

## 엽조직에서 나출된 원형질체의 재생 가능 세포 판별\*

소인섭\*\*, 유장걸\*\*\*

### Identification of Possibly Regenerative Cells in Protoplasts Isolated from leaf Tissue\*

*In-Sup So\*\**, *Zang-Kual U\*\*\**

#### Summary

This study carried out to examine the difference in the cell vitality between mesophyll protoplast (MP) and paraveinal mesophyll protoplast (PVMP) by using urea permeability technique, of Tobacco xanti, *Petunia hybrida* "Blue star" and *Chrysanthemum morifolium* "Baeckwang".

In addition, the effect of various enzyme solutions and their digestion time the effect of NAA and Thidiazuron on plantlet regeneration from isolated protoplasts were investigated.

The results of this study are summarized as follows.

1. For the three plants examined, the urea permeability on the tested tissue stripes was relatively higher in PVMP than in MP by about  $KS=2.0 \times 10^{-5} \text{cm/sec}$ .
2. The enzyme mixture of 1.5% cellulase R-10, 1% Driselase, 0.5% Macerozyme R-10, and 0.5% Pectinase was effective in isolation of PVMP, and the digestion time took 2-4 hours.
3. The callus formation from the isolated protoplasts and the plant regeneration from isolated protoplasts gave the best results with NAA  $2 \mu\text{g/l}$  and Thiadiazuron  $0.01 \mu\text{g/l}$ .

Furthermore, the results demonstrated that cell division and plantlet regeneration was better in the PVMP than in the MP of the same leaf or plant.

We, therefore, conclude that PVM is an excellent experimental material for the callus formation and regeneration from the isolated protoplasts.

\* 본 논문은 1990년 교육부 학술연구조성비(유전공학)에 의하여 연구되었음.

\*\* 농과대학 원예학과 (Dept. of Horticulture, Cheju Univ., Cheju-do, 690-756, Korea)

\*\*\* 농과대학 농화학과

## 서 론

신종 유용작물을 창출하기 위한 방법으로는 최근에 큰 발전을 하고 있는 이종속간 식물의 원형질체 융합기술을 들 수 있다. 그러나 지금까지의 모든 연구자료들이 오직 그 최종적인 목표인 잡종식물의 생산에만 급급한 나머지 융합을 위한 기초 연구에 다소 소홀하였던 것 같으며 그 중에서도 대상 식물체를 구성하고 있는 개개의 조직들에 대한 재생력의 검토에 대하여는 오직 재료 식물체의 노약 정도(Horst, 1990) 혹은 각각의 실험대상 식물체의 조작방법(callus, suspension cultured cells, seedlings)에 대한 재생력 검토에 약간의 성과를 얻는데 그치고 있다(Power *et al.* 1976).

일반적으로 곡류 작물의 융합을 위하여 사용되는 재료인 엽조직을 효소 용액에 처리할 때에 엽맥과 같이 용해가 더딘 조직은 제거되는 것이 상식으로 되고 있는데 엽조직에서도 형성층으로서의 역할을 수행하는 세포층이 있다(Vincent *et al.* 1984). 즉, 일반 식물의 엽조직에서 재생 능력을 가진 세포층으로서 paraveinal mesophyll 세포의 존재가 확인되고 있으며(So *et al.* 1989), 일반 엽조직이 아닌 다른 조직(cotyledon, adventitious roots)의 이용 가능성도 앞으로의 연구결과에서 밝혀질 것으로 생각된다. 따라서 본 연구는 식물 엽조직에서 줄기 조직 가까이 분포하고 있는 paraveinal mesophyll 세포의 재생 능력을 확인하기 위하여 대체로 나출원형질체로부터 재생이 잘 된다고 알려진 담배, 패추니아, 국화를 대상으로 일반 mesophyll 세포와 비교하여 세포 활성 측정 및 재생력을 비교 확인 하므로써 지금까지 원형질체 나출시 상형적으로 알고 있는 사실 즉 나출 원형질체의 상대적인 생산이 많을수록 최종의 융합결과도 좋겠다는 통념을 바꾸고 나가서는 재생 가능 세포들만을 집약적으로 생산해 낼 수 있는 방법을 개발 하는데 본 연구의 목적을 두었다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시식물 재료 준비

공시 재료로서 *Nicotiana tabacum* cv Xanti와

*Petunia hybrida* cv Blue star는 종자를 10% NaClO 용액에서 10분간 살균하고 멸균수로 수 회 세척한 후 MS 기본 배지에 종자 파종하여 4주 경과된 유묘의 잎을 사용하였다. *Chrysanthemum morifolium* cv Baeckwang은 성장점 배양으로 얻어진 무균 상태의 유묘에서 엽장이 2cm정도 발육된 것을 채취하여 재료를 사용하였으며 배양실의 조건은 일반 배양 조건에 준하도록 조정하였다.

### 2. Urea permeability 측정기술을 이용한 vitality 측정

준비된 3종의 식물재료는 모두 가로 1cm×세로 2cm로 절단하여 세포간극간의 기포를 제거하기 위하여 infiltration한 후 Lee 등(1989)의 방법을 이용하여 vibratome (Series 1000, American Scientific Product)으로 100 $\mu$ m 되도록 절단하였는데 이 모든 과정은 무균 조작되었다. 절단된 조직편은 0.3, 0.5, 0.7M mannitol+CPW Series 용액에 각각 10분씩 침적시켜 충분히 원형질 분리된 조직편을 Perfusion chamber에 넣고 0.7M로 조제된 urea 용액을 흘려보내면서 10분간 간격으로 원형질 복귀 정도의 수치를 취하여 Stadelmann (1966)의 공식에 의거하여 그 값을 구하였다.

한편 주 엽맥 주위에 주로 분포하는 paraveinal mesophyll cell을 얻기 위하여는 longitudinal section하여 얻어진 조직편을 사용하였으며 일반 mesophyll cell들은 엽맥이 거의 없는 조직을 절단 사용하였는데 (Fig. 1), 1회 측정시 3개의 세포를 정하여 수치를 취하였고 5회 반복을 실시한 평균치를 얻어 도표로 표시하였다.

### 3. 원형질체 나출과 배양

공시된 3종의 식물은 2항의 방법으로 절단된 100 $\mu$ m 두께의 조직편을 2종류 즉 mesophyll tissue와 paraveinal mesophyll tissue를 각각 1g씩 채취하여 다음과 같이 A, B, C 용액으로 조제된 효소액에 침적시켜 원형질체를 나출시켰다.

원형질 분리제는 mannitol을 0.3, 0.5, 0.7M 용액으로 만들어 각각 10분씩 stepwise 처리한 후 13% (W/V)의 Mannitol 용액에 A 용액 즉 1.5%의 Cellulase R-10, 1%의 Cellulase, 0.25%의 Dri-

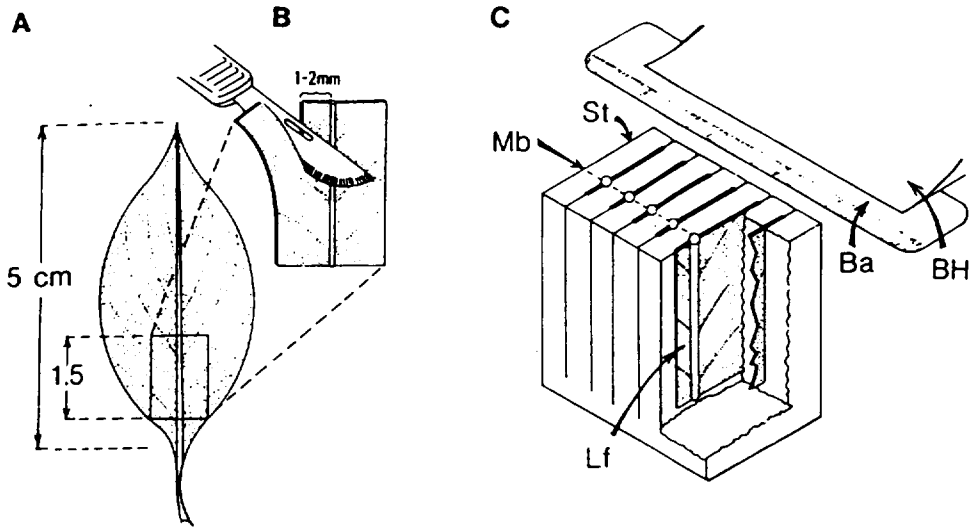


Fig. 1. Procedures for microsectioning using a vibratome. (A) Leaf segments (1.5×1.0cm) from the basal portion of the leaf, 1cm above the petiole attachment point with the lamina; (B) lamina on both sides of the midvein removed except for 1~2mm remnant; (C) leaf segments placed into incisions of the styrofoam block (2×2cm), with the alignment of the midveins (Mb) in the center of the block. Total of six leaf sections in the block in sectional view near the midveins (Mb) showing the placement of the leaf segments inside the styrofoam block. Lf, leaf segments; St, styrofoam block; Mb, midvein; BH, blade holder; Ba lade.

selase, 0.025%의 Rhozyme, 0.01%의 Macerozyme  
과 0.05%의 Pectolyase를 조합한 것은 C용액으로 하  
여 2종류의 조직 절편에 대한 적정 나출 시간과 원형  
질체 나출 결과를 관찰하였다 (Table 1). 각 효소 용

액에 처리한 실험구는 10회 반복으로 하여 30%의 상  
온에서 압조건으로 교반 (60 cycle/min.) 하였으며  
매시간 효소처리에 대한 나출 정도를 관찰하였다.  
나출된 원형질체는 80µm nylon mesh에 걸려서 10

Table 1. Suitable combination of enzymes for protoplast isolation

Enzyme	Combination		
	A	B	C (%)
Celluase R-10	1.5	1.0	1.5
Driselase	1.0	0.25	-
Rhozyme	-	0.25	-
Macerozyme R-10	0.5 -	0.8	-
Pectolyase Y-23 in 13% (W/V) mannitol	0.05	0.01	0.05
Suitable for Tobacco leaf mesophyll tissue		+++	
Suitable for Tobacco leaf mesophyll PVM <sup>2)</sup>	+++		
Chrysanthemum leaf mesophyll			+++
Chrysanthemum leaf PVM	+++		
Petunia leaf mesophyll			+++
Incubation (hrs.)	6-8	3-6	3-6

2) abbreviation of paraveinal mesophyll tissues sectioned 100µ thickness by vibratome.  
Asterisk indicates the best result for protoplast isolation.

ml의 mannitol buffer medium(0.4M mannitol+ 2mM CaCl<sub>2</sub>+0.1%(W/M) bovine serum albumin (BSA)+5mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane-sulfonic acid (HEPES)-KOH(pH 7.0))으로 2회 세척하였다. 나출 원형체에서 특히 일반 mesophyll 유래의 원형질체와 paraveinal mesophyll 원형질체를 분리하기 위하여 Vincent(1984)의 방법을 이용하였다(Fig. 2).

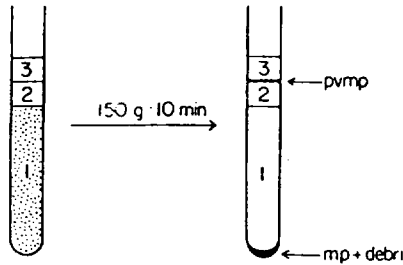


Fig. 2. Schematic illustration of step gradient for purification of soybean PVMP. Steps consisted of (1) a mixture of 1.5ml crude PVMP suspension in mannitol-buffer medium (containing 0.4M mannitol, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% BSA and 5mM HEPES-KOH, pH 7.0) and 4.5ml sucrose-buffer medium (containing 0.4M sucrose, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% BSA, and 5mM HEPES-KOH, pH 7.0), (2) 0.5ml of a mixture of 1.5 parts mannitol-buffer medium and 2.5 parts sucrose buffer medium, and (3) 0.5ml mannitol-NaCl-buffer medium (containing 0.15M mannitol, 75 mM NaCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% BSA, and 100mM HEPES-KOH, pH 7.0). After centrifugation at 150×g for 10min, PVMP banded at the upper interface while MP and cellular debris pelleted.

한편 순수한 MP를 얻기 위하여 밑바닥에 침전된 pellet을 2개의 시험관(1.5×10cm)에 각각 4ml의 0.4M sucrose, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% BSA, 5mM HEPES-KOH(pH 0.7), 13%(W/V) Dextran T 35-50(Sigma) 용액에 희석하였으며 곧이어 상기용액에서 Dextran만 9.1%로 전환된 용액을 2ml 첨가하고 역시 1ml의 mannitol-buffer medium을 첨가하였다.

이어서 300xg의 속도로 5분간 원심 분리한 후 상층부 즉 sucrose-dextran층과 mannitol buffer층 사이에 모여진 MP를 얻을 수 있었다. 얻어진 나출 원형질체는 haemocytometer(L:1mm, W:1mm, D:1mm America Optial, U.S.A)를 이용하여 나출 원형질체의 수를 확인하여 모든 처리 공히 1.5×10<sup>4</sup> protoplasts/g 되게 희석하여 배양에 임하였다.

배양은 MS배지를 사용하여 9cm의 petri dish에 0.6%의 Difco agar를 첨가한 고체배지였으며, 생장 조절 물질로서 auxin으로는 NAA를 0-2.0mg/l 수준으로 그리고 cytokinin으로는 Thidiazuron을 0-0.01 mg/l 수준으로 단용 혹은 혼용 처리하여 나타나는 결과를 관찰하였다. 또한 관찰되는 callus나 유식물체는 필요에 따라 제대 배양하였다.

### 결과 및 고찰

일반적으로 urea permeability를 측정하는 기술은 세포의 활성을 검정하는데 가장 정확한 방법으로 알려져 있다(Larkin, 1976).

Fig. 3~5까지의 Petunia, Tobacco 그리고 Chrysanthemum 등의 mesophyll 세포와 paraveinal mesophyll 세포에서의 Urea permeability의 비교는 3종의 모든 식물에서 paraveinal mesophyll 세포가 높은 것으로 나타났다. 동일한 엽조직이라 하더라도

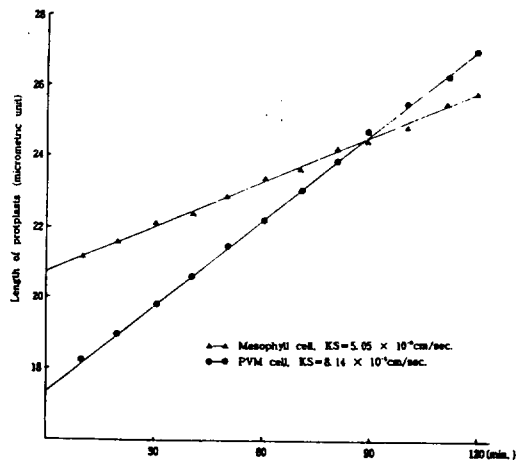


Fig. 3. Time course of sample graph for urea permeability in mesophyll cell and paraveinal mesophyll cell of *Tobacco xanti*.

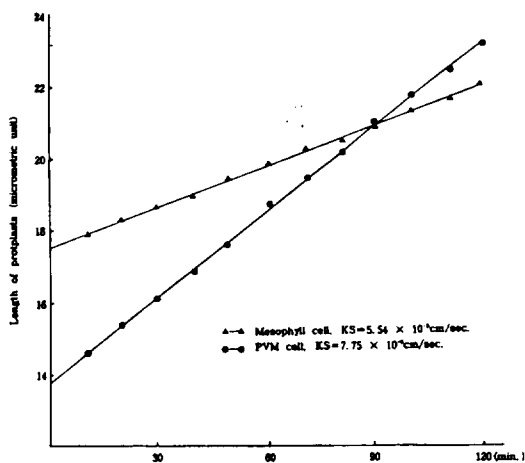


Fig. 4. Time course of sample graph for urea permeability in mesophyll cell and paraveinal mesophyll cell of *Chrysanthemum morifolium*.

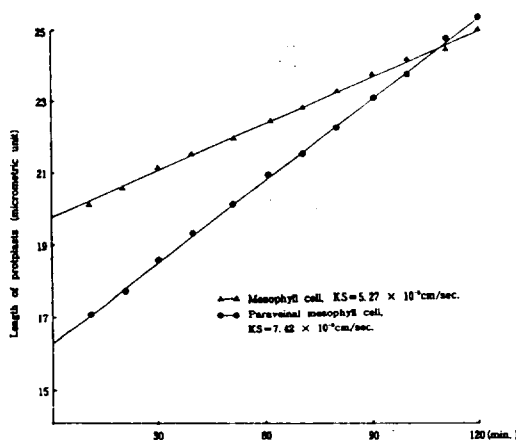


Fig. 5. Time course of sample graph for urea permeability in mesophyll cell and paraveinal mesophyll cell of *Petunia hybrida* "Blue Star".

분화의 정도에 따라 수분의 투과성이나 원형질체를 구성하는 세포질이 다르다는 사실은 Stadelmann (1966)에 의하여 잘 설명되고 있으며 특히 같은 몸체를 구성하는 세포들간에도 투과성이 상대적으로 높다는 것은 비정상적인 상황에서도 세포 분열 능력이나 생존을 위한 자율 반응이 강하여 각각 다른 totipotency를 갖고 있음을 나타낸다. (Lee et. al, 1989) 또한 So와 Lee (unpublished)의 경험으로 보

아 4종의 populs의 조직 배양 증 개체 발생이 용이한 종일수록 urea permeability가 높다는 사실과 엽조직을 cross-section하여 neutral red로 염색한 후의 관찰에서도 midvein 양측 즉 paraveinal mesophyll tissue에서 초기의 분열이 시작된다는 사실은 위의 결과와 일치하고 있음을 시사하고 있다.

Table 1은 각종 효소용액에 대한 식물 조직의 원형질체 나출 정도와 적정 경과 시간에 대한 결과를 나타낸 것이다. 담배, 국화, 페추니아에서 PVM의 경우에는 A용액에서 좋은 나출 성적을 보이고 있으며 나출에 경과된 시간도 2~4시간 내에 이루어졌다. 한편, 담배의 MP와 국화, 페추니아에서 MP의 경우에서 각각 B용액과 C용액이 적응성 높게 나타나며 나출에 경과된 시간도 1~2시간 정도였다. 원형질체 나출을 위한 각종 효소제의 적용과 조합에 대하여는 많은 연구자들이 서로 다른 결과들을 보고하고 있는데, Watt 등(1974)은 담배의 엽조직에서 안정된 원형질체를 얻기 위하여는 효소의 종류보다 오히려 재료 식물의 건강상태가 오히려 강조되고 있으며 1%의 Meicelase만으로도 2시간 내에 양질의 원형질체를 생산할 수 있다고 하였다. 페추니아의 경우에도 Ford-Logan와 Sink (1988)는 원형질체 융합을 위한 재료로서 조직 이용의 우수성을 강조하고 0.5%의 Macerozyme과 3%의 Cellulase Onozuka R-10과 같은 효소 조합이 유효한 효과를 가지며 분리에 경과되는 시간은 2~5시간 소요된다 하였다. 국화의 경우에는 나출 원형체로부터 식물체의 재생은 아직까지 성공사례가 없지만 1%의 Macerozyme과 3%의 Cellulase의 조합이 유효하며 특히 0.1mM의 CaCl<sub>2</sub>의 첨가로 좋은 결과를 얻을 수 있었다는 Horst (1990)의 결과를 찾아볼 수 있다.

이상의 결과를 종합해 보면 일반 MP의 경우에 문헌에 나타난 효소액에 Driselase와 Rhozyme이 부가적으로 사용되어 높은 수율의 나출원형질체를 생산할 수 있다는 사실을 확인할 수 있는데, 이러한 결과는 Frearson 등(1973)과 Potrykus와 Durand (1972)의 실험에서와 일치하며 같은 종류의 효소라 할지라도 각 제품의 제조 공정이 다르고 활성 및 적용 범위가 각각 다르게 나타날 수도 있다는 사실을 암시하며 특히 midvein 주위에 존재하는 PM의 경우에는 타세포와 비교하여 pectin질의 발달이 많기 때문에

(Handro et. al, 1973) 오히려 많은 종류의 pectinase의 사용이 요망된다.

Table 2는 담배의 엽세포에서 분리된 MP와 PVMP간의 callus 유래와 식물체 재생배을 나타낸 것인데 일반적으로 MP에서보다 PVMP에서 양호한 결과를 나타내고 있으며 특히 cytokinin의 일종으로서 Thidiazuron의 처리가 0.01mg/l로 NAA와 혼용될 때는 callus의 유기와 식물체 재생력에 월등한 효과를 가지는 것으로 나타난다.

Table 3는 국화의 경우로써 담배와 마찬가지로 callus 유기는 되지만 식물체의 재생율은 빈약하게 나타나며 이 또한 미세한 embryoid 상태만을 관찰할

수 있는데 재생력의 비율도 NAA 2mg/l+ Thidiazuron 0.01mg/l 처리구에서 10~30%의 수치를 나타낸다.

Horst(1990)와 Langhan 등(1977)은 virus free 개체의 생산으로서 국화의 원형질체 배양은 추천될 일이지만 재생력이 빈약하여 실용적이지 못하다고 하였지만 본 연구의 결과를 고찰해 볼때 PVMP를 대상으로한 Thidiazuron의 처리 효과에 대한 폭넓은 연구가 이루어진다면 결코 전망이 없다고는 볼 수 없겠다. Petunia의 경우에서도 MP보다는 PVMP에서 월등한 callus유기와 식물체 재생율을 보이고 있다 (Table 4).

Table 2. Callus initiation and plant regeneration from different combination of plant growth regulators in tobacco protoplasts

Growth regulator (mg/l)		Callus initiation (%)		Plant regeneration	
NAA	Thidiazuron	PVM <sup>1)</sup>	Meso. <sup>2)</sup>	PVM	Meso.
0	0.005	0	0	0-10	0-10
	0.010	10-30	0	10-30	0-10
0.5	0	20-40	0-10	0	0
	0.005	20-60	10-20	20-40	0-10
2.0	0.010	20-60	20-40	20-40	0-20
	0	60-70	0	0	0
	0.005	60-85	10-30	30-60	0-10
	0.010	60-100	10-30	40-70	0-20

y) Paraveinal mesophyll protoplasts

z) Mesophyll protoplasts

Each value is the frequency range from 10 replications.

Protoplasts per petri dish are about  $1.5 \times 10^4$  protoplast/g cell.

Table 3. Callus initiation and plant regeneration from different combination of plant growth regulators in chrysanthemum protoplasts

Growth regulator (mg/l)		Callus initiation (%)		Plant regeneration	
NAA	Thidiazuron	PVM	Meso.	PVM	Meso.
0	0.005	0-20	0	0	0
	0.010	0-30	0	0	0
0.5	0	20-40	0	0	0
	0.005	40-60	0-10	0	0
2.0	0.010	40-60	0-10	0-20	0
	0	20-40	0-10	0	0
	0.005	30-50	0-10	0-10	0
	0.010	50-80	0-20	10-30	0

See table 2.

Table 4. Callus initiation and plant regeneration from different combination of plant growth regulators in *Petunia* protoplasts

Growth regulator (mg/l)		Callus initiation (%)		Plant regeneration	
NAA	Thidiazuron	PVM	Meso.	PVM	Meso.
0	0.005	0-10	0	0-10	0
	0.010	0-30	0	0-20	0
0.5	0	30-50	0	0	0
	0.005	0-20	0-20	0-10	0-5
2.0	0.010	10-30	0-20	0-30	0
	0	40-60	10-30	0-10	0
	0.005	60-80	20-40	10-30	0-20
	0.010	60-80	20-40	10-50	0-20

See table 2.

Hayward와 Power(1975) 그리고 Power 등(1976)은 패츨니아속 식물들의 신품종육성을 위한 원형질체 융합에는 손쉽게 이용할 수 있는 엽조직으로부터 나출 원형질체를 획득할 수 있고 고농도의 auxin류의 존재하에서의 callus 유기로부터 cytokinin의 첨가에 의한 식물체 발생에 관하여 보고한 바 있다.

이상의 결과에서 볼 때 Thidiazuron의 첨가 효과가 돋보이는데 지금까지 cytokinin류로서의 효용에 대한 소개가 미흡하기 때문에 적용시험이 많지 않으리라 사료되어 앞으로 재생이 어려운 식물에 대한 처리 연구가 많이 수행되어야 하겠다. 또한 공시한 3종의 식물에서 공히 PVMP가 MP보다 callus 유기나 식물체 재생율이 높다고 하는 사실은 urea permeability 측정 결과와 일치하고 있고 현미경적인 검경에서도 투명도나 윤곽도 라든지, 세포질의 내용물 중에서 chloroplast의 양이 전체의 20%미만 정도 밖에 함유하고 있지 않다든지 Palta(1978)의 결과와 같이 FDA나 neutral red 같은 생체 염색에서 나타나는 높은 세포 활성도가 이와 같은 사실을 증명한다고 할 수 있다.

Vincent 등(1984)은 대두의 잎에서 얻어진 MP와 PVMP세포를 비교하는 과정에서 MP는 광합성에서 탄소대사과정에서 주력하는 세포이고 PVMP는 질소 대사나 MP에서 합성된 동화 물질의 임시 저장고와 같은 역할을 한다고 한 바 있다.

이상에서 나타난 모든 실험 결과를 종합해 볼 때 엽조직을 재료로 하여 원형질체 나출과 재생에 관한 연구에 있어서는 수확되는 원형질체의 수율이 높다

는 사실만으로 최종의 결과가 좋다는 막연한 사실보다는 본 연구 결과에서 밝혀진 바와 같이 재생가능성이 높은 세포군이 PVMP라는 사실에 입각하여 종래에는 devri로 취급되어 미처 분리도 되기전에 폐기되던 midvein 주변 조직을 집약적으로 분리해서 사용하여야 목적하는바 연구 결과에 쉽게 도달하리라 사료되는 바이다.

## 적 요

본 연구는 Tobacco xanti, *Petunia hybrida* "Blue star" 그리고 *Chrysanthemum moifolium* "Barkwang"을 공시하여 엽조직 유래의 mesophyll protoplast와 paraveinal mesophyll protoplasts간의 세포 활성을 조사하기 위하여 urea permeability를 측정하였다. 아울러 Mesophyll tissue와 Paraveinal mesophyll tissue에서 원형질체 나출을 위한 각종 효소제 처리와 경과 시간을 관찰하며, 나출 원형질체로부터 식물체 재생에 관한 NAA와 Thidiazuron의 효과를 조사하였다.

얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 세포 활성에 대한 urea permeability 측정은 공시한 3종 식물의 PVMP에서 모두  $KS=2.0 \times 10^{-5}$  cm/sec. 정도가 MP보다 높은 것으로 나타났다.
2. 효소용액 처리로는 1.5% Cellulase R-10, 1% Driselase, 0.5% Macerozyme R-10 그리고 0.05% Pectolyase 혼합처리가 PVMP의 나출

에 유효하였고 경과시간도 2~4시간이었다.

3. 나출원형체로 부터의 Callus 유기와 식물체 재 생에는 NAA 2ppm+Thidiazuron 0.01ppm 처 리구에서 가장 양호하였으며 조직별로는 PVMP에서 월등한 결과를 나타내었다.

결론적으로 고찰해볼 때 업조직을 대상으로한 원 형질체 배양에 있어서 업록소의 함량이 많은 MP보 다는 재생력이나 세포활성이 강한 PVM 유래의 조직 을 집약적으로 나출시켜 실험재료로 이용하면 우수 한 결과를 기대할 수 있겠다.

## 參 考 文 獻

- Ford-Logan, J. and K. C. Sink, 1988. Plantlet regeneration from protoplasts of *Petunia alpicola*, *Hort. sci.*, 23 : 393-395.
- Frearson, E. M., J. B. Power, and E. C. Kocking, 1973. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts, *Dev. Biol.* 33 : 130-137.
- Handro, W., P. S. Rav, and H. Harada., 1973. A historical study of the development buds, roots, and embryo in organ cultures of *Petunia inflata*, *R. Fries Ann. Bot.* 37 : 817-821.
- Hayward, C. and J. B. Power, 1975. Plant production from leaf protoplasts of *Petunia parodii*, *Plant Sci. Lett.* 4 : 407-410.
- Horst, R. K. 1990. Chrysanthemum, 319-336. In : (eds : Amirato, P. V., D. A. Evans., W. R. Sharp, and Y. Yanmada). Handbook of Plant cell culture. McGraw-Hill, Inc. U. S. A.
- Langhans, R. W., R. K. Horst, and E. D. Earle, 1977. Disease free plants via tissue culture propagation, *Hort Sci.* 12 : 149-150.
- Lankin, P. J., 1976. Purification and viability determinations of plant Protoplasts, *Planta(Berl.)*, 128 : 213-216.
- Lee-Stadelman, O. Y., S. W. Lee, W. P. Hackett and P. E. Reed, 1989. The formation of adventitious buds in vitro micro-cross section of hybrid populus leaf midveins, *Plant Sci.*, 61 : 263-272.
- Palta, J. P., J. Levitt, and Ed. J. Stadelman, 1978. Plant viability assay, *Cryobiology.* 15 : 249-255.
- Potrykus, I. and J. Durand, 1972. Callus formation from single protoplasts of *Petunia*, *Nature. New Biol.*, 237-287.
- Power, J. B., E. M. Frearson, D. George, P. K. Evans, S. F. Berry, C. Hayward and E. C. Cooking, 1976. The isolation, culture and regeneration of leaf protoplasts in the genus *Petunia*, *Plant Sci. Lett.*, 7 : 51-55.
- So, I. S., I. S. Chung, and O. Y. Lee-Stadelman, 1989. Re-evaluation of FDA as a vital staining for plant cells. *Suptrop. Agric. Cheju Nat. Univ.*, 6 : 49-58.
- Stadelman, Ed. J., 1966. Evaluation of turgidity, plasmolysis, and deplasmolysis of plant cells, 143-216. In : (ed. : Prescott, D. M) Methods in cell physiology, Vol.2. New York : Academic press, 425.
- Vincent, R. F., S. B. Ku. Maurice, and V. A. Wittenbach, 1984. Isolation of mesophyll and paraveinal mesophyll protoplasts from Soybean leaves, *Plant Sci. Lett.* 36: 181-186.
- Watts, J. W., F. Motoyoshi, and Jament M. King, 1974. Problems associated the production of stable protoplasts of cells of Tobacco Mesophyll, *Ann. Bot.*, 38: 667-671.



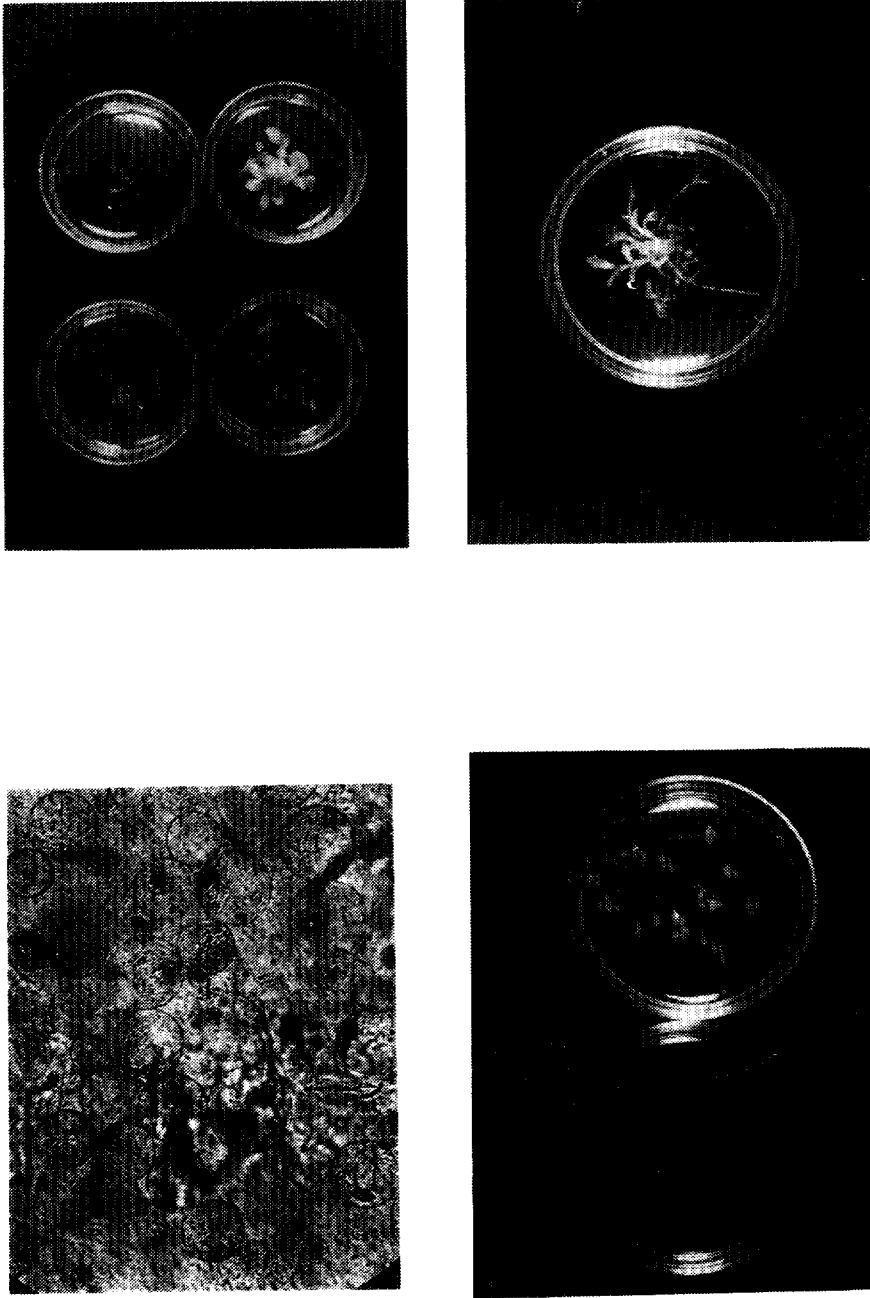


Plate 1. Typical paraveinal mesophyll protoplasts from Petunia (upper left), various development stage from Tobacco paraveinal mesophyll protoplasts (upper right), comparison of mesophyll protoplasts (left) and paraveinal mesophyll protoplasts (right) after 3 months in cult.