

현사시나무(*Populus alba* × *P.glandulosa*)에

대한 배수체 육성연구

(제1차 연도(1))

Induction of polyploids of *Populus alba* × *P.glandulosa*

(First Year Report(1))

연구기관

경상대학교

寄贈

과학기술처
부
도
본

一九八九年
十一月
十日

과학기술처

提 出 文

科學技術處長官 貴下

本 報告書를 “ 현사시나무 (*Populus alba* × *P. glandulosa*)에 對한
倍數體 育成研究 ” 課題의 第1次年度의 報告書(1)로 提出합니다.

1989. 8. 31.

主管研究機關名 : 慶尙大學校

總括研究責任者 : 金鼎錫 (慶尙大學校)

共同研究責任者 : 李浩柱 (江原大學校)

金榮斗 (晉州農林專門大學)

李錫求 (林木育種研究所)

研 究 員 : 金勇旭 (慶尙大學校)

孫玲杰 (上 同)

裴榮美 (上 同)

崔明淑 (江原大學校)

崔承一 (上 同)

여 백

要 約 文

I. 題 目

현사시나무 (*Populus alba* × *P. glandulosa*)에 대한 배양체의 육성 연구
(제 1 차년도 (1))

II. 研究開發의 目的 및 重要性

목재자원의 조기 증수책은 임지비배, 수종개량, 육림기술의 향상 등을 들 수 있으나, 보다 혁신적인 방법은 배수성 이용에 있는데, 본 연구는 속성수이고, 이용도가 높은 poplar에 대하여, 기히 육성한 colchitetraploid인 *Populus alba* × *P. glandulosa*를 이용하여 $4n \times 2n$, $2n \times 4n$, $4n + 2n$, $n + 2n$ 으로 생장이 속한 새 poplar를 육성하게 될것임. 또한 기술의 개발과 기술의 축적이 가능하여 여타 많은 수종의 혁신적 개량에 기여하게 될것임.

III. 研究開發의 內容 및 範圍

연구개발의 최종목표는 다음 4개분야이다.

1. 화아형성 및 개화촉진 : 개화 연한 단축을 위한 화아형성 촉진법 개발.
2. 시험관내 수정 : 배수성간 및 원연의 종간 수정을 위한 생식기관의 기내배양법 및 수정을 향상 기법 개발.
3. 원형질체 단리 및 융합 : n , $2n$ 과 $4n$ 의 체세포 융합법 개발과 속생장체 선발.

4. 새기술의 개발과 축적 : 새기술의 축적으로 여타 육종에 기여함.

IV. 研究開發結果 및 活用に 對한 建議

제 1차년도 성적이므로 구체적인 최종결과는 제 3차년도에 보고할것임.

SUMMARY

Title of the article : Induction of polyploids of *Populus alba*
× *P. glandulosa*.

I. Flower bud induction and fertility improvement.

Following results were obtained on the effect of plant hormones and photoperiods that have influence on growth of embryo of *Populus alba* × *P. glandulosa* in "in vitro" culture.

1. Under 12hrs photoperiod, the growth of embryo was good in high concentrated NAA(3.0 ppm), BAP(0.06ppm) and kinetin(3.0 ppm), and was better M.S. medium than G.D. medium.

2. Under 16hrs photoperiod, the growth of embryo was good in high concentrated medium containing auxin, but it was good in low concentrated medium with cytokinin. And it was better M.S. medium than G.D. medium.

3. Under 20hrs photoperiod, the growth of embryo was good in low concentrated of NAA(0.5 ppm), BAP(0.01 ppm) and in high concentrated medium added either IBA(0.6 ppm) or at kinetin(3.0 ppm) And in hormones treatment, it was grown well on M.S. medium than G.D. medium.

4. Under 24hrs photoperiod and 25 °C temperature, the growth of ovaries was good in concentrated of IAA(1.0 ppm) + BAP(1.0 ppm) than other mixed hormones.

II. Protoplast isolation and fusion.

The experiments were conducted to identify several factors influencing protoplast isolation and to determine optimal culture media and concentrations of phytohormones to cell division, cell colony formation of mesophyll protoplasts from *Populus alba* × *P. glandulosa*. Results obtained were summarized as follows.

1. Optimum enzyme concentrations and incubation times for mesophyll protoplast isolation were cellulase 2.0%, macerozyme 1.0%, hemicellulase 1.2% and 4hrs each.

2. The most effective mannitol concentration in enzyme solution was 0.6M.

3. The most adequate condition of preplasmolysis was cold treatment at 4 °C for 24 hrs incubation in the darkness.

4. The best yields of healthy protoplasts were obtained from 0.6M mannitol, 0.2 mg/l 2,4-D, 0.1 mg/l BAP, one strength Murashige and Skoog inorganic salts in enzyme solution.

5. Budding, cell division and microcolony formation after 7 days protoplast culture with 1.0×10^5 protoplasts/ml density were highly stimulated in modified M.S. medium containing 500 mg/l glutamine, 100 mg/l casamino acid, 1 mg/l ascorbic acid, 1 mg/l calcium D-pantothenate, 2.0 mg/l NAA, 0.5 mg/l BAP, 0.5M mannitol and 0.1M sucrose.

6. The useful combination of plant hormone with modified M.S. medium for cell division and microcolony formation after 7 days protoplast culture was 2.0 mg/l NAA, 1.0 mg/l IAA, 0.2 mg/l 2.4-D and 0.5 mg/l BAP.

7. The best optimum medium for highest cell division frequency and viability after 7 days protoplast culture was modified M.S. supplemented with 100 mg/l casamino acid, 1 mg/l ascorbic acid, 1 mg/l calcium D-pantothenate, 2.0 mg/l NAA, 0.5 mg/l BAP, 0.2 mg/l 2.4-D, 0.45M mannitol, 0.1M sucrose and 18g/l glucose. Compared control (non-heat shock treatment) with heat shock treatment effect, more effective treatment to cell division frequency and viability was control.

Contents

Summary in English	4
I. Introduction	11
II. Materials and Methods	13
1) Flower bud induction and fertility improvement	13
2) Protoplast isolation and culture	14
III. Results and Discussion	18
1) Flower bud induction and fertility improvement	18
2) Protoplast isolation and culture	24
IV. Summary in Korean	36
Literature cited	38

目 次

英文要約	4
第1章 序 論	11
第2章 材料 및 方法	13
第1節 花芽分化 및 稔性向上	13
第2節 原形質體單離 및 培養	14
第3章 結果 및 考察	18
第1節 花芽分化 및 稔性向上	18
第2節 原形質體單離 및 培養	24
第4章 摘 要	36
第1節 花芽分化 및 稔性向上	36
第2節 原形質體單離 및 培養	36
引用文獻	38

여 백

第1章 序 論

우리나라에서 poplar 류의 육종이 시도된 것은 1953년이나, 생장에 있어 heterosis 현상이 강하게 일어나는 *P. alba* × *P. glandulosa* 를 육성한 것은 1964년이다.²⁴⁾ 따라서 poplar 류의 품종 개량은 heterosis 현상의 이용이 효과적이고 보다더 효과적인 방법은 양친 수종에 대한 순계 육성에 의한 종간 교잡법이다. 순계 육성에 의한 homo체의 육성이 임목에 있어서도 일부 가능 하지만 대부분의 수종은 극히 어렵다. 무엇보다도 임목은 세대가 길기 때문에 순계 육성을 수대에 걸쳐 실시 한다는 것이 현실적으로 불가능 하기 때문이다. 이러한 문제를 해결 하는데 있어서 배우체 같은 조직을 배양하여 반수체 식물을 유도하는 기법은 순계 육성에 있어서 획기적인 업적으로 평가되고 있어, 국내^{25,26)}, 외^{50,54)}에 업적이 있다. 그러나 이상의 방법들은 어느 정도의 높은 수정율을 지닌 식물간에는 이용 될것이나, 자가불화합성 및 저수정율의 종, 속간 식물 또는 배수성 식물간에서는 雌, 雄 배우체의 최적 생육조건이 조성되어야 이에 대한 기내배양 연구가 보고 되고있다.^{16,26,30,33,53)} 특히 ovary 배양은 불합성종의 종간 교잡종을 획득 하는데 유용하게 이용되고 있는 방법으로써 Takeshita⁴⁵⁾ 는 ovule 배양에 의하여, Bajaj *et al.*⁶⁾ 은 ovary, ovule 배양등에 의해 종간교잡종을 얻었다.

본 시험은 배수체간교잡에 의한 polyploid 획득의 전단계로써 *Populus alba* × *P. glandulosa*의 female flower bud의 primordia ovary 를 기내에서 배양함에 있어서 배지간 plant hormone, vitamin, amino acid 그리고 photoperiod 의 영향을 조사하였고, 그리고 그의 F₁의 2n 과 4n의 개체

의 원형질체를 분리하여 이들의 세포막 재생능력 및 세포분열 능력을 비교 하고, 아울러 최적배양 조건을 결정하며, 원형질체에 화학적 융합을 PEG 법과 dextran 방법으로, 그리고 전기융합법으로 2n과 4n의 융합 원형질체를 얻고, 아울러 융합 원형질체의 특성 규명 및 배양 반응을 조사연구하기 위하여 실험하였는데, 원형질체에 대한 연구는 초기단계에 있다. 더우기 목본류는 초본류에 비해, 원형질체 분리와 배양이 어려운데 그 이유는 phenol 성물질의 산화로 인해, 단백질의 변성이 초래되고 초본류의 초년세포에 비해 목본류의 다년세포는 불안정하기 때문이다.³⁾ 1972년 Rona and Grignon³⁸⁾ 이 *Acer pseudoplatanus*에서 원형질체를 분리한것이 시초이며, 그후 몇몇 침엽수^{15, 47)}와 활엽수²⁾로 부터 원형질체 분리, 배양에 관한 실험이 이루어 졌는데, 완전한 식물체를 얻은것은 1982년 Vardi et al.⁴⁸⁾ 이 *Citrus*종에서 최초로 성공하였으며, 원형질체 융합에 관한 시도는 Saito⁴¹⁾가 오동나무와 Italy poplar를 융합해서 homokaryon과 heterokaryon을 관찰했으나, 배양에는 실패하였다. Poplar 류의 원형질체 연구는 *Populus tremuloides*³⁹⁾, *Populus tremula*²⁾, *Populus alba* × *P. glandulosa*⁵²⁾에서 원형질체를 분리, 배양시켜 몇번의 세포분열을 관찰하였으며, *Populus sieboldii*⁴²⁾에서는 callus까지 유도했고, plant regeneration 보고³⁶⁾도 있다. 그러나 최근에 Tatemichi et al.⁴⁶⁾에 의하여 종간과 속간의 원형질 융합체를 얻는데 성공하고 있다.

第2章 材料 및 方法

第1節 花芽分化 및 稔性向上

공시 수종은 경남 진양군 소재의 경상남도 임업시험장 수목원의 13년 생의 female *Populus alba* × *P. glandulosa*이다.

Female flower bud를 1987년 10월 22일과 1988년 1월 14일 2회에 걸쳐 채취하여 습기가 있는 거제에 싼것을 vinyl sac에 넣어, 4°C freezer 내에 저장 하였다. 이때 2~4일마다 bud의 환기와 보습 상태를 확인하면서 10월에 채취한 화아는 당년 12월까지 그리고 1월에 채취한 화아는 4월까지 각각 보관 하면서 사용 하였다.

기본배지로 M. S.³²⁾ 와 G. D.¹⁴⁾ 배지를 사용 하였고, 0.8%의 agar, pH 5.7 그리고, sucrose는 5%첨가 하였다. 생장조절제로써 auxin으로는 NAA와 IBA를, cytokinin으로는 BAP와 kinetin을 썼다.

기내 배양을 위한 bud의 소독 방법은 다음과 같다.

- ① 중성세제 (방글방글)에 침적한후 유수에서 3분간 행균.
- ② 0.04% tween 80에 5분간 침적 하였다가 증류수로 10회 행균.
- ③ 95% ethanol에 10초 침적 하였다가 증류수로 3회 행균.

lamina air flow hood내로 소독조건을 옮긴후 소독증류수로 1회 행균.

- ④ 5% NaClO에 20분동안 침적 하였다가 3회 소독증류수로 행균.
- ⑤ 0.1% HgCl₂에 1분간 침적하고 소독증류수로 5회 행균.
- ⑥ HgCl₂에 의한 손상을 최소화하기 위하여 15분동안 소독증류수에 침적시킴.
- ⑦ 70% ethanol에 1분 침적 하고, 소독증류수로 3회 행균.

배지와 사용기구등의 소독은 121°C 에서 15 분동안 15 atm으로 autoclave 로 살균 하였다.

미숙자방 치상은 소독된 bud 는 scale 을 벗긴후 bud 의 중앙에 달린 primordia ovary 1~3 개를 치상하였고, culture test tube 의 크기는 2.5 cm × 10 cm 이고, 약 10 cc 의 medium 에 ovary 의 1/3 정도가 insert 되 게 하여, culture chamber (25°C ± 2)에서 배양 하였다.

第 2 節 原形質體單離 및 培養

원형질체 분리는 “in vitro”에서 자란 유엽 0.2 g 조직을 약 1 mm 폭 으로 절단한다음 preplasmolysis 를 위해 C.P.W.13M 용액 (table 2) 5 ml 를 넣어 1 시간동안 28 ± 1°C 암소에서 방치한다음 pasteur pipet 으로 용액 을 모두 뽑은후 enzyme 용액 (table 1) 3 ml 정도를 넣어 28 ± 1°C , 암소에서 reciprocal shaker (60 strokes / min)로 4 시간 분리후 62 μm pore size 의 nylon mesh 로 여과시켜 분해되지않은 세포조직을 제거하였 으며, 분리된 원형질체가 포함된 효소액은 C.P.W. 9 M (table 2) 3 ml 정도 를 넣어 가볍게 흔들어 고무섞이게 한다음, 저속 centrifuge (Beckman, model TJ-6)에서 100 × g, 5 분간 원심분리시켜 상등액을 뽑아낸 후 C.P.W.20 S (table 2) 6 ml 정도를 넣어 100 × g, 10 분간 원심분리시켜 정제된 원형질체를 얻었다.

총 원형질체 갯수는 Bürker - Türk's haemocytometer (L : 1 mm × W : 1 mm × D : 0.2 mm)를 사용하여 생체중 1 g 당 원형질체수로 환산하였고, 원형질체 생존율은 0.4 M mannitol 를 첨가한 0.25 % Evan's blue 용액 으로 50 분간 염색후 검경하여 전체 원형질체수-염색된 원형질체수 / 전체 원형질체수 × 100 으로 계산하였으며 (fig. 2-9), 건전 원형질체수는 전체

원형질체 수 × 생존율 / 100 으로 계산하였다.

원형질체 배양전까지는 laminar air flow cabinet 내에서 수행하였다. 원형질체 washing 용액 멸균은 1 회용 0.2 μm membrane filter (acrodisc) 로 하였고, 배지 및 효소용액의 멸균은 0.45 μm membrane filter (Gelman Science) 로 1 차적으로 여과한 후, 0.2 μm membrane filter 를 이용해 재차 여과멸균하여 사용하였다.

C.P.W. 20S 용액으로 정제된 원형질체는 pasteur pipet 으로 뽑아 3 ml 정도의 배양배지에 넣어 100 × g, 3 분으로 2 회반복 원심분리시켜 원형질체에 잔존하던 효소액을 완전히 제거하였다. 원형질체 배양밀도는 원형질체 현탁액 1 ml 와 배양배지 1 ml 를 잘 섞은 후, 1.0×10^5 protoplasts / ml 가 되게 조정하여, 5.5 cm petri dish (Nuclon) 에 thin layer culture 방식으로 치상하였다. 그런 후 parafilm 으로 봉한 후 $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 암조건에서 배양시켜 배양시 budding, cell division, cell colony 형성에 미치는 최적 phytohormone 조성, 배양배지의 종류등 여러가지 영향을 조사하였다.

원형질체의 형광염색은 분리된 원형질체의 생존여부를 검사하기 위해 FITC 5 mg / aceton 1 ml 비율로 stock solution 을 만들어 -70°C 저온 chamber (So - low Environmental Equip. Co.) 에 냉동보관시킨 후 필요시 FITC의 stock solution 0.1 ml 를 5 ml C.P.W.9M 에 잘 섞은 후 최종 형광염색액을 사용하였다.⁵¹⁾

그런 후 slide 에 0.2 ml protoplast suspension 을 떨어뜨린 후, FITC 희석액 0.2 ml 를 첨가해 cover glass 를 덮고 5 분간 방치 후 U.V. 하에서 원형질체의 형광발색 정도를 조사하였다.

사진촬영은 Trinocular microscopy (Olympus, Japan) 로 하였고, barrier filter 는 B460, 530, 570 이며 excitation filter 는 U 를 사용했으며 필름은 ASA 400 (Kodak) 으로 사용했다.

Table 1. Composition of enzyme solution used to isolation of *populus alba* × *P. glandulosa* mesophyll protoplasts

Enzymes	
Cellulase 'Onozuka' R - 10 ^a	2.0 %
Macerozyme R - 10 ^b	1.0 %
Hemicellulase ^c	1.2 %
Additives	
MES buffer ^d	3.0 mM
BSA ^e	100.0 mg
Potassium citrate (K ₃ C ₆ H ₅ O ₇ · H ₂ O)	166.0 mg
KH ₂ PO ₄	27.2 mg / ℓ
KNO ₃	101.0 mg / ℓ
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1480.0 mg / ℓ
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246.0 mg / ℓ
KI	0.16 mg / ℓ
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025 mg / ℓ
Mannitol	0.6 M
Distilled water	100 ml
pH	5.6

a, b. Yakult Pharmaceutical Co., Ltd., Japan

c. Sigma Chemical Co., Ltd., USA

d. 2-(N - Mopholino) ethane sulfonic acid (Sigma)

e. Bovine serum albumine

Table 2. Composition of *Populus alba* × *P. glandulosa* mesophyll protoplasts washing and floating solution

<u>Reagents</u>	<u>Washing solution</u>	<u>Floating solution</u>
C.P.W. salts		
KH ₂ PO ₄	27.2 mg/l	27.2 mg/l
KNO ₃	101.0 mg/l	101.0 mg/l
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1480.0 mg/l	1480.0 mg/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246.0 mg/l	246.0 mg/l
KI	0.16 mg/l	0.16 mg/l
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025 mg/l	0.025 mg/l
Sucrose ^a	—	21 %
Mannitol ^b	13 %, 9%	—
Distilled water	100 ml	100 ml
pH	5.6	5.6

a. C.P.W.21 S medium : C.P.W. salts with 21 % sucrose

b. C.P.W.13 M medium : C.P.W. salts with 13 % mannitol

b. C.P.W. 9M medium : C.P.W. salts with 9 % mannitol

第3章 結果 및 考察

第1節 花芽分化 및 稔性向上

배지의 종류에 따른 plant hormone이 미숙배의 발육에 미치는 영향을 조사한 결과는 table 3과 같다. 즉 광주기 12시간의 발육은 M. S., G. D.배지 공히 hormone의 농도가 높을수록 생육이 좋은 경향인데 M. S. 배지에 auxin 첨가구는 NAA의 3.0ppm구가 control에 비하여 138%로 가장 좋고 (fig. 1-a), cytokinin첨가구는 BAP 0.06 ppm구가 control에 대하여 169%로 가장 생육이 좋다 (fig. 1-c). 한편 G.D.배지에서의 auxin 첨가구는 M. S.배지에서의와 같이 NAA 3.0ppm농도구 (fig. 1-e)와 IBA 0.1 ppm 농도구가 각각 135%, 138%로 가장 생육이 좋고, cytokinin 첨가구도 M. S. 배지에서의와 같이 BAP 0.06 ppm농도구에서 153%로 가장 생육이 좋았다 (fig. 1-g). 따라서 12시간 광주기구에서는 M. S.배지에 BAP 첨가구가, G. D. 배지구는 물론 어느 hormone첨가구 보다 우수 하였다. 자방의 형태도 NAA첨가구에서 정상 형태를 하였으나 (fig. 1-c, g), 자방벽 색은 IBA 첨가구에서 보다 염록색을 띤다.

광주기 16시간에서 미숙배의 발육과 plant hormone과의 관계를 조사한 결과는 table 4와 같이 hormone 농도에 따라 발육크기에 차이가 심한 경향인데, 특히 IBA의 M. S.배지에 auxin 첨가구는 12시간 광조사구와 같은 형상이나, G.D. 배지구에는 12시간 광조사구와는 달리, IBA 고농도(0.6 ppm) 구에서 생장이 77.6% 양호하다. 그리고 kinetin첨가구의 M. S. 배지에서의 발육 (fig. 1-d)은 광주기 12시간의 결과와 같은 경향이나, G.D. 배지에서의 발육은 광주기 12시간에서와는 달리 저농도 hormone 첨가가 양호 하였다 (fig. 1-h). M. S. 배지의 IBA 0.6 ppm 첨가구와 BAP 0.06 ppm

Table 3. Correlation between the different concentration of growth regulators and photoperiod 12hrs on ovary culture in female flower bud of *Populus alba* × *P. glandnlosa*

Basic media	Control	NAA		IBA		BAP		Kinetin					
		ppm	O.G.L. ± SE(mm)	G.R.(%)	ppm	O.G.L. ± SE(mm)	G.R.(%)	ppm	O.G.L. ± SE(mm)	G.R.(%)			
	2.95	0.5	3.56 ± 0.18	120	0.1	3.33 ± 0.12	112	0.01	3.56 ± 0.13	120	0.5	2.95 ± 0.12	100
M.S.	±	1.5	3.94 ± 0.28	134	0.3	3.45 ± 0.12	116	0.03	4.17 ± 0.14	141	1.5	2.95 ± 0.20	100
	0.16	3.0	4.10 ± 0.24	138	0.6	3.71 ± 0.26	125	0.06	5.00 ± 0.41	169	3.0	3.25 ± 0.17	100
	2.45	0.5	2.88 ± 0.12	117	0.1	3.39 ± 0.22	138	0.01	2.11 ± 0.07	86	0.5	2.63 ± 0.11	107
G.D.	±	1.5	3.36 ± 0.14	137	0.3	2.64 ± 0.14	107	0.03	3.44 ± 0.13	140	1.5	3.11 ± 0.20	126
	0.12	3.0	3.33 ± 0.22	135	0.6	2.67 ± 0.19	108	0.06	3.75 ± 0.14	153	3.0	3.44 ± 0.13	140

Notes : Culture conditions

room temperature : 25°C light intensity

growing periods : 3weeks at 600~750 lux for 12hrs day

bedding date : 1st, 88.1.21, 2nd, 88.4.16

investigations : 1st, 88.2.11, 2nd, 88.5.5

O.G.L. : length of ovary grown(mm)

G.R. : growth rate(%)

test tubes : 20 test tubes in each concentration of hormones

Table 4. Correlation between the different concentration of growth regulators and photoperiod 16hrs on ovary culture in female flower bud of *Populus alba* × *P. glandulosa*

Basic media	Control	NAA		IBA		BAP		Kinetin					
		ppm	O.G.L. ± SE(mm)	G.R.(%)	ppm	O.G.L. ± SE(mm)	G.R.(%)	ppm	O.G.L. ± SE(mm)	G.R.(%)			
	3.60	0.5	3.80 ± 0.17	105	0.1	3.70 ± 0.11	102	0.01	3.89 ± 0.11	108	0.5	4.00 ± 0.50	111
M.S.	±	1.5	3.55 ± 0.17	98.6	0.3	3.75 ± 0.25	104	0.03	3.50 ± 0.29	97.2	1.5	4.08 ± 0.08	113
	0.16	3.0	3.95 ± 0.17	109	0.6	4.88 ± 0.38	135	0.06	4.50 ± 0.19	125	3.0	3.86 ± 0.10	107
	2.63	0.5	3.33 ± 0.14	126	0.1	2.85 ± 0.11	108	0.01	4.05 ± 0.12	153	0.5	3.59 ± 0.09	136
G.D.	±	1.5	3.60 ± 0.12	136	0.3	3.25 ± 0.11	123	0.03	4.00 ± 0.13	152	1.5	3.54 ± 0.11	134
	0.24	3.0	3.35 ± 0.13	127	0.6	3.44 ± 0.13	130	0.06	2.07 ± 0.13	78	3.0	3.33 ± 0.21	126

Notes : Culture conditions were the same as those in table 1

bedding date : 1st, 87.12.18, 2nd, 88.3.17

investigations : 1st, 88.1.9, 2nd, 88.4.3

첨가구가 control에 대하여 135%, 125%로 가장 좋았다.

광주기 20시간 조사구에서 plant hormone이 생육에 미치는 영향은 table 5

Table 5. Correlation between the different concentration of growth regulators and photoperiod 20hrs on ovary culture in female flower bud of *Populus alba* × *P. glandulosa*

Basic media	Control	NAA		IBA		BAP		Kinetin					
		ppm	O.G.L.±SE(mm)	G.R.(%)	ppm	O.G.L.±SE(mm)	G.R.(%)	ppm	O.G.L.±SE(mm)	G.R.(%)			
	3.94	0.5	5.22±0.29	132	0.1	3.65±0.17	92	0.01	4.33±0.17	109	0.5	4.22±0.33	107
M.S.	±	1.5	3.96±0.07	100	0.3	4.06±0.11	103	0.03	4.90±0.33	124	1.5	4.72±0.30	119
	0.12	3.0	4.33±0.15	109	0.6	4.40±0.19	111	0.06	5.14±0.26	130	3.0	5.09±0.20	129
	2.88	0.5	3.82±0.17	132	0.1	3.05±0.12	105	0.01	3.79±0.07	131	0.5	2.75±0.11	95
G.D.	±	1.5	3.85±0.15	116	0.3	3.15±0.13	109	0.03	3.00±0.12	104	1.5	2.33±0.05	80
	0.13	3.0	3.31±0.23	114	0.6	3.36±0.12	116	0.06	3.00±0.11	104	3.0	3.21±0.15	111

Notes : Culture conditions were the same as those in table 1

bedding date : 1st, 88.1.28, 2nd, 88.3.31

investigations : 1st, 88.2.18, 2nd, 88.4.21

에 나타나 있는 바와 같다. 즉 광주기 20시간의 발육이 M. S. 배지와 G. D. 배지의 IBA 첨가구는 공히 16시간 구와 같이 hormone의 농도가 높을 수록 생육이 좋은 경향이나 (fig. 1-b, f), M. S. 배지의 NAA 첨가구는 12시간과 16시간 처리구와 달리 저농도(0.5 ppm)에서 생육이 좋고, M. S. 배지의 BAP 첨가구는 12시간과 16시간 처리구와 같이 고농도구가 control에 비하여 130%로 발육이 좋으나, G. D. 배지의 BAP 첨가구는 16시간 처리구에서와 같이 저농도에서 발육이 양호 하였다.

M. S. 배지와 G. D. 배지 공히 cytokinin 첨가구에서는 12시간 처리구와 같이 (fig. 1-c), 고농도에서 발육이 좋았다. 광주기 20시간 광조사에서는 M. S. 배지에 NAA 0.5 ppm 첨가구가 control에 비하여 132%로 어느 광조사에서보다 가장 발육이 좋았다. 그리고 자방의 형태와 색깔은 M. S.의 BAP 0.01 ppm 첨가구에서 정상자방에 가까운 형태로 성장하고 있다.

이상에서 배발육에 대한 plant hormones 과 광주기와의 상관은, NAA는 광주기 20시간에서는 저농도에서 예민하게 영향하였고, IBA는 어느 media를 막론하고 긴 광주기에서는 고농도가 예민하게 작용 하였다. BAP는 M. S. 배지에서는 고농도 첨가가 배발육에 좋은 영향을 끼치나, G. D. 배지에

Table 6. The effects of different concentrations of phytohormones on growth under 16hrs / day (top) and 24hrs / day (bottom) light treatments of ovaries in *P. alba* × *P. glandulosa* (Temp. 25°C)

Hormones Cont.		Concentrations (ppm)															Mean		
IAA	—	1.0	1.0			1.0		1.0	1.0	1.0	1.0		10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	30.2 (100%)
BAP	—	0.1	0.1	0.1	0.1	1.0	1.0	1.0	1.0	5.0	1.0	0.1	0.1	0.1	1.0				
GA ₃	—	0.5		0.5	5.0	0.5	0.5	5.0				5.0	0.5		5.0	5.0	0.5	5.0	
Mean weight (mg)		12.0	30.0	48.2	36.9	29.0	48.8	34.0	32.3	29.3	27.5	15.0	30.9	28.5	28.9	19.5	16.0	28.0	30.2 (100%)
IAA	—	1.0	1.0			1.0		1.0	1.0	1.0	1.0		10.0	10.0	10.0	10.0	10.0		
BAP	—	0.1	0.1	0.1	0.1	1.0	1.0	1.0	1.0	5.0	1.0	0.1	0.1	1.0	1.0				
GA ₃	—	0.5		0.5	5.0	0.5	0.5	5.0				5.0		5.0	5.0		5.0		
Mean weight (mg)		13.0	41.7	44.4	69.0	54.0	55.8	31.0	55.4	77.5	45.5	30.0	16.6	27.2	28.9	28.5	32.1	42.5	42.5 (140.7%)

Culture conditions : Medium, M. S. Light intensity, 3Klux

서는 긴 광주기에서는 저농도의 hormone 이 예민하게 작용하고 있다.

Cytokinin의 배발육에 대한 감성은 어느 배지에서나 고농도가 긴 광주기에서 특히 예민한 경향인데, 기왕의 보고^{18,31,44)}와 같이 광조사 시간에 따른 plant hormone의 영향인 것으로 추측할 수 있다.

그리고 hormone의 종류와 농도가 발육과 착화에 미치는 영향을 田淵와 古越⁴⁴⁾는 *Chamaecyparis obtusa*에 대한 GA의 농도에서, 板鼻²⁰⁾는 *Larix*에 대한 cytokinin의 영향에서, Zenkteler *et al.*⁵³⁾은 *Brassica*의 몇종의 embryo배양에서 M. S. mineral medium에 대한 영향등 많은 보고가 있다.^{21,40)}

Table 6은 몇가지 hormone에 대한 농도별 혼합처리 결과인데, 광주기 24시간 처리하에 IAA 1.0 ppm, BAP 1.0 ppm 첨가구에서 ovary의 평균량이 77.5 mg으로 가장 ovary의 생육이 좋았으나, 광주기 16시간 처리에서는 IAA 1.0 ppm, BAP 1.0 ppm, 그리고 GA₃ 0.5 ppm 첨가구에서 ovary의 평균량이 48.8 mg으로 생육이 가장 좋았다. 그리고 같은 24시간 광주기 처리에서도 25℃이하의 배양구가 18℃에서 보다 생육이 월등히 좋았다(table 7)

Table 7. The effects of different concentrations of phytohormones of on growth 24 hrs/day light treatments of ovaries in *P. alba* × *P. glandulosa* (Temp. 18℃)

Hormones	Cont.	Concentrations (ppm)						Mean
IAA	—	1.0		1.0	1.0	1.0	10.0	
BAP	—	0.1	0.1	1.0	1.0	5.0	0.1	
GA ₃	—	0.5	5.0	0.5			0.5	
Mean weight(mg)	7.6	28.0	30.0	21.1	12.0	24.0	14.2	21.55 (71.4%)

Culture conditions : Medium, M. S. Light intensity, 3 Klux

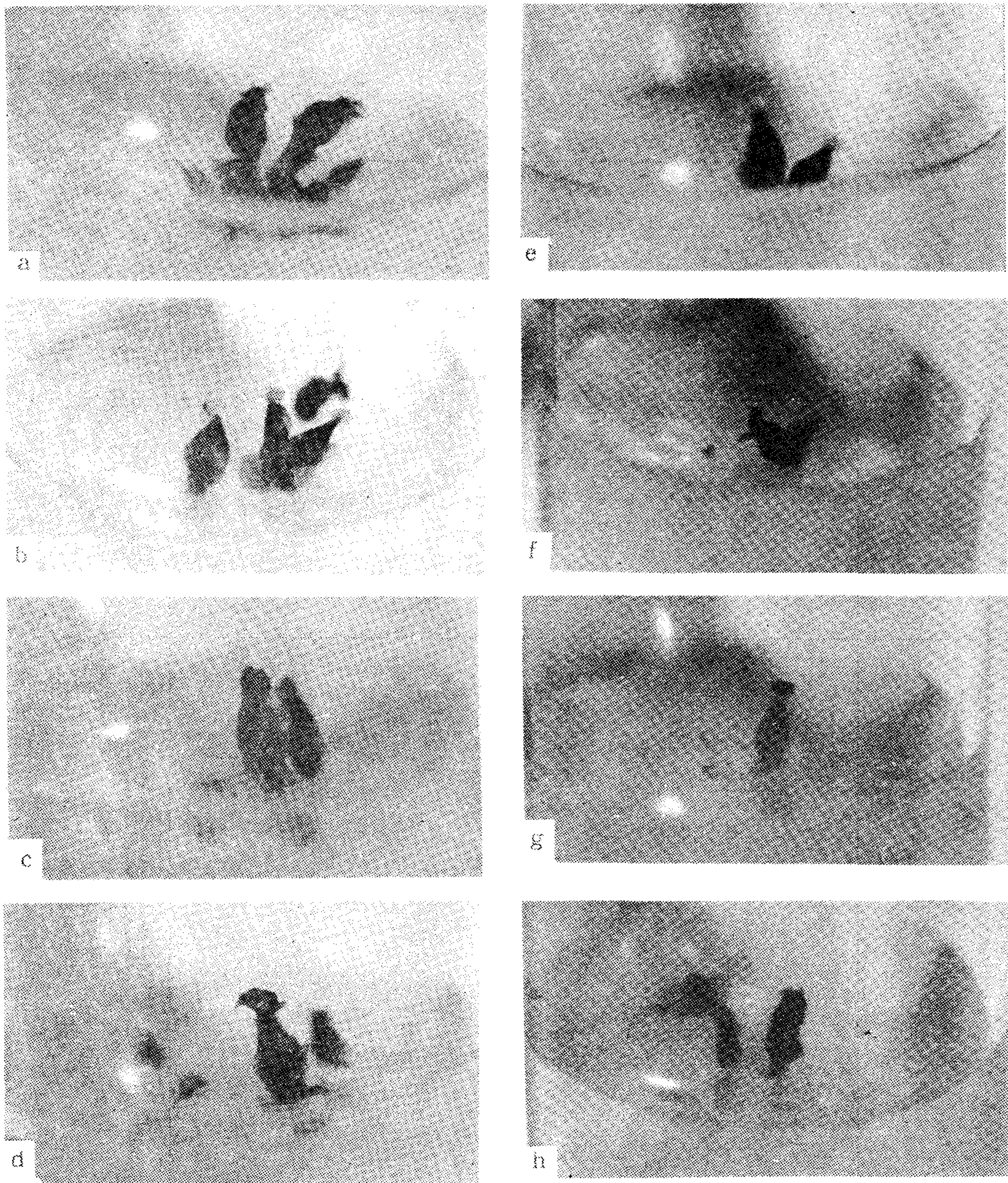


Fig. 1. Effect of auxin and cytokinin on "in vitro" culture at 25°C for 3 weeks period of female flower bud of *Populus alba* × *P. glandulosa*. a) : M.S. + 3.0ppm NAA, 12hrs/day. b) ; M.S. + 0.6ppm IBA, 20hrs/day. c) ; M.S. + 0.06ppm BAP, 12hrs/day. d) ; M.S. + 3.0ppm kinetin, 16hrs/day. e) ; G.D. + 3.0ppm NAA, 12hrs/day. f) ; G.D. + 0.6ppm IBA, 20hrs/day. g) ; G.D. + 0.06ppm BAP, 12hrs/day. h) ; G.D. + 0.5ppm kinetin, 16 hrs/day.

第 2 節 原形質體單離 및 培養

효소의 종류와 농도, 그리고 단리시간차에 의한 처리로 원형질체 분리와 생존율을 조사한 결과는 table 8과 같이 cellulase 2.0%, macerozyme 1.0%, hemicellulase 1.2%로 4시간 처리한 IV구에서 5.3×10^6 protoplasts/g. F. W.로 가장 높은 분리율을 나타냈으며 (fig. 2-a), 가장 높은 생존율은 98.4%로, 같은 농도에서 3시간 분리하였을때이고, 분리에 영향을 준 효소는 macerozyme 보다는 cellulase인 경향인데, 이것은 초본식물에 비하여 세포벽의 구조가 견고하거나, 효소활성을 저해시키는 대사산물의 분비가 많은 탓으로 생각된다.⁴⁹⁾ 그리고 최적 효소처리시간이 경과함에 따라 생존율이 감소하는 경향인데, 이것은 Alan and Martin⁵¹⁾이 지적하듯이 효소내 독성물질이 원형질체에 악영향을 주어 생존에 영향을 끼친 결과로 추측된다. 따라서 Julie et al.²³⁾은 *Populus* 종에서 단시간내 효율적인 원형질체 분리를 위한 leaf grinding과 leaf debris washing 방법을 시도하고 있다. 목본식물의 원형질체 분리에 사용되는 효소의 종류와 농도는 수종에 따라 다양한데^{49, 37)}, *Populus* 류의 경우에는 Ahuja²⁾가 *Populus tremula*에서, Youn et al.⁵²⁾은 *Populus alba* × *P. glandulosa*에서, 박 등³⁵⁾은 *P. euramericana*에서 보고하고, 그리고 *Populus alba* × *P. glandulosa*³⁴⁾에서 cellulase 2.0%, macerozyme 0.8%, hemicellulase 1.2%, driselase 2.0%, pectolyase Y-23 0.05%가 가장 효과적인 것으로 보고하고 있다. Table 9는 삼투압의 효과를 관찰하기 위하여 mannitol 농도에 따른 원형질체 분리와 생존율을 조사한 결과인데, 생존율은 0.4 M, 0.5 M에서는 각각 87.6%, 87.7%로 낮게 나타났으나, 그외의 농도에서는 대체로 높은 편인데, 0.6 M에서 3.4×10^6 protoplasts/g. F. W., 96.5%로서 가장 높은 원형질체 분리와 생존율을 나타내어, Hyun¹⁹⁾, Park³⁴⁾ 등의 결과와 일치하는데 반하여, 0.3 M, 0.4 M에서는 많은 원형질체가 파괴되었고, 0.7 M에서는 약간 위축되는 경향을 보였다.

Table 8. The effects of four different enzyme concentrations on the isolation of *Populus alba* × *P. glandulosa* mesophyll protoplasts at different incubation times in 0.6M mannitol

Enzyme concentrations	Incubation times (hrs)	Protoplast yield ($\times 10^6$ /g.F.W.)	Healthy protoplasts ($\times 10^6$ /g.F.W.)	Viability (%)
I. Cellulase R-10 ^a 1.0 %	3	1.6 ± 0.01	1.6 ± 0.01	98.1 ± 0.29
Macerozyme R-10 ^b 1.0 %	4	2.3 ± 0.07	2.2 ± 0.06	98.3 ± 0.82
Hemicellulase ^c 0.6 %	5	3.8 ± 0.05	3.7 ± 0.05	97.8 ± 0.15
	6	3.7 ± 0.08	3.6 ± 0.08	94.9 ± 0.18
II. Cellulase R-10 2.0 %	3	3.2 ± 0.06	3.1 ± 0.06	98.1 ± 0.15
Macerozyme R-10 0.5 %	4	3.2 ± 0.04	3.1 ± 0.05	95.8 ± 0.56
Hemicellulase 0.6 %	5	3.6 ± 0.04	3.5 ± 0.05	97.8 ± 0.35
	6	2.1 ± 0.05	2.1 ± 0.05	96.5 ± 0.34
III. Cellulase R-10 1.0 %	3	0.9 ± 0.05	0.9 ± 0.04	93.2 ± 0.23
Macerozyme R-10 0.5 %	4	2.9 ± 0.05	2.8 ± 0.05	93.1 ± 0.19
Hemicellulase 1.2 %	5	3.3 ± 0.01	3.2 ± 0.01	92.0 ± 0.26
	6	1.9 ± 0.05	1.8 ± 0.03	91.0 ± 0.28
IV. Cellulase R-10 2.0 %	3	3.4 ± 0.04	3.3 ± 0.04	98.4 ± 0.17
Macerozyme R-10 1.0 %	4	5.3 ± 0.04	5.1 ± 0.04	96.9 ± 0.47
Hemicellulase 1.2 %	5	2.7 ± 0.07	2.6 ± 0.07	94.4 ± 0.11
	6	2.3 ± 0.05	2.2 ± 0.09	95.4 ± 0.27

• Isolation conditions : 28 ± 1°C darkness, 4hrs

a, b. Yakult Pharmaceutical Co., Ltd., Japan

c. Sigma Chemical Co., Ltd., USA

그러나 *Populus alba* × *P. glandidentata*⁷⁾와 *Populus tremula*²⁾에서는 0.7 M이 효과적이라고 보고하고 있다. 한편, 0.3 M, 0.4 M에서의 원형질체 분리는 각각 0.7×10^6 protoplasts / g. F. W., 1.4×10^6 protoplasts / g. F. W.로서 다른 농도에 비해 훨씬 낮은 편이나, 0.3 M에서의 생존율은 96.5 %로 양호하게 나타났으며, 박 등³⁵⁾의 *P. euramericana*에서의 결과와 일치하는 경향을 보였다.

Table 9. The effect of mannitol concentrations in enzyme solution on yield and viability of *Populus alba* × *P. glandulosa* mesophyll protoplasts

Mannitol	Protoplast yield ($\times 10^6$ / g. F. W.)	Healthy protoplast ($\times 10^6$ / g. F. W.)	Viability (%)
0.3 M	0.7 ± 0.05	0.7 ± 0.04	96.5 ± 0.17
0.4 M	1.4 ± 0.04	1.2 ± 0.03	87.6 ± 1.21
0.5 M	3.0 ± 0.05	2.6 ± 0.04	87.7 ± 0.72
0.6 M	3.4 ± 0.08	3.3 ± 0.08	96.5 ± 0.17
0.7 M	3.2 ± 0.11	3.1 ± 0.15	96.0 ± 0.47

• Isolation conditions : $28 \pm 1^\circ\text{C}$, darkness, 4 hrs

그리고 4°C 의 저온에서 preplasmolysis를 시키면 원형질막의 안정성을 증대시키고, 세포내 전분립을 감소시켜 생존율이 높은 원형질체를 얻기위한 방법으로 이용되며⁴³⁾ Iversen²²⁾는 gibberellin 첨가로 starolith starch 분해를 촉진시킨다고 보고하고 있으며, cystein 첨가는 phenol, 혹은 phenol 산화유도체를 억제시켜, 효소의 활성에 영향을 끼친다고 보고했는데⁴⁹⁾ *Pinus Pinaster* 경우 cystein 첨가로 기존의 분리양보다 3배정도 많이 분리하였다고 하였지만¹²⁾, table 10에서보면 다른 처리구보다 도리어 낮은 분리율과

생존율을 나타내어 별 효과가 없는것으로 나타났다.

생존율은 암상태에서 1시간 처리 할 경우 98.8 %로 가장 높았으며, 가장 효율적인 처리구로서는 4 °C, 암상태에서 24시간 처리로서, 4.7×10^6 protoplasts /g. F. W., 92.0 %의 분리율과 생존율을 보였다.

Table 10. The effect of preplasmolysis on yield and viability of *Populus alba* × *P. glandulosa* mesophyll protoplasts in C.P.W.13M

Preplasmolysis conditions	protoplast yield ($\times 10^6$ /g.F.W.)	Healthy protoplast ($\times 10^6$ /g.F.W.)	Viability (%)
Dark, 1hr	3.0 ± 0.16	2.9 ± 0.16	98.8 ± 0.3
Light, 1hr ^a	1.5 ± 0.21	1.5 ± 0.19	98.1 ± 0.4
Gibberellin, 1hr (10 mg/l)	3.5 ± 0.08	3.3 ± 0.07	93.5 ± 1.0
Cystein, 1hr (30mM)	2.0 ± 0.06	1.5 ± 0.06	74.2 ± 1.3
Dark, 4 °C, 1hr	3.3 ± 0.09	3.1 ± 0.09	95.2 ± 0.6
Dark, 4 °C, 24hrs	4.7 ± 0.31	4.3 ± 0.28	92.0 ± 0.1
Dark, 4 °C, 48hrs	2.8 ± 0.16	2.6 ± 0.15	93.2 ± 0.6

• Incubation condition : 28 ± 1 °C

a. 750 - 800 lux

Table 11 은 원형질체 분리시 효소용액내 M. S. salt, auxin, cytokinin 영향을 조사한 것으로 1 M. S. salt 에 2.4-D, BAP가 각각 0.2 mg/l,

0.1 mg/l 가 첨가된 구에서 3.5×10^6 protoplasts/g. F. W.로 가장 많은 건전원형질체가 분리되었으며, 생존율은 1 M. S. salt 에 1.0 mg/l 2.4-D, 0.1 mg/l BAP가 첨가된 처리구에서 92.3 %로 가장 높았다. Auxin은 세포벽의 plasticity를 증가시켜 간접적으로 cellulase 활성을 증가시키며¹¹⁾, 효소액내에 inorganic salt의 낮은농도는 원형질체 분리를 촉진시킨다는 보고가 있는데¹⁰⁾ 이와는 달리 1 M. S. salt에서 최대분리율을 보여, 1/2M. S. salt, 1/10M. S. salt와의 결과치와는 별 차이가 없었다. Daniel⁸⁾은 *Vitis vinifera*의 엽조직으로부터 원형질체 분리시, 1/10 M. S. salt와 5.0 mg/l 2.4-D, 0.1 mg/l BAP에서 최대분리율을 나타내어 본 실험의 결과치와는 다른 양상을 나타냈다.

Table 12은 수정 M. S.³²⁾, W. P. M.¹⁾, A. C. M.¹⁾ 배양배지에 대한 원형질체의 budding, cell division 정도, microcolony 형성유무를 조사한것인데, W. P. M. 배지는 M. S. 배지를 변형시킨것으로서 목본조직배양을 위한 배지로 이용되며 A. C. M. 배지는 W. P. M. 배지를 변형시켜 aspen의 성장과 분화를 촉진하는 배지로 알려져 있다. 배양 7일후의 budding 형성정도는 각 배지별로 비슷했으나, cell division(fig. 2-b) 정도는 수정 M. S. 배지가 유효한 것으로 나타났고, microcolony 형성(fig. 2-c, d) 또한 수정 M. S. 배지에서만 형성되어, 다른 두배지 보다는 효과적이었는데, 이것은 *Populus* 원형질체 배양에는 macronutrient가 풍부한 M. S. 배지가 더욱 효과적인것으로 생각된다. Koyana, et al.²⁷⁾는 *Quercus serrata*에 대하여 sucrose가 없는 M. S. 배지가 cell division에 좋다고 보고하고 있으며, Chun⁷⁾은 *Populus alba* × *P. glandidentata*에서 M. S. 배지가 cell division과 colony 형성에, 그리고 Lee²⁸⁾는 B5 배지가 budding, cell division에 각각 좋다고 보고하고 있다.

Table 11. The effect of different M.S. salts and hormone concentrations in isolation enzyme of *Populus alba* × *P. glandulosa* mesophyll protoplasts

Mannitol	Salts	2.4-D(<i>mg/l</i>)	BAP(<i>mg/l</i>)	Protoplast yield (×10 ⁶ /g.F.W.)	Healthy protoplast (×10 ⁶ /g.F.W.)	Viability (%)
0.6 M	1 M.S.	0.0	0.00	4.3 ± 0.16	3.4 ± 0.13	79.6 ± 2.0
0.6 M	1 M.S.	0.2	0.01	2.8 ± 0.43	2.1 ± 0.32	74.4 ± 3.3
0.6 M	1 M.S.	0.2	0.10	4.0 ± 0.06	3.5 ± 0.05	87.5 ± 1.0
0.6 M	1 M.S.	1.0	0.01	1.3 ± 0.08	1.1 ± 0.06	82.8 ± 3.2
0.6 M	1 M.S.	1.0	0.10	3.1 ± 0.20	2.9 ± 0.19	92.3 ± 1.4
0.6 M	1 M.S.	5.0	0.01	3.6 ± 0.47	2.1 ± 0.28	60.0 ± 3.1
0.6 M	1 M.S.	5.0	0.10	3.3 ± 0.24	3.3 ± 0.19	81.4 ± 2.5
0.6 M	1/2 M.S.	5.0	0.10	3.3 ± 0.19	3.3 ± 0.16	87.7 ± 1.0
0.6 M	1/10 M.S.	5.0	0.10	3.0 ± 0.32	3.0 ± 0.25	92.1 ± 0.7

- Isolation conditions : 28 ± 1°C , darkness, 4hrs
- 1 M.S. : Full strength Murashige and Skoog salt medium

Table 12. The effect of media on budding, cell division and microcolony formation of *Populus alba* × *P. glandulosa* mesophyll protoplasts after 7 days in culture

Medium	Budding	Cell division 7 days	Microcolony formation
M.S. - M ^a	+	++	+
W.P.M. - M ^b	+	+	-
A.C.M. - M ^c	+	+	-

- Symbol : - absence, + poor, ++ fair
- Culture density : 1.0×10^5 protoplasts / ml
- Culture conditions : $28 \pm 1^\circ\text{C}$, darkness
- a. M.S. (Murashige and Skoog, 1962) salts, vitamins and organic acids, 500 mg/l glutamine, 100 mg/l casamino acid, 1 mg/l ascorbic acid, 1 mg/l calcium D-pantothenate, 2.0 mg/l NAA, 0.5 mg/l BAP, 0.5 M mannitol, 0.1 M sucrose
- b. W.P.M. (Lloyd and McCown, 1981) salts, vitamins and organic acids, 500 mg/l glutamine, 100 mg/l casamino acid, 1 mg/l ascorbic acid, 1 mg/l calcium D-pantothenate, 2.0 mg/l NAA, 0.5 mg/l BAP, 0.2 mg/l 2,4-D, 0.5 M mannitol, 0.1 M sucrose
- c. A.C.M. (Lloyd and McCown, 1981) salts, vitamins and organic acids, 500 mg/l glutamine, 100 mg/l casamino acid, 1 mg/l ascorbic acid, 1 mg/l calcium D-pantothenate, 0.5 mg/l NAA, 0.5 mg/l BAP, 0.2 mg/l 2,4-D, 0.5 M mannitol, 0.1 M sucrose

세포벽이 형성되면 spherical 형의 원형질체가 oval 형으로 바뀌는데, 세포벽의 재합성이 불완전하면 budding (fig. 2-e)이 생겨 불규칙형의 원형

질체가 형성되는데, 그 이유로서는 새로운 세포벽합성에 pectin이 합성되지 못하거나¹⁷⁾ 새로이 합성된 cell wall의 어느부위가 약해진 결과이다.¹³⁾

Populus 원형질체 배양시 나타나는 기이한 형태의 원형질체가 관찰되는데, 이것은 mega protoplast라 불리는 것으로 (fig. 2-f) 정상적 크기의 원형질체에 비해 지름은 2-5배, 전체 부피는 1:8에서 1:125, 발생빈도는 1-2%, normal protoplast보다 더욱 엷록체가 밀집하게 뭉쳐진 것으로, 그 발생기원은 확실치는 않으나 원형질체분리, 배양과정에서 원형질체끼리의 융합이된 결과로 보이며, 노쇠한 잎에서 보다는 어린잎에서 주로 발생하거나, 초봄의 어린잎에서도 생겨나는데, 그것은 rapid post-winter photosynthetic activity의 결과로 추측되며, mega protoplast는 normal protoplast와 같이 budding, cell division을 하는 것으로 보아 생존력이 있는 거대세포로 여겨진다.^{2,3,4)} Table 13은 수정 M. S. 배지를 기본으로 하고 NAA, IAA, 2.4-D 및 BAP 등 각기 다른 4가지 hormone의 첨가시, 세포분열빈도와 생존율, 그리고 microcolony 형성유무를 조사한 결과로서, 4가지 처리구에서 거의 비슷한 세포분열빈도를 나타냈으며, 그중에서 NAA, IAA, 2.4-D, BAP가 각각 2.0, 1.0, 0.2, 0.5 mg/l 처리구에서 0.09%로 가장 낮았으며, 2.0, 0.5, 0.1, 0.5 mg/l NAA, IAA, 2.4-D, BAP 구에서 77%의 최고생존율을 나타냈으나, 0.2 mg/l 2.4-D 첨가구인 II, IV 처리구에서만 배양 7일후에 microcolony (fig. 2-c, d)가 형성되어, 2.4-D가 세포분열 촉진에 유효함을 시사하고 있다. 그러나 Maria et al.²⁹⁾의 결과치와 비교하면 대단히 낮은 값을 보여주었다. 이것은 *Populus* 원형질체 배양에 필요한 적정 medium, hormone 농도, 배양방법에 따라 그 값이 달라질 수 있으므로, 이에 대한 많은 상호비교가 필요하다. Table 14는 각각의 수정 M. S., B5, G.D. 배지에 대한 원형질체 배양 7일후 첫 budding, 첫 세포분열이 일어나는데 소요되는

시간, 그리고 각 배지마다 배양하기전 heat shock를 가한것과, 그렇지 않은 control의 세포분열빈도와 그에 따른 생존율을 나타내었는데, heat shock는 배양하기전 45°C에서 5분간, 곧 즉시 0°C에서 10초간 처리한 후 배양한것으로, 이 처리로 mitotic division을 촉진하고, 더욱더 많은 compact colony 형성을 유도한다고 보고하고 있으나³⁹⁾, 본 실험에서는 control의 M.S. - 2M 배지에서 0.69%로 세포분열이 가장 높게 나타났으

Table 13. The effect of different hormone treatments cell division and viability of *Populus alba* × *P. glandulosa* mesophyll protoplasts after 7 days in culture

	Hormone (mg/ℓ)				Division frequency (%)	Viability (%)	Microcolony formation
	NAA	IAA	2.4-D	BAP			
						7 days	
I.	2.0	0.5	0.1	0.5	0.11 ± 0.02	77.1 ± 6.0	—
II.	1.0	0.5	0.2	0.5	0.10 ± 0.02	37.5 ± 3.0	+
III.	1.0	1.0	0.1	0.5	0.11 ± 0.03	53.6 ± 8.5	—
IV.	2.0	1.0	0.2	0.2	0.09 ± 0.01	65.9 ± 6.2	+

- Symbol : — absence, + presence
- Culture density : 1.0×10^5 protoplasts / ml
- Culture conditions : $28 \pm 1^\circ\text{C}$, darkness
- Cells per colony : More than 6 cells
- Culture medium : M.S. salts, organic acids and vitamins,
100 mg/ℓ casamino acid, 1 mg/ℓ ascorbic acid,
1 mg/ℓ calcium D-pantothenate, 0.5M mannitol,
0.1 M sucrose

Table 14. The effect of media and heat shock treatments on first budding, first cell division and viability of *Populus alba* × *P. glandulosa* mesophyll protoplasts after 7 days in culture

Medium	First budding		First cell division		Division frequency (%)		Viability (%)	
	days				7 days			
	Control	Heat shock ^d	Control	Heat shock	Control	Heat shock	Control	Heat shock
M.S. — 2M ^a	3	3	3	3	0.69 ± 0.03	0.35 ± 0.03	47 ± 2.7	40 ± 1.0
B5 — M ^b	3	3	3	5	0.54 ± 0.10	0.28 ± 0.24	43 ± 5.0	32 ± 5.2
G.D. — M ^c	3	3	3	5	0.12 ± 0.09	0.18 ± 0.02	39 ± 0.4	33 ± 1.9

- Culture density : 1.0×10^5 protoplasts / ml
- Culture conditions : $28 \pm 1^\circ\text{C}$, darkness
- a. M.S. (Murashing and Skoog, 1962) salts, vitamins and organic acids, 100 mg/l casamino acid, 1 mg/l ascorbic acid, 1 mg/l calcium D-pantothenate, 2.0 mg/l NAA, 0.5 mg/l BAP, 0.2 mg/l 2,4-D, 0.45M mannitol, 0.1M sucrose, 18 g/l glucose
- b. B5 (Gamborg *et al.*, 1968) salts, M.S. vitamins and organic acids, 100 mg/l casamino acid, 1 mg/l ascorbic acid, 1 mg/l calcium D-pantothenate, 2.0 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l BAP, 0.45M mannitol, 0.1M sucrose, 18 g/l glucose
- c. G.D. (Gresshoff and Doy, 1972) salts, vitamins and organic acids, 100 mg/l casamino acid, 1 mg/l ascorbic acid, 1 mg/l calcium D-pantothenate, 1.0 mg/l NAA, 0.5 mg/l BAP, 1.0 mg/l IAA, 0.2 mg/l 2,4-D, 0.45M mannitol, 0.1M sucrose, 18 g/l glucose
- d. Protoplast suspensions placed for 5 min in a water bath at 45°C , then placed in ice for 10 sec.

며, heat shock 를 가하였을시 0.35 %로 control 보다는 낮은 값을 나타내 heat shock 효력은 별로 없었다. 첫 budding은 공히 각 배지에서 배양 3 일후에 나타났으며, 첫 세포분열은 M. S. -2M의 control, heat shock 처리 구에서 3일내에 나타나 M. S. -2M 배지가 세포분열에 가장 효과적인 배지로 보이며, 그 다음으로 0.54 %, 0.12 %를 나타낸 B5-M, G. D. -M 배지순으로 나타났으며, heat shock 처리시에도 M. S. -2M > B5-M > G. D. -M 순이었다.

원형질체 생존율에서는 47 %인 M. S. -2M이 가장 높았고, 다음으로 B5-M > G. D. -M 순이었고, heat shock 처리 시에는 M. S. -2M > G. D. -M > B5-M 순으로 M. S. -2M 배지가 가장 높은 생존율을 나타냈다.

본 실험에서의 세포분열빈도는 1% 이하로서 매우 낮은 값을 나타내는데, 이것은 배양배지의 nutrient, phytohormone 등 아직도 *Populus* 원형질체 배양에 대한 확실한 자료가 확립되어 있지 않기 때문이다.

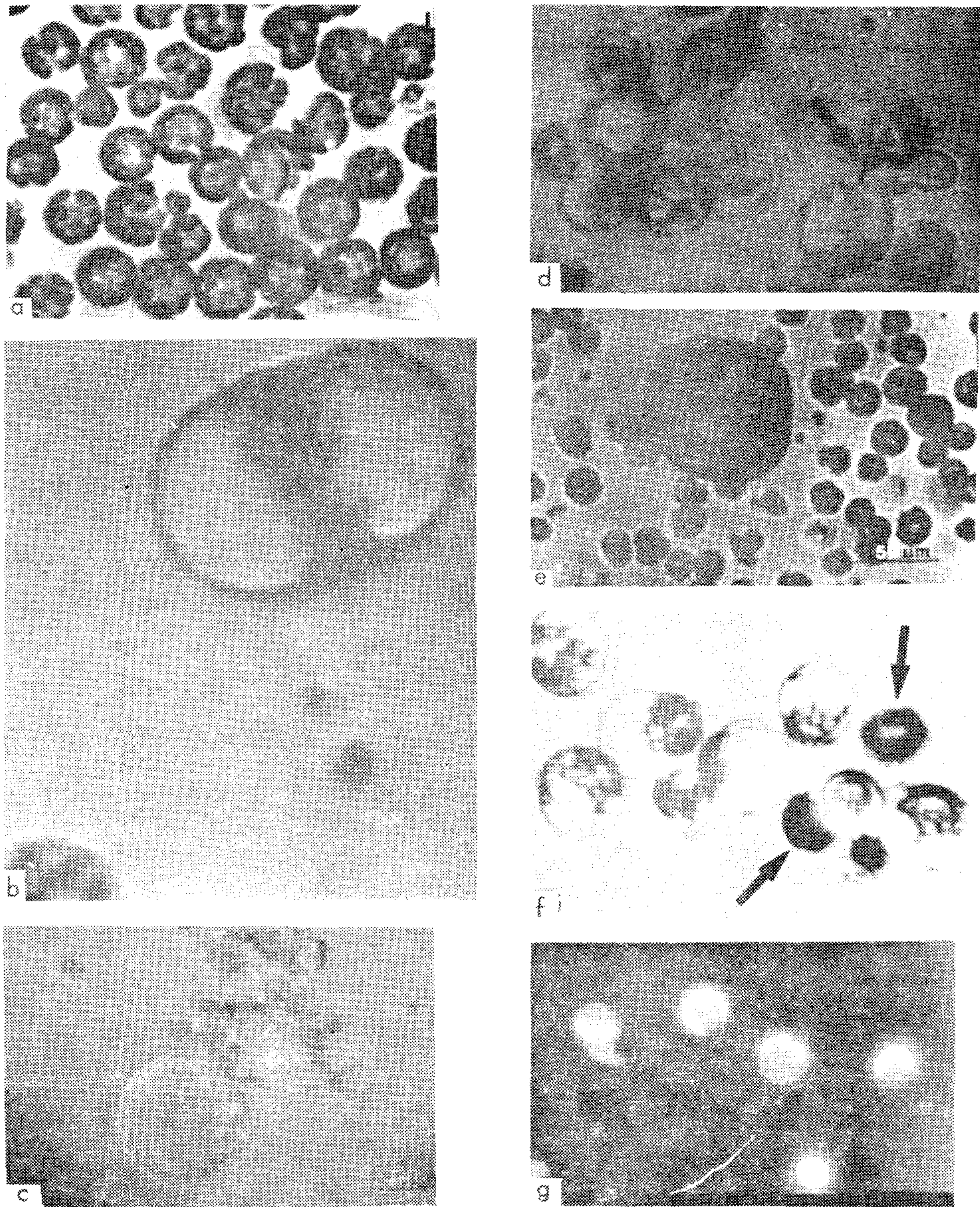


Fig. 2. Cell division and microcolony formation of mesophyll protoplasts of *Populus alba* × *P. glandulosa*. a) ; Freshly isolated protoplasts (×100). b) ; Cell wall regeneration and first cell division after 7 days of culture. c) ; Cell division and microcolony formation (× 100). d) ; Incomplete cell wall regeneration resulting in budding (arrow) (× 200). e) ; Mega (arrow) and normal protoplasts (×100). f) ; Viable protoplasts (arrow) excluding 0.25% Evan's blue (×200). g) ; Viable protoplasts (arrow) exhibit strong fluorescence when stained with fluorescein isothiocyanate (×200).

第4章 摘 要

第1節 花芽分化 및 稔性向上

Populus alba × *P. glandulosa*의 “in vitro”의 수정을 향상을 위하여 미숙배의 발육에 미치는 plant hormones 과 photoperiods의 영향을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 12시간 photoperiod 하에서는 NAA (3.0 ppm), BAP (0.06 ppm) 그리고 kinetin (3.0 ppm)은 고농도 첨가구에서 발육이 좋았고, G. D. 보다는 M. S. 배지에서 생육이 좋다.

2. 16시간 photoperiod 하에서의 auxin류 첨가는 고농도 첨가에서 발육이 좋으나, cytokinin류 첨가는 도리어 저농도에서 발육이 좋은 경향이 고, 배지는 12시간 처리에서와 같이 M. S. 배지에서 생육이 좋다.

3. 20시간 photoperiod 하에서는 NAA (0.5 ppm)와 BAP (0.01 ppm)는 저농도에서, 그리고 IBA (0.6 ppm)와 kinetin (3.0 ppm) 첨가에서는 고농도에서 발육이 좋다. 그리고 어느 hormone 첨가에서나, M. S. 배지가 G. D. 배지에서보다 발육이 좋았다.

4. 24시간 25℃ 처리하에서는 IAA (1.0 ppm) + BAP (1.0 ppm) 혼합구가 다른 혼합 hormone 구에서 보다 ovary의 생육이 가장 좋았다.

第2節 原形質體 單離 및 培養

Populus alba × *P. glandulosa* 엽육조직으로 부터의 원형질체분리에 미치는 요인을 규명하고, 분리된 원형질체 배양시 세포분열, microcolony 형성에 있어 최적 배양배지와 식물 생장조절물질 등을 결정코자 이 실험을 수행

하였던 바 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1. 원형질체 분리시 최적 효소농도는 cellulase 2.0%, macerozyme 1.0%, hemicellulase 1.2%이며 분리시간은 4시간이었다.

2. 효소용액내 가장 적합한 mannitol 농도는 0.6 M 이었다.

3. Preplasmolysis 는 4°C, 암상태에서 24시간 동안 저온처리 한것이 가장 적합하였다.

4. 효소용액내 0.6 M mannitol, 0.2 mg/ℓ 2,4-D, 0.1 mg/ℓ BAP, 1 M.S. inorganic salts 를 첨가한 것이 건전원형질체 수량이 가장 많았다.

5. 1.0×10^5 protoplasts/ml 밀도로 원형질체 배양 7일후의 budding, 세포분열과 microcolony 형성은 수정한 M.S. 배지에 500 mg/ℓ glutamine, 100 mg/ℓ casamino acid, 1 mg/ℓ ascorbic acid, 1 mg/ℓ calcium D-pantothenate, 2.0 mg/ℓ NAA, 0.5 mg/ℓ BAP, 0.5 M mannitol, 0.1M sucrose를 첨가한것이 가장 촉진되었다.

6. 원형질체 배양 7일후의 세포분열과 microcolony 형성에 있어 유효한 식물 생장조절물질의 조합은 수정한 M.S. 배지에 2.0 mg/ℓ NAA, 1.0 mg/ℓ IAA, 0.2 mg/ℓ 2,4-D, 0.5 mg/ℓ BAP 이었다.

7. 원형질체 배양 7일후의 가장 높은 세포분열빈도와 생존율을 나타낸 배지는 수정한 M.S. 배지에 100 mg/ℓ casamino acid, 1 mg/ℓ ascorbic acid, 1 mg/ℓ calcium D-pantothenate, 2.0 mg/ℓ NAA, 0.5 mg/ℓ BAP, 0.2 mg/ℓ 2,4-D, 0.45 M mannitol, 0.1 M sucrose, 18 g/ℓ glucose를 첨가한 것이었다.

Control <non-heat shock> 과 heat shock 처리효과를 비교해 볼때 세포분열과 생존율에 더욱 효과적인 처리는 control 이 있다.

引用文献

1. Ahuja, M.R. 1983. Somatic cell differentiation and rapid clonal propagation of aspen. *Silvae Genetica*, 32:131-135.
2. Ahuja, M.R. 1983. Isolation and culture of mega and normal protoplasts in aspen. *Silvae Genetica*, 32:225-227.
3. Ahuja, M.R. 1984. Protoplast research in woody Plants. *Silvae Genetica*, 33:32-36.
4. Ahuja, M.R. 1984. Isolation and culture of mesophyll protoplasts from mature beech trees. *Silvae Genetica*, 33:37-39.
5. Alan, C.C. and B. Martin. 1976. Environmental induced change in the cell walls of tomato leaves in relation to cell and protoplast release. *Physiol. Plant.*, 37:239.
6. Bajaj, Y.P.S., S.K.Mahajan and K.S.Labana. 1986. Interspecific hybridization of *Brassica napus* and *B.Juncea* through ovary, ovule and embryo culture. *Euphytica*, 35:103-109.
7. Chun, Y.W. 1985. Isolation and culture of *in vitro* cultured *Populus alba* × *P. grandidentata* protoplasts. *J. Kor. For. Soc.*, 71:45-49.
8. Daniel, C.W. 1985. Factors affecting isolation of protoplasts from leaves of grape (*Vitis vinifera*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 4:95-100.
9. Dorion, N., B. Godin and C. Bigot. 1983. Isolation and culture of leaf protoplasts from *Ulmus* sp. preliminary report. in Proc. 6th Int. Protoplast Symposium.

10. Evans, D.A. and J.E. Bravo. 1983. Protoplast isolation and culture. Handbook of Plant Cell Culture, Collier Macmillan Publishers, London, 1:124-176.
11. Fan, D.F. and G.A. MacLachlan. 1977. Control of cellulase activity by indoleacetic acid. Can. J. Bot., 44:1025-1034.
12. Faye, M. and A. David. 1983. Isolation and culture of gymnosperm root protoplasts (*Pinus pinaster*). Physiol. Plant., 59:359-362.
13. Fowke, L.C. and O.L. Gamborg. 1980. Applications of protoplasts to the study of plant cells. Int. Rev. Cyto., 68:9-51.
14. Gresshoff, P.M. and C.H. Doy. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). Planta (Berl.), 107:161-170.
15. Hakman, I.C. and S. von Arnold. 1983. Isolation and growth of protoplasts from cell suspensions of *Pinus contorta* Dougl. ex Loud. Plant Cell Reports, 2:92-94.
16. Hommatt, N. and M.R. Davey. 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured zygotic embryos of soybean (*Glycine max* L. Merr.). J. Plant Physiol., 128:219 - 226.
17. Hanke, D.E. and D.H. Northcote. 1974. Cell wall formation by soybean callus protoplasts. J. Cell Sci., 14:29-50.
18. 原田 宏 . 1966. *Cichorium intybus* 花芽組織培養における 日長の花芽形成に およぼす影響. 植物會誌, 79:119 - 123.
19. Hyun, J.O., J.H. Kim and S.S. Chang. 1985. Studies on factors affecting isolation and fusion of protoplast of *Quercus*

- species. J. Kor. For. Soc., 71:66-73.
20. 板鼻直榮. 1988. 카라마ツ의 芽培養에 於ける 사이트카이닌의 種類와 濃度의 影響. 林木의 育種, 特號: 30 - 33.
21. Isikawa, H. 1986. *Cryptomeria* (*Cryptomeria japonica* D. Don.). Biotechnology in Agri, and For. Springer - Verlag Berlin Heidelberg, 1:316 - 321.
22. Iversen, T.H. 1969. Elimination of geotropic responsiveness in roots of cress (*Lepidium sativum*) by removal of statolith starch. Plant physiol., 22:1251-1262.
23. Julie, A.R. and B.H. McCown. 1986. Techniques for an enhanced release of leaf protoplasts in *Populus*. Plant Cell Reports, 5:284-287.
24. 김정석. 1980. 킨드로 × 水原야마나라시 (*Populus alba* × *P. glandulosa* Uyeki)의 利用および 其의 生長에 於て. 綠化工技術, 7(1): 16 - 21.
25. 김정석, 최주수, 윤기식. 1987. "in vitro"에 의한 2n과 4n의 × *Populus albaglandulosa*의 약 배양에 관한 연구. I. Anther의 成숙도에 따른 callus 형성. 한육지, 19(1): 1 - 7.
26. 김재현, 문홍규, 박재인. 1986. 약배양에 의한 황철나무 (*Populus maximowiczii*)의 반수체 유도. 임육연보, 22:116 - 121.
27. Koyana, M., Y. Hosoi, and A. Saito. 1988. Isolation, culture and division of protoplasts from konara (*Quercus serrata*) callus cultures. J. Jpn. For. Soc., 70(5):231-233.
28. Lee. K.J., J.S. Lee., Y. Youn and S.K. Lee. 1985. Isolation and culture of protoplasts from embryonic cotyledons of *Pinus densiflora* S. et Z. J. Kor. For. Soc., 71:9-13.

29. Maria, C.B. and J. Segura. 1987. Isolation, culture and plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Digitalis obscura*. *Physiol. Plant.*, 69:680-686.
30. 丸橋 亘. 1984. 試験管内 受精法. 植物組織培養, 1(2): 62 - 63.
31. Mehria-Palta, A., R.H. Smeltzer and R.L.Mott. 1987. Hormonal control of induced organogenesis : Experiments with excised plants of loblolly pine. *Tappi*, 61:37 - 40.
32. Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15:473-496.
33. Niimi, Y. 1976. Effect of stylar pollination on "in vitro" seed setting of *Petunia hybrida*. *J. Jpn Soc. Hort. Sci.*, 45(2): 168 - 172
34. Park, Y.G., and K.H. Han. 1986. Isolation and culture of mesophyll protoplasts from "in vitro" cultured *Populus alba* × *P. glandulosa*. *J. Kor. For. Soc.*, 73:33-42.
35. 박용구, 손성호. 1986. 이태리 포푸라 1-214 엽육조직에서 원형질체 분리에 미치는 몇가지 요인. *한림지*, 74:29-36.
36. 박용구, 손성호. 1988. 현사시나무 기내배양 엽육조직에서 분리된 원형질체 배양 및 식물체 재분화. *한림지*, 77(2):208 - 215.
37. Redenbaugh, K., D.F. Karnosky and R.D. Westfall. 1981. Protoplast isolation, fusion in three *Ulmus* species. *Can. J. Bot.*, 59:1436-1443.
38. Rona, J.P. and C. Grignon. 1972. Obtention de protoplastes a partir de suspensions de cellules d'*Acer pseudoplatanus*. *C.R. Acad. Sci. D.*, 274:2976-2979.

39. Ruslan, A., E.C. Cocking and J.A. Thompson. 1986.
Efficient plant regeneration from rice protoplasts through somatic embryogenesis. *Bio. Technology*, 4:1087-1090.
40. 佐藤 亨. 1978. スギ, クロマツ の胚培養に用いる培地の探索. *日林誌*, 60(3):81-86.
41. Saito, A. 1980. Fusion of protoplasts isolated from somatic cell of tree species. *Bull. For. Prod. Res. Inst.*, 307:7-12.
42. Saito, A., H. Yoshihisa., K. Isii and T. Sato. 1987.
Callus formation from protoplasts of mesophyll cells of *Populus* plantlets. *J. Jpn. For. Soc.*, 69:472 - 477.
43. Shepard, J.F. and R.E. Totten. 1977. Mesophyll cell protoplasts of potato. *Plant Physiol.*, 60:313-316.
44. 田淵 和夫, 古越隆信. 1979. GA₄₊₇ によるヒノキ 精英樹 クロウンの着花促進. 90回 日林論, 223 - 224.
45. Takeshita, M., M. Kato and S. Tokumasu. 1980. Application of ovule culture to the production of intergeneric or interspecific hybrids in *Brassica* and *Raphanus*. *Jap. J. Genet.*, 35:373-387.
46. Tatemichi, R., K. Ito and S. Ito. 1986. Basic studies on protoplast fusion in trees. *J. Jap. For. Soc.*, Middle Branch, 34:61-63.
47. Teasdale, R.D. and E. Rugin. 1983. Preparation of viable protoplasts from suspension cultured loblolly pine cells and subsequent regeneration to callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2:253-261.

48. Vardi, A., P. Spiegel-Roy and E. Galum. 1982. Protoplast isolation, plant regeneration and somatic hybridization in different *Citrus* species and *Microcitrus*. 6th. Int. Protoplast and Symposium.
49. Wallin, A., K. Glimelius and T. Eriksson. 1977. Pretreatment of cell suspensions as a method to increase the protoplast yield of *Haplopappus gracilus*. *Physiol. Plant.*, 40:307-311.
50. Wang, C.C., Z.C. Chu and C.S. Sun. 1975. The induction of *Populus* pollen-plants. *Acta Botanica Sinica*, 17:56 – 59.
51. Widholm, J.M. 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol.*, 47:189 – 194.
52. Youn, Y., J.S. Lee and S.K. Lee. 1985. Isolation and culture of protoplasts from suspension - cultured cells of *Populus alba* × *P. glandulosa* *Fl. Res. Rep. Inst. For. Gen. Kor.*, 21:109-113.
53. Zenkteler, M., G.Maheswaran and E.G. Williams. 1987. “ In vitro ” placental pollination in *Brassica campestris* and *B. napus*. *J. Plant Physiol.*, 128:245 – 250.
54. Zhu, X.Y., R.L. Wang and Y. Liang. 1980. Induction of poplar pollen plantlets. *Sci. Silvae Sinicae*, 16(3): 190 – 197.