. Prolific plant regeneration from protoplast-derived tissues of *Lotus corniculatus* L. (birdsfoot trefoil). *Plant cell Rep.* 2:101-104.
- Bokelmann, G. S and S. Roest. 1983. Plant regeneration of protoplast of potato (*Solanum tuberosum* cv. Bintje). *Z. Pflanzenphysiol.* 109:259-265.
- Carlson, P. S., H. H. Smith and R. D. Dearing. 1972. Parasexual plant hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69:2292-2294.
- Cella, R and E. Galum. 1980. Utilisation of irradiated carrot cell suspensions as feeder layer for cultured *Nicotiana tabacum* cultivar Xanthi cells and protoplasts. *Plant Sci. Lett.* 19:243-252.
- 최상태. 1994. 구근 화훼종구의 국내 생산 기술. 화훼종구의 국내생산 기술개발 심포지엄. pp.44.
- 정상호, 심용섭. 1987. 감자와 담배의 원형질체 배양 및 융합. 식물학회지. 30(4):287-298.
- Emswella, S. H. 1957. Propagation of lilies. *Nor. Am. Lily Soc.* 10:7-18.
- Evans, D. A. 1983. Agriculture applications of plant protoplast fusion. *Biotechnology* 1:253-261.
- Frearson, E. M., J. B. Power and E. C. Cocking. 1973. The isolation, culture and regeneration of *Petunia leaf* protoplasts. *Dev. Biol.* 33:130-137.
- Gamborg, O. L., K. N. Kao, R.A. Miller, L. C. Fowke and F. Constabel. 1973. Cell regeneration, division and plant developments from protoplasts(I). *Colloques Internationaux C. N. R. S.* 212:155-160.
- Gleba, Y. Y and K. M. Sytnik. 1984. Techniques of parasexual hybridization. In protoplast fusion. *Springer-Verlag, Berlin.* pp.5-33.
- Grosser J. W, Gmitter F. G Jr. 1990. Protoplast fusion and citrus improvement. *Plant Breed Rev.* 8:339-374
- 정재동 외 17인. 1995. 최신생물공학. 경북대학교출판부. pp.412~643.
- Kao, K. N., O. L. Gamborg, R. A. Miller. 1970. Cell division in cells regenerated from protoplasts of soybean and *Haplopappus gracilis*. *Nature* 232:124-131.
- 김윤식, 이용무. 1990. 한국산 나리속(*Lilium L.*)의 외부형태학적 형질에 관한 연구. 식물분류학회지. 20:165-178.
- Meyer, Y and W. O. Abel. 1975. Budding and cleavage division of tobacco mesophyll protoplast in relation to pseudo-wall and wall formation. *Planta* 125:1-13.
- Murashige, T and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.* 15:473-497.
- Nagata, T and I. Takebe. 1971. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta* 99:12-20.
- Melchers, G., M. D. Sacristan and A. A. Holder. 1978. Somatic hybrid plants of and tomato

- regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg. Res. Commum.* 43:203-218.
- Simmonds, J. A and Cumming, B. G. 1976. Propagation of *Lilium* hybrids. II. Production of plantlets from bulb-scale callus cultures for increased propagation rate. *Sci. Hort.* 5:161-170.
- 杉浦廣幸. 1993. *Lilium speciorubel* および *L. × elegans* プロトプラストからの 植物體再生. 育雜 43:429-437.
- 서정우, 이광용. 1986. 전기장하에서의 담배 및 완두 원형질체 융합. 식물학회지. 29:1-10.
- Verma, D. C and S. R. Wann. 1983. 6th International protoplast symposium. Potrykus, I. et al. (Editors), *Experientica Suppl.* 45:10-11.
- Zapata, F. J., K. C. Sink and E. C. Cocking. 1981. Callus formation from leaf mesophyll protoplasts. of three *Lycopersicon* species: *L. esculentum* cv. 'Walter', *L. pimpinellifolium* and *L. hirsutum*, *L. glabratum*. *Plant Sci. Lett.* 23:41-46.