

식물 Protoplast의 전기자극 융합에 관여하는 인자

한 성 규 · 유 장 결 · 강 순 선 · 류 기 중 · 오 성 국

제주대학교 농화학과

초록 : Petunia, 당근 및 대두의 protoplast를 전기자극법으로 융합시킬 때의 적정 전기자극 조건과, petunia protoplast의 융합율 그리고 또는 viability에 대한 calcium, magnesium, protease, trypsin, triton X-100, concanavalin A, dimethyl sulfoxide(DMSO), glycerol monooleate 그리고 spermine의 영향을 조사하였다. Protoplast pearl chain 형성을 위한 교류의 주파수와 전압은, petunia의 경우 10 kHz-20 V/cm와 1 MHz-60 V/cm, 당근의 경우에 100 kHz-40 V/cm와 1 MHz-40~80 V/cm, 그리고 대두의 경우에 1 MHz-40~80 V/cm가 양호하였다. Protoplast융합을 위한 최적 직류 처리조건은, petunia의 경우에 교류를 1 MHz, 60 V/cm (15 sec) 처리한 후 직류를 2.5 kV/cm, 40 μ sec 처리했을 때였는데, 이 때 protoplast의 생존율과 융합율은 각각 45 %와 10 %였다. 당근과 대두의 경우는 처리시간에 관계없이 직류 2.5 V/cm 이하에서는 융합이 일어나지 않았고, 2.5 V/cm 이상에서는 protoplast가 파괴되었다. Calcium은 전기자극융합을 촉진시켰는데, 최적 농도는 140 mM이었고 이 때 protoplast의 생존율과 융합율은 43 %와 11 %였다. Magnesium은 융합촉진효과가 없었으나 calcium이 존재할 때는 융합을 촉진하였는데, calcium 140 mM일 때 최적 magnesium농도는 140 mM이었고, 이 때의 생존율과 융합율은 각각 45 %와 13 %였다. 융합배지에 protease, trypsin, triton X-100, concanavalin A, DMSO, glycerol monooleate, spermine을 처리했을 때 융합율은 대조구(11.2 %)에 비해 각각 2.4, 2.1, 1.6, 1.4, 1.8, 1.5, 2.2배로 증가하였고, 생존율은 각각 37 %, 35 %, 38 %, 41 %, 31 %, 37 %, 42 %로 대조구(45.2 %)에 비해 모두 저하되었다(1989년 12월 2일 접수, 1990년 2월 22일 수리).

Protoplast 융합에 그동안 주로 사용되어온 방법은 polyethylene glycol⁷⁾, dextran⁸⁾, calcium(high pH)⁹⁾ 등의 융합촉진제를 사용한 것이었는데, 이러한 화합물들은 각 융합조건 하에서 protoplast에 대해 독성을 나타내는 단점이 있다¹⁰⁾. 그런데 근래 전기자극법에 의한 protoplast 융합기술^{15, 16)}이 개발되어 각광을 받고 있다.

전기자극법은 종래의 방법에 비하여 조작이 간편하며 융합시간이 짧고 융합율이 높을 뿐만 아니라, heterokaryon의 분리가 쉽고 단일 세포쌍 끼리의 융합도 가능하여 선택적 융합이 가능하다는 장점이 있다¹⁾. 그러나 전기자극법에 있어서는 protoplast의 융합율과 생존율이 교류의 주파수, 전압, 처리시간 그리고 직류의 전압, 처리시간등에 따라 달라지며, 식물의 종 또는 protoplast를 분리한 조직부위에 따라서도 상이하다는 것이 알려져 있다¹⁶⁾.

본 연구는 petunia와 당근, 그리고 대두의 protoplast에 대해 전기자극융합시에 필요한 전기자극조건을 확립하고, protoplast의 융합율과 생존율에 대한 몇가지 물질

들의 영향을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

Protoplast의 분리 정제 및 배양

Petunia(hybrida 'Titan red') protoplast는 Murashige & Skoog(MS)배지¹⁰⁾에서 일조적으로 부터 유기시켜 광조건(5 kLux)으로 배양한 callus를 Onozuka R-10(3.0 %), hemicellulase(0.25 %) 및 Macerozyme R-10(0.5 %)를 포함하는 효소용액(140 μ M CaCl₂, 0.6 M sorbitol, 600 μ M HEPES, pH 5.8)으로 처리하여 분리하였다. 대두(var. 'Acme') protoplast는 유묘의 자엽조직으로부터 Miller배지⁹⁾에서 암조건으로 유기배양시킨 callus를 Onozuka R-10(2 %)와 Pectolyase Y-23(0.25 %)를 포함하는 효소용액(1.0mM CaCl₂, 0.55 M sorbitol, pH 5.5)로 분리하였고, 당근 protoplast는 뿌리조직으로 부터 분리한 것이었는데 Onozuka R-10(2 %)과 Macerozyme R-10(0.5 %) 용액(0.55 M sorbitol, pH 5.8)을 사용하였다. 효소처리는 모두

Key words : electrofusion, plant protoplasts

Corresponding author : S. K. Han

이 논문은 1988년도 문교부 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

4시간동안 30 °C에서 하였고, protoplast의 분리 정제에 관한 기타의 방법은 Yeoman-Maeleod의 protoplast분리법¹⁵⁾에 따랐다.

Protoplast의 융합

융합배지(140 μM CaCl₂, 600 μM HEPES, 0.6 M sorbitol, pH 7.0)¹⁶⁾에 들어있는 protoplast를 fusion chamber에 넣고 Elector Cell Manipulator 401 A(BTX Inc. San Diego, CA)를 사용하여 융합시켰다. Dielectrophoresis조건으로써 교류의 전압, 주파수 및 처리시간을, electroporation 조건으로써 직류의 전압과 처리시간을 달리하여 protoplast의 pearl chain 생성과 융합율 및 생존율을 조사하였다. Calcium, magnesium, protease, triton X-100, trypsin, concanavalin A, DMSO, glycerol monooleate, spermine 이 융합율과 생존율에 미치는 영향을 조사할 때는, 융합배지에 이 물질들을 일정농도로 첨가하여 교류 1 MHz, 60 V/cm, 15 sec-직류 2.5 kV/cm, 40 μsec의 조건으로 융합시킨 후 조사하였다.

Protoplast의 pearl chain 형성율, 융합율 및 생존율

Pearl chain형성율, 융합율, 생존율 및 세포벽재생율은 모두 도립현미경(Diaphot-TMD Nikon)하에서 관찰하여 계산했는데, 조사된 전체 protoplast수에 대한 해당 protoplast수를 백분율로 나타내었다. Protoplast의 생존상태는 fluorescein diacetate(FDA)¹⁷⁾를 처리하여 관찰하였다.

결과 및 고찰

1. Protoplast pearl chain형성을 위한 전기자극조건

전기자극에 의한 protoplast 융합과정은 교류 pulse에 의한 pearl chain 형성단계와 직류 pulse에 의한 원형질막 breakdown을 통한 융합 단계로 나누어지는데¹⁸⁾, pearl chain 형성은 융합에 필요한 선행단계로써 교류처리조건에 따라 달라진다. Table 1은 petunia protoplast의 pearl-chain 형성에 대한 교류의 주파수와 전압 그리고 처리시간의 영향을 조사한 결과이다.

주파수 10 kHz에서 전압 20 V/cm로 처리했을 때, 16~20 %의 pearl-chain 형성율을 보였는데 chain의 길이는 비교적 짧았다(protoplast 2~3개). 10kHz에서 전압을 40, 60, 80 V/cm으로 높였을 때는 pearl-chain이 형성되지 않았는데, 그 이유는 이 조건에서 resonance현상이 충분히 일어나지 못해 protoplast의 중성입자화¹⁶⁾가 이루어지지 않은 데에 그 원인이 있는 것으로 생각된다. 주파수 100 kHz에서는 전압이나 처리시간에 관계없이 pearl-chain

이 형성되지 않았는데, 그 이유는 protoplast 회전현상 때문인 것으로 관찰되었다. 주파수 1MHz와 10MHz에서는 다같이 60~80 V/cm의 전압일 때 pearl-chain이 형성되었는데 10 kHz의 chain과 비교했을 때 긴 것들이 많았다. 주파수가 높은 1 MHz와 10 MHz의 경우에 20 V/cm 및 40 V/cm의 낮은 전압에서는 protoplast가 이동되지 않아 pearl-chain이 형성되지 않는 것으로 관찰되었다. Tabel 1의 결과를 종합해 볼 때 petunia protoplast pearl-chain 형성은 10 kHz, 20 V/cm, 10 sec와 1 MHz, 60 V/cm, 15 sec의 교류조건일 때 가장 양호한 것으로 생각되었다.

당근 protoplast의 교류주파수별 pearl chain형성율을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 10 kHz의 경우에 40 V/cm일 때 12~20 %의 chain형성율을 나타냈으며, 전압이 40 V/cm보다 낮거나 높을 때는 protoplast의 회전현상이 일어나 chain이 형성되지 않았다. 100kHz의 경우는 40 V/cm일 때 21~28 %의 chain 형성율을 보여 가장 양호하였고, 40 V/cm 보다 전압이 높을 때는 protoplast의 회전현상으로 chain이 형성되지 않았다. 1 MHz의 경우에는 20 V/cm를 제외하고는 모두 chain 형성이 양호하였는데, chain형성율이 가장 높은 것은 60 V/cm이었다. 10 MHz의 경우는 chain 형성이 거의 없었다.

대두 protoplast의 경우(Table 3)에는 주파수 1MHz일 때 pearl chain이 형성되었는데, 전압을 20 V/cm로 했을 때 이외에는 모두 14 %이상의 chain형성율을 보였다. 주파수 1 MHz 보다 낮을 때는 protoplast 회전이 일어나 pearl chain이 형성되지 않았고, 반면에 주파수가 1 MHz 보다 높을 때는 protoplast의 이동이 일어나지 않아 chain이 형성되지 않았다.

2. Protoplast의 융합율과 생존율에 대한 전기자극조건들의 영향

Pearl-chain 형성이 양호한 10 kHz, 20 V/cm, 10 sec와 1 MHz, 60 V/cm, 15 sec의 두 가지 교류조건을 선택하여 처리한 뒤 직류 pulse조건을 달리하여 petunia protoplast의 융합율과 생존율을 조사한 결과는 Table 4와 같았다.

교류 10 kHz, 20 V/cm, 10 sec 처리후 직류 pulse 25 kV/cm 또는 35 kV/cm를 처리했을 때는 protoplast가 모두 파괴되었으나 0.5 kV/cm와 1.5 kV/cm를 가했을 때는 각각 3~4 %와 6 %의 융합율을 보였다. 교류 1 MHz, 60 V/cm, 15 sec 처리 후 1.5 kV/cm 혹은 2.5 kV/cm의 직류 pulse를 가했을 때 각각의 융합율은 3~6 %와 9~10 %였다. 그러나 교류 1 MHz, 60 V/cm, 15 sec 처리 후 직류 0.5 kV/cm일 때는 protoplast가 움직이지 않아 융합이 일어나

Table 1. Effects of AC pulse treatments on the pearl chain formation of petunia protoplast

Frequency	Amplitude (V/cm)	Time (sec)	No. of protoplasts tested	% of pearl chain formation Protoplast no. per chain		
				2-3	4-6	>7
10 (kHz)	20	5	40	16.4	3.54	NOB
		10	40	10.3	6.9	NOB
		15	40	11.9	4.5	NOB
		20	40	16.1	NOB	NOB
	40	*	40	NRT	NRT	NRT
	60	*	40	NRT	NRT	NRT
	80	*	40	NRT	NRT	NRT
100 (KHz)	20	*	40	NRT	NRT	NRT
	40	*	40	NRT	NRT	NRT
	60	*	40	NRT	NRT	NRT
	80	*	40	NRT	NRT	NRT
1 (MHz)	20	*	40	NMV	NMV	NMV
	40	5	40	NMV	NMV	NMV
		10	40	NMV	NMV	NMV
		15	40	NMV	NMV	NMV
		20	40	10	NOB	NOB
	60	5	41	9.8	NOB	2.4
		10	40	27.5	2.5	NOB
		15	41	14.5	12.2	NOB
		20	39	10.3	2.6	5.1
	80	5	60	16.7	NOB	NOB
		10	40	7.5	10	NOB
		15	38	5.3	10.5	NOB
20		40	5	5	NOB	
10 (MHz)	20	*	40	NMV	NMV	NMV
	40	5	40	NMV	NMV	NMV
		10	40	NMV	NMV	NMV
		15	40	7.5	NOB	NOB
		20	40	7.5	NOB	NOB
	60	5	36	11.5	NOB	NOB
		10	48	12.5	NOB	NOB
		15	35	5.7	5.7	NOB
		20	53	9.4	1.9	1.9
	80	5	37	8.1	NOB	NOB
		10	40	7.5	NOB	5
		15	35	11.4	2.9	NOB
20		38	10.5	2.6	NOB	

NMV : Pearl chains were not formed because the protoplasts were not moved.

NRT : Pearl chains were not formed because the protoplasts were rotated.

NOB : Pearl chain formation was not observed.

* : All of time treatments(5, 10, 15, and 20 sec.).

Table 2. Effects of AC pulse treatments on the pearl chain formation of carrot protoplast

Frequency	Amplitude (V/cm)	Time (sec)	No. of protoplasts tested	% of pearl chain formation		
				Protoplast no. per chain		
				2-3	4-6	>7
10 (kHz)	20	*	50	NRT	NRT	NRT
	40	5	64	7.8	4.6	NOB
		10	76	11.8	5.2	NOB
		15	68	17.6	5.2	NOB
		20	70	14.3	4.1	3.6
	60	*	50	NRT	NRT	NRT
80	*	50	NRT	NRT	NRT	
100 (KHz)	20	5	63	14.2	NOB	NOB
		10	43	18.6	NOB	NOB
		15	33	22.1	3.0	NOB
		20	42	21.9	2.7	1.3
	40	5	41	18.7	3.1	NOB
		10	40	25.4	1.9	NOB
		15	40	25.7	2.1	NOB
		20	42	20.2	2.9	1.1
	60	*	50	NRT	NRT	NRT
	80	*	50	NRT	NRT	NRT
1 (MHz)	20	*	50	NOB	NOB	NOB
	40	5	50	27.1	NOB	NOB
		10	50	24.1	3.4	5.8
		15	50	20.5	2.9	5.8
		20	50	23.7	5.1	5.6
	60	5	52	28.7	9.0	NOB
		10	51	25.0	6.2	2.5
		15	50	20.0	4.0	6.6
		20	50	17.3	4.3	1.4
	80	5	51	32.2	NOB	NOB
		10	50	21.8	3.6	3.6
		15	50	14.5	4.5	10.4
20		52	9.2	4.6	7.6	
10 (MHz)	20	*	50	NOB	NOB	NOB
	40	*	50	NOB	NOB	NOB
	60	*	50	NOB	NOB	NOB
	80	5	51	8.6	NOB	NOB
		10	50	9.4	NOB	NOB
		15	48	10.2	NOB	NOB
20		47	10.0	2.3	NOB	

NMV : Pearl chains were not formed because the protoplasts were not moved.

NRT : Pearl chains were not formed because the protoplasts were rotated.

NOB : Pearl chain formation was not observed.

* : All of time treatment(5, 10, 15, and 20 sec.).

Table 3. Effects of AC pulse treatments on the pearl chain formation of soybean protoplast

Frequency	Amplitude (V/cm)	Time (sec)	No. of protoplasts tested	% of pearl chain formation		
				Protoplast no. per chain		
				2-3	4-6	>7
1 (MHz)	20	5	49	4.7	NOB	NOB
		10	50	4.7	NOB	NOB
		15	50	5.4	NOB	NOB
		20	57	6.2	NOB	NOB
	40	5	50	16.7	NOB	NOB
		10	42	20.0	NOB	NOB
		15	50	9.5	3.2	1.0
		20	52	14.2	4.7	2.3
	60	5	51	15.7	NOB	NOB
		10	50	17.9	1.5	NOB
		15	49	12.3	6.2	1.5
		20	52	5.3	8.6	1.5
	80	5	51	12.8	2.6	NOB
		10	50	16.7	7.1	NOB
		15	50	12.5	8.9	7.14
		20	50	10.1	8.2	10.4
10 (MHz)	20	*	50	NMV	NMV	NMV
	40	*	50	NMV	NMV	NMV
	60	*	50	NMV	NMV	NMV
	80	*	50	NMV	NMV	NMV

NMV : Pearl chains were not formed because the protoplasts were not moved.

NOB : Pearl chain formation was not observed.

* : All of time treatments(5, 10, 15, and 20 sec.).

Table 4. Effects of the DC pulse treatment under the selected AC conditions on the fusion frequency and viability of the pearl-chained protoplasts of petunia

DC Amplitude (kV/cm)	Time (μ sec)	AC pulse			
		10 kHz. 20 V/cm. 10 sec		1 MHz. 60 V/cm. 15 sec	
		F ^a (%)	V ^b (%)	F ^a (%)	V ^b (%)
0.5	20	3.00	62.5	0(N)	57.5
	30	3.03	61.0	0(N)	54.8
	40	3.07	60.7	0(N)	54.0
	50	3.77	60.0	0(N)	53.8
1.5	20	5.96	59.7	2.77	57.2
	30	5.97	58.8	6.34	50.4
	40	5.98	58.8	4.50	49.0
	50	5.97	58.8	3.10	47.9
2.5	20	0(B)	0	8.66	54.5
	30	0(B)	0	10.1	46.6
	40	0(B)	0	10.4	45.2
	50	0(B)	0	8.86	45.1
3.5	20	0(B)	0	0(B)	0
	30	0(B)	0	0(B)	0
	40	0(B)	0	0(B)	0
	50	0(B)	0	0(B)	0

N : Not fused

B : Burst

$$a : \text{Fusion frequency}(\%) = \frac{\text{No. of the fused protoplasts}}{\text{Total No. of the protoplasts tested}} \times 100$$

$$b : \text{Viability}(\%) = \frac{\text{No. of fluorescing protoplasts after electrofusion}}{\text{Total No. of the protoplasts}} \times 100$$

지 않는 반면 3.5 kV/cm일 때는 protoplast가 모두 파괴되었다. 교류처리와 직류처리 중간에 행해지는 compression 조건은 10kHz일 때 30 V/cm, 3 sec 그리고 1 MHz일 때 80 V/cm, 8 sec일 때가 가장 좋았고, compression 전압이 낮을 때는 융합율이 낮았던 반면 너무 높을 때는 protoplast가 파괴되었다. Protoplast의 생존율은 교류주파수가 클수록, 또 직류의 전압이 클수록 감소하는 경향을 보였다. 이상의 결과들을 종합해 볼 때 petunia protoplast 융합의 최적 전기자극 조건은 교류 1 MHz, 60 V/cm, 15 sec-직류 25 kV/cm, 40 μ sec로 판단되었는데, 이때의 융합율과 생존율은 각각 10%와 45%였다.

Petunia와 달리 당근과 대두의 protoplast는 처리시간에 관계없이 융합현상을 관찰할 수 없었는데, 직류 전압이 25 kV/cm보다 낮을 때는 protoplast가 이동되지 않아 융합이 되지 않았고 이보다 전압이 높을 때는 protoplast가 파괴되었다. Petunia와 유사한 전기자극조건 하에서 당근과 대두의 protoplast pearl chain이 형성됨에도 불구하고 융합이 일어나지 않는 이유는 본 실험에서 밝혀지 못했는데, 이에 관해서는 앞으로의 연구가 기대된다.

3. 전기자극 융합시 protoplast의 융합율과 생존율에 대한 여러가지 물질들의 영향

전기자극법으로 protoplast를 융합시킬 때 여러가지 물질들이 융합율에 영향을 미치는 것으로 알려져 있는데^{3, 19)}, 본 실험에서는 calcium, magnesium, protease, spermine, trypsin, DMSO, triton X-100, glycerol monooleate, concanavalin A가 petunia protoplast의 융합율에

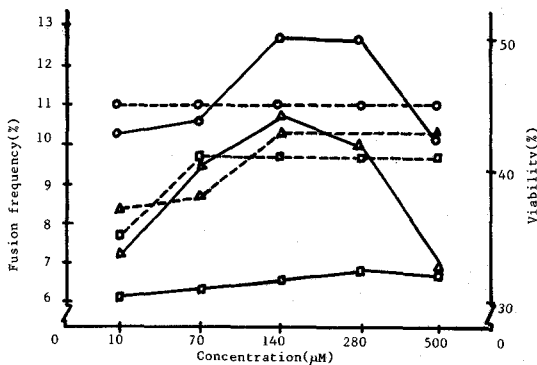


Fig. 1. Effects of the concentrations of calcium and magnesium on fusion frequency and viability of petunia protoplasts, in the fusion medium containing 0.6 M sorbitol and 600 μ M HEPES.

Δ : CaCl₂ concentration, \square : MgCl₂ concentration, \circ : MgCl₂ concentration under 140 μ M CaCl₂, — : Fusion frequency, - - - : Viability.

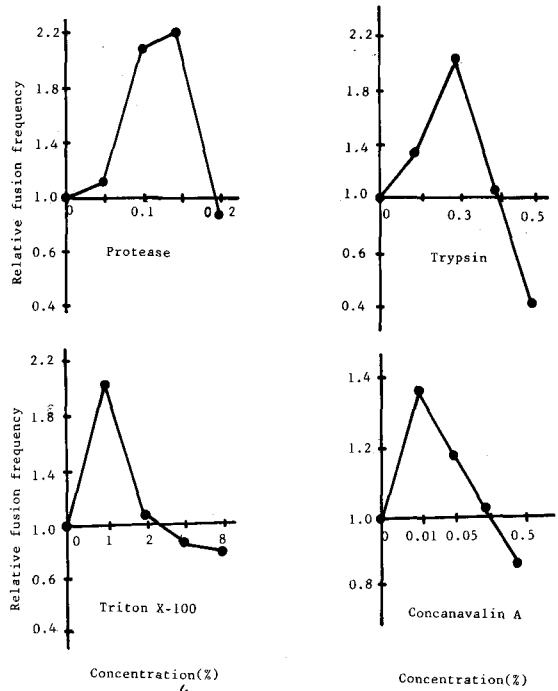


Fig. 2-a. Effects of protease, trypsin, triton X-100, and concanavalin A concentration on the fusion frequency of petunia protoplasts at the incubation time of 10 min. except 15 min. for protease and trypsin, 7 min. for triton X-100. Fusion frequency was expressed as relative value to the control(non-treated)

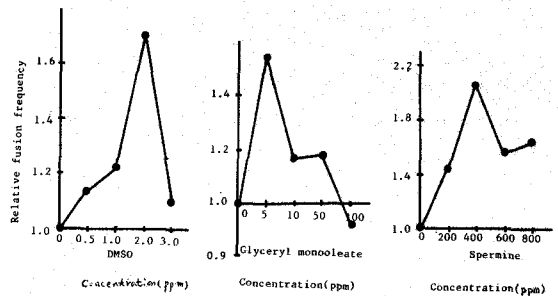


Fig. 2-b. Effects of DMSO, glycerol monooleate, and spermine concentration on the fusion frequency of petunia protoplasts at the incubation time of 10 min. except 15 min. for protease and trypsin, 7 min. for triton X-100. Fusion frequency was expressed as relative value to the control (non-treated)

미치는 영향을 조사하였다.

Fig. 1은 융합배지의 calcium과 magnesium의 농도를 달리한 조건에서 전기자극융합을 시켰을 때 protoplast의 융합율과 생존율 변화를 조사한 결과이다. EGTA를

배지에 첨가하여 calcium을 불활성으로 만들었을 때 융합율과 생존율이 각각 3%와 34%였는데, 배지의 calcium 농도가 10 μ M일 때 72%와 34%, 그리고 140 μ M일 때 107%와 43%로 증가되었다. 이 결과는 calcium이 전기자극 융합율을 증진시킨다는 Okada 등¹²⁾의 보고와 일치하였다.

Magnesium을 배지에 첨가했을 때는 calcium과 달리 protoplast의 생존율은 다소 증가되었으나 융합율은 6~7%로 거의 변하지 않았다. 그러나 magnesium을 calcium (140 μ M)과 함께 사용했을 때는 융합율이 증가하였다. Ohnishi 등¹¹⁾도 magnesium이 융합촉진 효과가 없으나 calcium과 혼용할 때는 융합을 촉진시키는 것으로 보고했다.

Fig. 2는 protease, trypsin, triton X-100, concanavalin A, DMSO, glycerol monooleate 및 spermine이 융합율에 미치는 영향을 조사한 결과이다. 각 물질들의 처리 시간

은 예비 실험결과 융합율이 가장 높은 조건으로하였다.

Protease를 융합배지에 첨가했을 때 융합율이 증가되었는데 최적 농도는 0.15%였고 이 때의 융합율은 대조구에 비해 24배 높았다. Trypsin도 융합율을 증가시켰는데 최적 농도는 0.3%였고, 이 때 융합율은 대조구보다 21배 높았다. Zimmermann 등¹⁹⁾과 Okada¹²⁾등도 단백질분해효소가 융합율을 증가시키는 것으로 보고하였다.

Triton X-100, concanavalin A, DMSO, glycerol monooleate 및 spermine도 모두 융합촉진효과를 나타냈는데, 최적 농도와 이 때의 대조구에 대한 상대적 융합율은 각각 1 ppm-1.9배, 0.01% -1.4배, 20% -1.8배, 5 ppm-1.5배, 400 ppm-2.2배였다. Triton X-100¹¹⁾, concanavalin A¹¹⁾, DMSO¹³⁾, glycerol monooleate¹¹⁾, spermine¹³⁾의 융합촉진효과에 관하여는 다른 연구자들에 의해서도 알려져 있다.

참 고 문 헌

- Bates, G. W., Saunders, J. A. and Sowers, A. E. : Cell Fusion, Plenum Press, New York, pp. 367-396(1987)
- Bray, G. A. : Analytical Biochem., 1, 279-285 (1960)
- Chapel, M., Teissie, J. and Allbert, G. : FEBS LETT., 173-336(1984)
- Fisher, J. M. C., Peterson, C. A. and Bols, N. C. : Stain Technology, 60(2), 69-79(1985)
- Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K. : Exp. Cell Res., 50, 148-151(1968)
- Kameya, T. : Jpn. J. Gen., 50, 417-420(1975)
- Kao, K. N. and Michayluk, M. R. : Planta, 115, 355-367(1974)
- Keller, W. A. and Melchers, G. : Z. Naturforsch., 28, 737-741(1973)
- Miller, C. O. : Modern Methods of Plant Analysis, Vol. 6, ed. by Linkens, H. F. and Tracy, M. V., Springer-Verlag, Berlin, p. 194(1963)
- Murashige, T. and Skoog, F. : Physiol. Plant., 15, 473-497(1962)
- Ohnishi, K., Chiba, J., Goto, Y., and Tokunaga, T. : J. Immun. Methods, 100, 181-189(1987)
- Okada, U., Ohno-Shosaki, T., Oiki, S. : Biomedical Research, 5(6), 511-516(1984)
- Ruzin, S. E., and McCarthy, S. C. : Plant Cell Reports, 5, 342-345(1986)
- Ruzin, S. E. and Suzane C. Mc. : Plant Cell Rep., 5, 342-345(1986)
- Senda, M., Takeda, J., Abe, S. and Nakamura, T. : Plant Cell Physiol., 20, 1441-1443(1979)
- Tempelaar, M. J. and Jones, M. G. K. : Plant Cell Rep., 4, 92-95(1985)
- Widholm, J. M. : Stain Technology, 47(4), 189-194(1972)
- Yeoman, M. M. and Maeleod, A. J. : Plant Tissue and Cell Culture, 2nd ed., ed. by Street, H. E., Oxford, Blackwell Scientific Pub., pp.31-59(1977)
- Zimmermann, U. and Scheurich, P. : Planta, 151, 26-32(1981)
- Zimmermann, U., vienken, J. and Pilwat, G. : Z. Naturforsch., 36c, 173-177(1981)

Factors Affecting Electrofusion of Plant Protoplasts

Sung-Kyu Han, Zang-Kual U, Soon-Suon Kang, Key-Zung Riu and Sung-Gug Oh(Department of Agricultural Chemistry, Cheju National University, Cheju)

Abstract : The optimum conditions of electric stimulation for electrofusion of protoplasts of petunia, carrot and soybean, and the effects of calcium, magnesium, protease, trypsin, triton X-100, concanavalin A, dimethyl sulfoxide(DMSO), glycerol monooleate and spermine on fusion frequency and/or viability of petunia protoplast were investigated. The

optimum frequencies(Hz)-amplitudes(V/cm) of AC pulse for protoplast pearl-chain formation were 10 kHz-20 V/cm and 1 MHz-60 V/cm for petunia, 100 kHz-40 V/cm and 1 MHz-40~60 V/cm for carrot, and 1 MHz-40~80 V/cm for soybean, respectively. The optimum condition of DC pulse treatment at the 1 MHz-60 V/cm-15 sec treatment of AC for electrofusion of petunia protoplasts was 2.5 kV/cm-40 sec, and under this condition the fusion frequency and viability of protoplasts were 45 % and 10 %, respectively, Both of the protoplasts of carrot and soybean were not fused under the AC and DC conditions tested in this experiment. The electrofusion of petunia protoplasts was stimulated by calcium, and the fusion frequency and the viability of the protoplasts were 43 % and 11 %, respectively at the calcium concentration of 140 mM. Although fusion frequency was not affected by magnesium only, magnesium stimulated fusion frequency in the presence of calcium, and the viability and fusion frequency of petunia protoplasts were 45 % and 13 %, respectively, at 140 mM of magnesium-140 mM of calcium. The relative fusion frequencies of petunia protoplasts to the controls were increased by 2.4, 2.1, 1.6, 1.4, 1.8, 1.5 and 2.2 folds, respectively, by the treatments of protease, trypsin, triton X-100, concanavalin A, DMSO, glycerol monooleate, and spermine. The viabilities of petunia protoplasts were decreased by these substances.