

현사시나무 (*Populus alba* × *P. glandulosa*) 에
대한 배수체 육성연구

(제 2차 연도)

Induction of polyploids of *Populus alba* × *P. glandulosa*
(Second Year Report)

연구기관

경상대학교

과학기술처

4.1
V.2

提 出 文

科學技術處長官 貫下

本 報告書를 “ 현사시나무 (*Populus alba* × *P. glandulosa*)에 對한
倍數體 育成研究 ” 課題의 第2次年度의 報告書로 提出합니다.

1990. 5. 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 : 김준철 (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 : 정재민 (慶尙大學校)

김들이 (上 同)

인선숙 (上 同)

崔明淑 (江原大學校)

崔承一 (上 同)

要 約 文

I. 題 目

현사시나무 (*Populus alba* × *P. glandulosa*)에 대한 배양체의 육성 연구
(제 2 차년도)

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 colchitetruploid인 *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 2 차년도 성적이므로 구체적인 최종결과는 제 3 차년도에 보고할것임.

Summary

The optimum conditions for isolation and fusion of protoplast, flower bud induction, and test-tube fertilization in Populus alba x P. glandulosa are as follow.

I. Isolation and fusion of protoplast.

1. Reaction of stainer on survival and cell wall formation of protoplast.

a. Exclusion staining with 0.1% methyl blue suggested that protoplast viability could be show when irradiating with the tungsten bulb without using barrier filter.

b. Exclusion staining with 2.0% Evans blue suggest that protoplast viability could be shown more effectively when irradiating with the tungsten bulb without using barrier filter.

c. 0.01 - 0.001% (pH 3.7) neutral red staining with tungsten bulb irradiation shows that protoplast viability could be shown only using barrier filter.

d. Staining with FDA, Fluorescent brightener, FITC and RITC suggested that protoplast viability could be shown when irradiating with mercury burner without using barrier filter.

With this system, it was possible to distinguish the formation of cell wall of fusion protoplast and chloroplast.

2. Isolation method of 2n and 4n protoplast.

a. Using the three isolation methods of protoplast was more efficient for 2n than 4n protoplast of mesophyll.

Isolation method III showed most efficient for both 2n and 4n protoplast isolation.

- b. The isolation method II showed the highest protoplast yield efficiency for both 2n and 4n.
- c. Among the isolation methods examined, the largest 4n protoplast obtained from explant and "in vitro" culture was method II. 12% increase in leaf size than those from "in vitro" culture.
- d. The isolation method I showed the highest protoplast yield from petiole,
 Protoplast yield from petiole of explant were lower than those from mesophyll and protoplast yield of explant and "in vitro" culture of 2n were higher than those from 4n.
- e. Protoplast yield by isolation method I were highest for both 2n and 4n petioles.

3. Factors influencing the differentiation and culture media in 2n and 4n protoplast.

- a. 2n protoplast showed higher differentiation yields than 4n and concentration of the optimum plant growth regulators on culture medium were 0.5mg/l BAP, 2.0mg/l 2,4-D and 2.0mg/l NAA for 2n and 4n mesophyll.
- b. W.P.M. medium was better for the callus formation of protoplast than M.S. medium.

4. Test of effectiveness for nurse culture.

The nurse culture in protoplast of 2n mesophyll of Populus alba x P. glandulosa and 4n callus of Hibiscus syriacus was best for the callus formation. However, nurse culture in protoplast of 2n mesophyll of P. alba x P. glandulosa and 2n callus of several plants was poorer than 4n callus.

5. Protoplast fusion for 2n mesophyll and 4n callus.

a. PEG (M.W. 1,540, 4,000 and 6,000) were tried to fusion of 2n mesophyll and 4n callus. 15% PEG1,540 at 35°C showed the best fusion rate and the larger the M.W. of PEG was lower efficiency of fusion.

b. The protoplast culture which was fused with 15% PEG1,540 showed the formation of numerous colony, cluster and callus.

The protoplast culture with 66% PEG6,000 represented the best efficiency for differentiation.

c. pH 10.5 / Ca^{2+} / 35°C / glycine - NaOH 100 mM buffer showed the best fusion rate.

d. The protoplast culture which was fused with Ca^{2+} / 35°C / glycine - NaOH 100 mM buffer showed the formation of numerous colony, cluster and callus.

e. Electric field were tried to fuse 2n mesophyll and 4n callus. 1.25 kv/cm field strength of voltage, 500 voltage of pulse and 50 μ s pulse length showed the best fusion rate between two and three protoplasts. Fusion between 4n callus + 2n mesophyll was best fusion rate on 1.00 kv/cm field strength of voltage, 400 voltage of pulse and 100 μ s pulse length.

f. The lower concentration of dextran was better for protoplast fusion. 8% NaCl - 0.3% NaOH solution were most efficient for the protoplast fusion with 500,000 dextran.

g. Callus formation was highest when protoplast fusion was conducted by 10% dextran and 8% NaCl - 0.3% NaOH solution.

II. Flower bud induction and fertility improvement.

Stimulation of flower bud differentiation was tested by using the three stimulants such as PEG, B9 and BAP.

1. All of the stimulants tested showed poor stem development and growth, compared with no stimulant. But 3% sucrose, 16 hr periodic light irradiation, and PEG treatments were good for the growth.
2. Development of multiple shoot caused by flower bud inhibition were observed in following conditions : on 16 hrs periodic light irradiation, with 3% sucrose, 5% PEG and 1,000 ppm B9; on 10 hr periodic light irradiation with 9% sucrose, and 10 ppm BAP.
3. When the medium of 10 hr periodic light irradiation with 3% sucrose and 5% PEG showed flower bud differentiation on 6 weeks after culture.

III. Test - tube fertilization.

1. IAA analysis in carpel with HPLC.

Depend on the ages of mesophyll (2n and 4n) and carpel, the IAA content was varied. In general, adult leaves mesophyll showed higher IAA content than juvenile leaves. IAA content of carpels showed 68% higher than that of juvenile leaves, and 28% lower than that of adult leaves. IAA content of 4n mesophyll tissue showed 103% higher than that of 2n mesophyll tissue.

2. Embryo formation and development of " in vitro " cultured Populus alba x P. glandulosa were possible by the test - tube pollination.

Contents

Summary in English	i
I. Introduction	3
II. Materials and Methods	3
1) Protoplast isolation and fusion	10
2) Flower bud induction and fertility improvement	10
3) Test - tube fertilization	10
III. Results and Discussion	12
1) Protoplast isolation and fusion	12
2) Flower bud induction and fertility improvement	38
3) Test - tube fertilization	43
IV. Summary in Korean	47
1) Protoplast isolation and fusion	47
2) Flower bud induction and fertility improvement	50
3) Test - tube fertilization	50
Literature cited	52

目 次

英文要約	i
第1章 序 論	3
第2章 材料 및 方法	3
第1節 原形質體單離 및 融合	10
第2節 花芽分化 및 稔性向上	10
第3節 器內受精	10
第3章 結果 및 考察	12
第1節 原形質體單離 및 融合	12
第2節 花芽分化 및 稔性向上	38
第3節 器內受精	43
第4章 摘 要	47
第1節 原形質體單離 및 融合	47
第2節 花芽分化 및 稔性向上	50
第3節 器內受精	50
引用文獻	52

第1章 序 論

본 연구는 *Populus alba* × *P. glandulosa*에 대한 배수체육성 연구에 관한 것으로, 제 1 보에 이은 제 2 보로서 몇 가지 새사실을 얻었기에 보고하는 바이다.

第2章 材料 및 方法

第1節 原形質體單離 및 融合

1. 원형질체 생존과 세포벽 형성조사

단리된 원형질체와 배양중의 원형질체의 생존여부와 cell wall의 용해정도 그리고 융합체의 세포벽 형성등을 조사하기 위한 염료는 table 1에 의거 조제하였으며, 사용한 현미경은 reflected light fluorescence attachment trinocular microscope(Olympus)이고, barrier filter는 0590(red)만을 사용하고, 광원은 tungsten bulb와 자외선 발생을 위한 mercury burner 등을 각각 사용하여 관찰하였고, film은 ASA 400으로 촬영하였다.

Table 1. Concentions and conditions of the stainer used

Stainer	Conditions and concentrations
Methyl blue	Solution of 0.1 % and 2.0 %
Methylene blue	1) Alcoholic - aqueous methylene blue 2) Goodpastre's acid polychrome - methylene blue
Evans blue	Solution of 0.2 % and 2.0 % in 0.6 M mannitol
Neutral red	Solution of 0.001% and 0.01% with pH 3.7 and pH6.5
FDA (fluorescein diacetate)	Solution of 0.02% and 0.1% in 13 M C.P.W.
Fluorescent brightener	Solution of 0.1 % in 0.6 M mannitol
FITC (fluorescein isothiocyanate)	Solution of 5 % in 9 M C.P.W.
RITC (rhodamine - B - isothiocyanate)	Solution of 5 % in 9 M C.P.W.

2. 2n과 4n 원형질체 단리법구명

Fusion과 fusion 체배양에 사용할 원형질체에 대한 preplasmolysis는 원형질체회수량, 세포분열, 분화 그리고 탈분화에 큰영향을 미치므로 isolation, washing 및 floating solution의 보다더 유효한 방법을 얻기 위하여 table 2와 같이 세가지 종류의 방법에 의거 preplasmolysis test를 하였다. 즉, method I은 *populus euramericana*에¹⁵⁾ 대한 Park의 연구결과로 얻은 방법을 일부 변경한 방법에 의하였고, method II는 *Populus sieboldii*에 대한 Saito²⁰⁾의 연구의 일부를 변경한 것에 의하였고, 그리고 method III은 *Ulmus* 종에 대한 Redenbaugh, et al.의¹⁹⁾연구결과의 일부를 변경한 방법에 의하였다.

Table 2. Effect of three types of enzyme combinations on protoplast isolation and yield in 2n and 4n *P. alba* × *P. glandulosa*

Compositions of enzyme	Method I	Method II	Method III
Cellulase "Onozuka R-10"	2.0 (%)	1.0 (%)	1.0 (%)
Driselase	2.0	2.0	0.5
Hemicellulase "Sigma"	1.2	1.3	
Rhozyme			0.5
Macerozyme "R-10"	0.8	0.3	
Pectolyase "Y-23"	0.05	0.05	
Meiselase		0.45	
Pectinases "Sigma"			0.5
Potassium dextran sulfate	1.0 (%)	0.001 (%)	
Potassium citrate	166	5mM	
DTT	30	2mM	
MES buffer	3		
BSA	100		
Calcium chloride, dihydrate	18		
Potassium dihydrogen phosphate	17		
Magnesium sulfate	2.5		
Calcium nitrate	3		
Mannitol	10.93	0.6 M	6.38
Sorbitol			6.38
H ₃ BO ₃		0.36mM	
Distilled water	100	100	100
pH	5.6	5.6	5.5

3. 2n과 4n 원형질체의 분화요인조사

2n과 4n의 엽육조직 원형질체 분화촉진법연구를 위한 배양은 M. S. (-NH₄NO₃) 액체배지에 phytohormone을 첨가한 시험이 다음의 조건하에서 이루어졌다. 즉, "in vitro"에서 자란 2n과 4n 엽육조직 0.4g에 대한 원형질 단리 효소용액은 method II에 의하였고, 세정 및 부등용액은 Park¹⁶⁾의 방법에 의하였다. 그리고, 원형질 밀도는 $2 \times 10^4 \sim 10^5$ 로 조절하여 배양 5주까지 매주마다 배양액 2 ml에 대하여 0.2 ml 씩 제거하고 0.2 ml의 삼투압 조절제가 들어있지 않는 새 배지를 넣어 키우면서 매주마다 세포분열, colony 및 callus 형성을 조사하였고, 기타 단리, 세정, 배양조건은 method II에 의하였다.

4. 배지에 따른 2n과 4n 원형질체 분화구명

배지종류에 따른 2n과 4n 엽육조직원형질체 분화율의 조사는 method II의 방법에 의거, 단리, 세정시킨 것을 사용하여 W. P. M. 과 비교하였다.

5. 공존배양의 효과시험

공존배양에 사용한 원형질체는 method II에 의한 엽육조직의 단리,세정의 것으로써 1 : 1의 비로 혼합한 것을 밀도 $2 \times 10^4 \sim 10^5$ 로 조절하여 사용하였다.

6. 2n과 4n 원형질체 융합구명

원형질체 융합은 4가지 방법을 시도하였다. 즉,

가. PEG법은 PEG 분자량 1,540, 4,000 및 6,000에 대하여 15%와

66%의 PEG 용액 (table 3)을 만들어 자기 " in vitro "의 2n 엽육과 4n callus 원형질체를 단리한것을 융합시켰다. 그 방법은 1 to의 방법을 일부 변경한 것으로 9cm plastic petridish에 다섯방울의 PEG 용액을 놓고, 그 위에 밀도 $2 \times 10^4 \sim 10^6$ 의 두종의 혼합원형질체 (1 : 9 비) 현탁액 0.2 ml 씩을 떨어 35℃의 온도에서 20분간 정치하여 정착시킨다. 다음 10분간씩 1 ml의 washing solution (table 3)으로 3회 세정하고 난 후 4 ml의 washing solution를 다시 첨가하여, centrifugeing (500 rpm / 3 min.)하여 상등액을 제거하고 washing solution을 가하여 다시 centrifugeing을 2회 반복한다. 그리고, 8 ~ 10 ml의 M. S. (- NH₄NO₃) 배지를 첨가하여 centrifugeing (500 rpm / 3 min.)하는 것을 2회 반복하고 5cm petridish (Corning Co.,) 내에 위의 배지 2 ~ 3 ml로 배양한다. 하루밤을 암상태 (28℃)에 정치후 1000 Lux, 28℃의 연속광하에서 배양하면서 0.5 ml의 새 배지로 매주 교체가한다.

Table 3. PEG and washing solution for fusion

PEG solution	Washing solution
1) HEPES 100 mM buffer	Mannitol : 9.1 g
HEPES ; 2.38 g	CaCl ₂ · 2H ₂ O : 735 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O ; 1.47 g	H ₂ O : 100 ml
H ₂ O ; 100 ml	
pH ; 6.8	
2) PEG solution	
PEG ; 20 g	
HEPES buffer ; 30 ml	

나. 고 pH / Ca^{2+} / 온도 / glycine - NaOH buffer의 방법은 method II에 의거 얻은 원형질체를 centrifuge로 침적시켜 배지를 제거하고 0.5 ml의 새 배지에 현탁하고, 융합유발제인 1.1% (W/V) $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + 9% mannitol (W/V)가 첨가된 glycine - NaOH buffer로 table 20의 각 유발제를 4 ml 가하고, 각 소정온도의 water bath에서 20 min. 정지 융합시키고, centrifugeing (500 rpm / 3 min.) 하여 상등액을 제거하고 C.P.W. 13 M / + 0.74 g / 100 ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가하고 다시 centrifugeing 하여 세정하는데, 2회 반복하고 그 이후는 PEG법에 따랐다.

다. Dextran 500,000의 융합유발제 처리는 method II 방법에서 얻은 원형질체를 썼는데 융합 방법은 table 4의 dextran solution을 plastic petridish에 0.12 ml (4방울) 넣고, 그 위에 0.18 ml (6방울)의 혼합원형질체를 넣고, 다시 dextran 둘레에 0.3 ml 떨어뜨리고, dish를 조용히 흔들어 혼합시키고, 다시 dextran solution을 0.3 ml 첨가하고 흔들어 혼합시켜 25°C에서 20 min. 정지한다. 그리고, NaCl-NaOH solution 1~2방울을 주위로부터 첨가하여 조용히 흔들어 혼합시키고, 25°C, 20~30 min. 정지한다. 그 후, table 4 휘석액을 5 ml 가하여 25°C / 10 min 방치한 후 5°C~10°C의 저온에 20~24시간 방치하고 난 후 상등액은 버리고, 휘석액을 다시 첨가하여 centrifugeing (1000 rpm / 3 min.) 하여 1 ml 정도만 남기고 상등액 제거하고 현탁액을 배양하였으며 이때 사용한 배양배지는 기왕의 성적인 M. S. (- NH_4NO_3) + BAP, 0.5 ppm + 2.4 - D, 2.0 ppm + NAA, 2.0 ppm 첨가배지에서 25°C, 1000 Lux (연속광)에서 배양하였다.

Table 4. Dextran and washing solution for fusion in 2n mesophyll and 4n callus of *Populus alba* × *P. glandulosa*

Dextran solution	Washing solution
15% 500,000 (w.m.) Dextran NaCl 6%	3% mannitol 1% CaCl ₂ · 2H ₂ O pH 5.5

라. Electro fusion법에 사용한 재료의 단리, 세정은 method II 방법에 의한 것을 밀도 조절한 2n mesophyll 1.7 ml와 4n callus 1.7 ml를 혼합하여, 조건 I과, II로 2회씩 융합 처리하였다. 그리고, 융합처리 후는 10분간 정착하고, 원형질체 현탁액을 pipette로 취하여 1회 세정하여 밀도 $5 \times 10^4 / ml$ 로 한것을 배지 M. S. (-NH₄NO₃)에 배양하였다.

Electrofusion system에 사용한 기기는 Shimadzu somatic hybridizer (SSH-1 type)로 chamber ($\phi 87 \times H27 mm$)의 유효용적 1.6 ml, 적극간극 4.0 mm인 기기인데, table 5와 같이 두가지 전기 조건만 [전개강도 (field strength, kv/cm), pulse 전압 (v), 그리고 pulse 폭 (μs)] 달리하여 융합하였다.

Table 5. Two conditions of electric field

Electric	field	Cond. I	Cond. II
FREQ	MHz	1	1
VAC (PRI)	v	40	40
INITIAL TIME	s	80	80
P W	micro s	50	100
VDC	v	500	400
FIELD STRENGTH	kv/cm	1.25	1.00
VAC (SEC)	v	0	0
REPEAT INTERVAL	s	1	1
		3 ~ 5	3 ~ 5

第2節 花芽分化 및 稔性向上

1. 화아 분화 시험

화학적 처리에 의한 화아 분화 시험은 18년생의 성숙목에 대하여, 계절에 따른 영향을 구명하기 위하여, 3월과 7월에 채취하여 실내에서 맹아로 유도한 새줄기를 사용하였다. 새 맹아를 유도하는 것은 포푸라는 줄기 조직내의 잠균과 공생하므로 Ito⁶⁾의 방법에 의한 것으로 “in vitro”에 공할 줄기는 눈이 한두개 부착한 길이 3cm내외의 삽수를 증성세제(10 min.), 소독증류수(3회), tween 80을 한두방울 첨가한 2% NaOCl에 침적(5 min.), 다시 소독증류수(3회)로 행구고 75% ethanol(3 sec.)를 거쳐 소독수로(4회) 다시 행귀서 살균한 것을 M.S.배지에 착상하면서 매 4주마다 자란 새 shoot는 다시 cutting하여 계대배양하였는데, 배양실은 3 Klux, 28℃하의 각 광주기에서 키웠다.

第3節 器內受精

1. HPLC에 의한 자방 내재 IAA 조사

HPLC에 의한 IAA을 추출한 식물체는 노지의 12년생 2n과 4n의 *Populus alba* × *P. glandulosa*인데, 유엽과 성숙엽을 6월 5일 채취 공시하고, 자방은 2n catkin의 것으로 사용하였다. 즉, 시료 20g을 HPLC methanol로 4℃에서 24시간 shaking 하고, 잔액을 2회 centrifugeing (15,000 rpm / 10 min.) 한 것을 evaporator로 건조시킨 것을 dichromomethane과 혼합하여 분획시켰다. 추출된 IAA는 0.01 M phosphate buffer (pH 3)로 이동상을 섞고 chart speed는 5 mm/min.이고, 기록은 Gilson

NI(ODS/C18)의 기기에 의하였다. 분리 분석은 Gilson HPLC(model 303 piston pump. U.V. detector)에, column Zorbax(ODS/C18)을 사용하여 형광검출기(Gilson model, sensitivity, 0.001 AUFS)로 280 nm에서 여기시켜 360 nm의 형광으로 측정하였다.

2. 배 형성과 발달조사

기내수정으로 배양한 배의 발달의 여부를 조사하기 위한 배의 조직은 수작업으로 만든 preparate 로, 수정 2주의 것을 조사하였다.

第3章 結果 및 考察

第1節 原形質體單離 및 融合

1. 원형질체 생존과 세포벽 형성 조사

엽육조직과 callus 원형질체 또는 fusion 체에 대하여 염료반응으로 생존률을 조사한 결과는 table 6 과 같다.

즉, methyl blue 에 대한 엽육조직과 callus 의 원형질체의 반응은 barrier filter 의 사용시 건전한 것은 담황록색이고, 불건전한 원형질은 청자색을 띤다. filter 를 사용하지 않으면 건전한 것은 대황록색에, 붉은색 광택을 하였으며, 이와 같은 현상은 callus 의 원형질에서도 동일하여 생존률 조사에 유효하였다. 농도는 2.0 %보다는 0.1 %가 좋고, light source 는 tungsten bulb 가 좋다. (Fig. 1-a) 이 결과는 *Ulmus* 종에 대한 Redenbaugh *et al.*¹⁸⁾ 의 보고와 일치한다.

Methylene blue 는 table 1 과 같이 두가지 방법의 용액을 사용하였는데 barrier filter 의 사용여부에 관계없이 엽육조직이나 callus 원형질체의 건전한 원형질체는 다같이 녹색자색을 띄고 있어, 생존률은 물론 조직 간에도 식별이 곤란하였다. 아마 Komamine *et al.*¹²⁾ 의 보고는 오보인 것 같다.

Evans blue 염색은 2.0 %, tungsten bulb 의 광원으로 barrier filter 를 사용하지 않은 엽육조직과 callus 원형질체에서 생존률 식별에 가장 좋았는데 건전한 것은 광택있는 백색광이고, 불건전한 것은 청자색을 띄어 Redenbaugh *et al.*¹⁹⁾ 이나, Park and Han¹⁴⁾ 의 결과와 같다. 한편 mercury burner 의 light source 에 의한 것은, 건전한 원형질체는 filter 사용에 따른 광

택의 농도에는 차이는 있으나, 일반적으로 대적색광이나, 불건전한 것은 발광하지 않아서 생존률 조사에 유효하나, tungsten bulb 보다는 좋은 상이 아니다. (Fig. 1-b) Neutral red 에 대한 반응조사는 pH 3.7 과 pH 6.5 로, 0.01 %와 0.001 %에 대하여 관찰하였는데 tungsten bulb 의 광원에는 mesophyll 과 callus protoplast 의 건전한 것은 filter 를 사용하면 protoplasm 은 담적색이고, 불건전한 것은 대 pink 색에 농갈색을 하는데 filter 없이는 건전한 것은 담황갈색 또는 不染 이나, 불건전한 것은 filter 사용시의 불건전한 원형질체의 대색과 같다. 한편 mercury burner 를 광원으로 하고 filter 를 사용하였을 시는 mesophyll 원형질체 세포벽은 건전한 것이나 불건전한 것과 같이 대황색에, 농 pink 색의 발광을 하나, callus 의 원형질체 세포벽은 대황색에, 담 pink 색의 발광을 한다. 그리고 filter 불사용시 엽육조직과 callus 의 건전한 원형질체 세포벽은 대황색에, 담록색의 발광을 하고, 그리고 불건전한 원형질체 세포벽도 같은 대색을 하고 있어, mercury burner 로 인한 생존체 식별이 불가능하였다. 따라서 neutral red 는 pH 3.7 의 0.01 % 또는 0.001 %로 염색하고 tungsten bulb 에 대한 filter 의 사용시와 filter 없는 관찰이 생존률 식별에 양호하다고 할 수 있는데 (Fig. 1-c), Kameya⁷⁾ 는 이와 같은 사실은 *Nicotiana* 종에서 보고하고 있다. 형광물질인 FDA 는 0.1 %와 0.02 %로 염색하였는데, 0.1 %가 염색반응이 좋았다. 즉, mercury burner 로 filter 사용시 엽육조직의 건전한 원형질체의 세포벽은 농적색으로 발광하고, 엽록체는 적색광택을 한다.

그리고 callus 의 세포벽은 대 pink 색의 녹색의 발광을 하나, 불건전한 원형질체는 두 조직의 세포벽에서 모두 다 발광치 않는다. 한편 filter 불사용시 건전한 엽육 원형질체와 callus 의 세포벽은 대백황색에, 담록색의 발광을 하고, 엽록체는 대백황색에, 녹색의 발광을 한다. 그러나 불건전한 원형질체 세포벽은 두조직 모두 다 발광치 않아서, barrier filter 를 사용

하지 않았을 때 원형질체의 생존 또는 세포벽 형성과정의 식별이 효과적이다. (Fig. 1-d) Fluorescent brightener에 의한 반응은 mercury burner 광원에 의한 filter 사용시는 건전 엽육조직의 세포벽과 엽록체는 적색발광을 하나, callus의 세포벽은 대백색에, 담 pink색으로 발광을 한다. 한편 filter 없이는 건전엽육의 세포벽과 엽록체의 것은 자외선 조사 직후는 적색광택으로 발광하나, 수분 후에는 대백황색에, 녹색을 한 pink색의 발광을 한다. callus의 세포벽은 대백황색에 녹색발광을 한다. 따라서 본염료에서는 filter를 사용하지 않았을 때에 세포벽 형성의 식별에 가장 유효하였다. (Fig. 1-e)

FITC에 대한 반응은 fluorescent brightener와 유사하였다. 즉, 엽육조직의 세포벽과 엽록체는 filter를 사용하면 건전한 것은 대백황색에, 담 pink색으로 발광하고, callus의 세포벽과 엽록체는 대백황색에, pink색의 발광을 한다. 그리고 filter를 사용하지 않았을 때의 반응은 엽육조직과 callus 조직의 세포벽과 엽록체가 대백황색에, 담록색을 한다. 본염료에 의한 관별의 효과적인 것은 filter를 사용하지 않고 식별하는 것이다. (Fig. 1-f) RITC에 대한 반응은 filter를 사용하면 엽육조직과 callus의 세포벽과 엽록체는 모두 다 대황색에, pink색의 발광을 하고, filter없이 엽육조직의 세포벽과 엽록체, 그리고 callus의 세포벽은 자외선 조사 직후는 대담백황색에, pink색 발광을 하며, 자외선 조사 수분 후에는 대백황색에, 녹색의 발광을 한다.

FITC나 fluorescent brightener, 그리고 FDA와는 다소간의 차이가 있다. 따라서 FITC, RITC 모두 다 barrier filter없는 자외선 조사에서 생존률과 세포벽 형성등의 식별에 가장 좋은 방법이라고 할 수 있다.

(Fig. 1-g) FDA, fluorescent brightener, FITC 또는 RITC 등의 형광색소는 세포벽, 엽록체, 그리고 원형질에 대하여 특징적 염색이 되어 발광

하므로 융합전에 염색을 하여 융합 여부와 분열과정의 세포벽 형성등을 조사하는 데 대한 연구가 적지 않는데,^{8,10,21)} 특히 Patnaik *et al.*¹⁷⁾은 FITC에 의한 염색으로 heterokaryon을 확인하면서 micromanipulator로 분리배양법을 보고하고 있다.

2. 2n과 4n 원형질체 단리법 구명

단리방법에 따른 2n과 4n엽육조직 원형질체의 단리성적은 table 7과 같이 3가지 단리방법에서 모두다 4n체에서 높다. 더욱이 방법Ⅲ에 있어 2n과 4n 다같이 1차, 2차, 그리고 3차 단리율이 높는데, 4n이 96.4%로 2n보다 평균단리율이 높다. 그리고 방법Ⅰ은 2n과 4n 모두다 3가지 방법중 가장 낮는데, 4n의 평균단리율이 47.8%로, 2n 조직보다 높다. Table 8은 “in vitro”의 엽육조직에 대한 3가지 단리방법에 의한 원형질체의 수율의 성적인데, 방법Ⅰ, Ⅱ 그리고 Ⅲ에서 모두다 2n보다는 4n 조직에서 높다. 더욱이 방법Ⅱ는 2n, 4n 모두다 여타 방법들에 대하여 회수율이 높다.

Table 11, 12 그리고 13은 노지 생육식물체에 대한 단리방법에 따른 2n과 4n의 개체별 엽육조직의 원형질체 크기 조사 결과인데, 방법Ⅲ에 의한 원형질체의 크기가 2n의 것은 10.26 μ 로 가장 크나, 4n은 방법Ⅱ에 의한 단리원형질체가 가장 크다. 또한 4n은 2n보다 원형질체가 어느 단리방법에서나 커서, 일반배수체 특성을 하고 있다. 그리고 table 14는 “in vitro” 식물체의 단리방법Ⅰ에 따른 조사인데 4n의 원형질체가 2n보다 5.6% 크다. 그런데 노지 4n식물체의 원형질체의 평균크기는 117.1%인 것에 비하면 12%가 적다.

Table 9는 노지의 엽병의 원형질체에 대한 단리방법Ⅰ과 Ⅲ에 의한 수

Table 6. Reaction of mesophyll and callus protoplasts on stainer

Stainer Light source Barrier Health or death Protoplast	Methyl blue		Methylene blue	
	Tungsten bulb		Tungsten bulb	
	Used	Noused	Used	Noused
	Health	Death	Health	Death
Mesophyll cell wall chloroplast				
protoplast	ligh green with yellow color	dark blue with violet color	brigh red with green and yellow color	dark blue with violet color
Callus cell wall protoplast	do	do	do	do
			green with blue and violet color	same as the health used
			do	do
			do	do

Table 6. Cont.

	Evans blue			
	Tungsten bulb		Mercury burner	
	Used	Noused	Used	Noused
	Health	Death	Health	Death
Mesophyll cell wall chloroplast				
protoplast	bright red	blue with violet color	deep bright red color	light bright red color
Callus cell wall protoplast	do	do	deep bright red color	do
			radiate with white color	noradiate
			blue with violet color	do
			do	do

Table 6. Cont.

	Neutral red							
	Stainer		Tungsten bulb		Mercury burner			
	Light source	Barrier filter	Used	Health	Death	Used	Health	Death
Mesophyll cell wall			Health	Health	Death	Health	Health	Death
chloroplast protoplasm			Health	Health	Death	Health	Health	Death
Callus cell wall			Health	Health	Death	Health	Health	Death
protoplasm			Health	Health	Death	Health	Health	Death

Table 6. Cont.

	FDA				Fluorescent brightener			
	Mercury burner		Mercury burner		Mercury		Mercury	
	Used	Health	Death	Health	Death	Health	Death	
Mesophyll cell wall	radiate with deep bright red color	noradiate	do	*1) same as the Fluor. bri. with deep green and white color	noradiate	radiate with bright red color	*1) radiate with bright red color *2) radiate with pink, green and white yellow color	
chloroplast protoplasm	bright red color	do	do	radiate with green and white yellow color	do	do	*1) do *2) do	
Callus cell wall	radiate with green and pink color	noradiate	do	radiate with light green and white yellow color	radiate with light pink and white color	radiate with green and white color	radiate with green and white color	
protoplasm				radiate with green and yellow color	do			

Table 6. Cont.

Stainer Light source Barrier filter Health or death	F I T C				R I T C			
	Mercury burner		Noused		Mercury burner		Noused	
	Health	Death	Health	Death	Health	Death	Health	Death
Protoplasm	radiate with light pink and white yellow color		*1) same as the RITC *2) radiate with light green and white yellow color		radiate with pink and yellow color		*1) radiate with pink light white yellow color *2) radiate with green and white yellow color	
Mesophyll cell wall							same as the *1), 2) radiate with light green and white yellow color	
chloroplast	do		do		radiate with light pink and yellow color			
protoplasm								
Callus cell wall	radiate with pink and white yellow color		radiate with light green and white yellow color		radiate with pink and yellow color		radiate with light green and white yellow color	
protoplasm	radiate with light pink and white yellow color				radiate with light pink and white yellow color			

* 1) 1 min. after irradiation. * 2) 5 ~ 10 min. after irradiation.

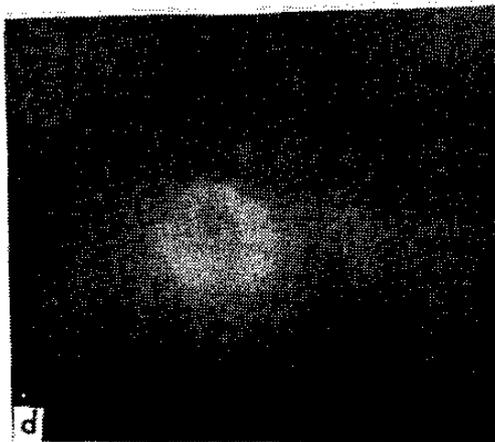
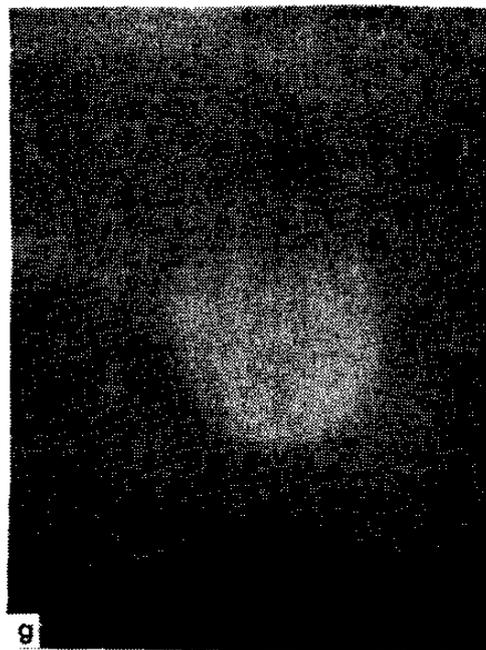
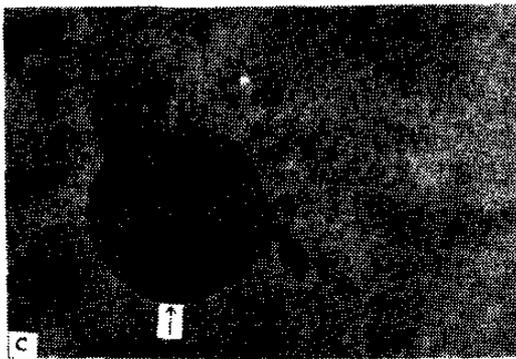
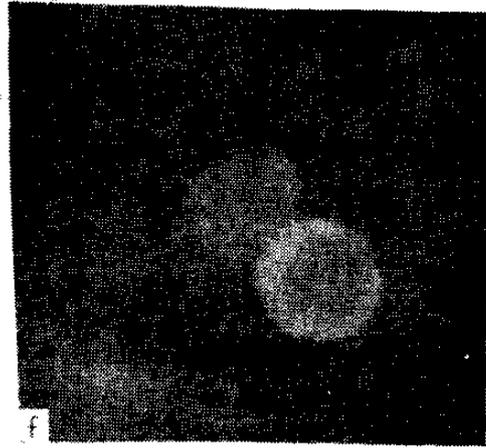
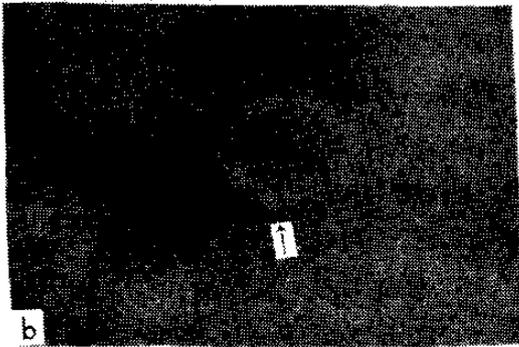
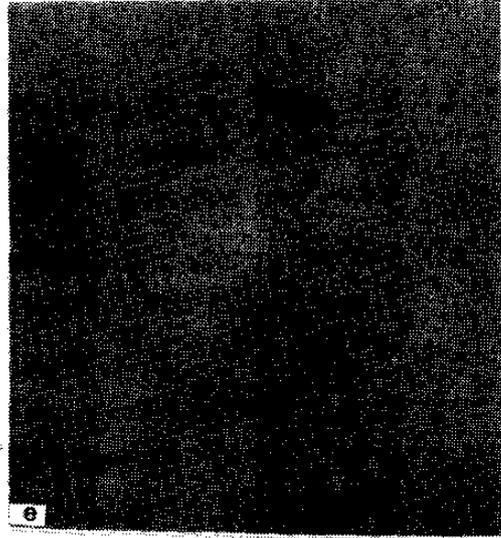
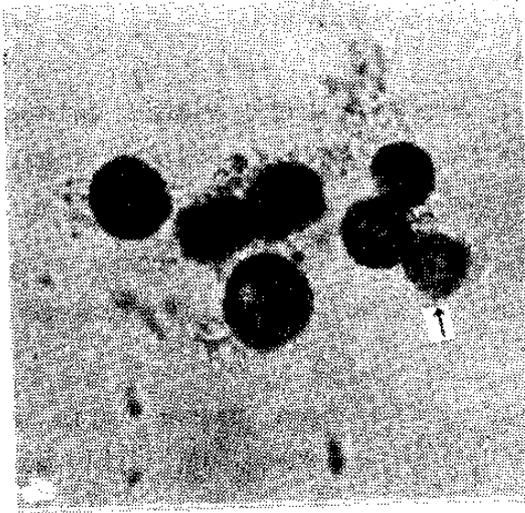


Fig. 1. Reaction on stainer in mesophyll protoplasts.

- a. Exclusion of 0.1% methyl blue suggests viable protoplasts (arrow), damaged protoplasts are darkly stained, light source is tungsten bulb. ($\times 600$)
- b. Viable protoplast (arrow) exhibit light red color when stained with 2.0% Evans blue, light source is tungsten bulb. ($\times 600$)
- c. Viable protoplasts (arrow) exhibit deep brown with pink color when stained with 0.01% neutral red, light source is tungsten bulb. ($\times 1,300$)
- d. Viable protoplast exhibit green and white yellow color when stained with 0.1% FDA, light source is mercury burner. ($\times 1,300$)
- e. Viable protoplasts exhibit pink, green and white yellow color when stained with 0.1% fluor. brightener in 0.6 M mannitol, light source is mercury burner. ($\times 600$)
- f. Viable protoplasts exhibit light green and white yellow color when stained with 5% FITC in 9M C.P.W. light source is mercury burner. ($\times 600$)
- g. Viable protoplasts exhibit light green with white yellow color when stained with 5% RITC in 9M C.P.W. light source is mercury burner. ($\times 1,300$)

Table 7. Effect of three different methods on protoplast isolations in 2n and 4n of *P. alba* × *P. glandulosa* mesophyll ("in vitro") (%)

	Method I			Method II			Method III					
	Viability											
	1st	2nd	3rd	mean	1st	2nd	3rd	mean	1st	2nd	3rd	mean
2n	43.4	18.2	21.8	27.8	56.3	26.0	54.3	45.5	96.5	92.4	94.9	94.6
4n	59.9	37.2	46.4	47.8	79.4	51.3	54.9	61.7	98.5	94.1	96.5	96.4

Table 8. Effect of three different methods on protoplast yields in 2n and 4n *P. alba* × *P. glandulosa* mesophyll ("in vitro") (per 0.2 g f. w.)

	Method I			Method II			Method III					
	1st	2nd	3rd	Total	1st	2nd	3rd	Total	1st	2nd	3rd	Total
2n	3,750	23,125	21,875	48,750	79,062	112,500	115,625	307,187	625	8,750	88,125	97,500
4n	2,500	23,438	72,813	98,850	90,312	383,125	402,500	875,937	8,125	74,375	286,250	368,750

Table 9. Effect of three different methods on protoplast yields in 2n and 4n *P. alba* × *P. glandulosa* petiole (field)
(per 0.2g f.w.)

	Method I				Method III			
	1st	2nd	3rd	Total	1st	2nd	3rd	Total
2n	6,250	5,000	9,375	20,625	1,250	3,750	7,812	12,813
4n	3,500	5,625	8,438	17,563	1,250	2,187	7,500	10,938

Table 10. Effect of three different methods on protoplast yields in 2n and 4n *P. alba* × *P. glandulosa* petiole "in vitro"

	Method I			Method II			Method III					
	1st	2nd	3rd	Total	1st	2nd	3rd	Total	1st	2nd	3rd	Total
2n	625	2,968	3,437	7,030	313	1,950	3,188	5,451	625	625	3,750	5,000
4n	625	1,093	2,500	4,218	97	1,625	1,625	3,347	312	937	2,187	3,437

Table 11. Protoplasts diameter for the isolation solution of method I in 2n and 4n *P. alba* × *P. glandulosa* mesophyll (field)

Yields	Frequency of protoplast diameter (I = 2.5 μ)											Total	Mean	
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11				
2n - 1st	1	44	79	18	4	4							150	9.60
2n - 2nd		21	84	40	2	2	1						150	10.35
2n - 3rd		14	74	49	7	6							150	10.83
Mean														10.26(100%)
4n - 1st	2	35	66	29	8	6	3				1		150	10.68
4n - 2nd		14	66	42	18	5	5						150	11.51
4n - 3rd		24	67	40	11	4	3	1					150	10.83
Mean														11.01(107.3%)

Table 12. Protoplasts diameter for the isolation solution of method II in 2n and 4n *P. alba* × *P. glandulosa* mesophyll (field)

Yields	Frequency of protoplast diameter (I = 2.5 μ)												Total	Mean
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
2n - 1st	27	69	46	7	1								150	7.65
2n - 2nd	10	70	56	8	3	1	2						150	8.45
2n - 3rd	4	69	52	18	4	3							150	9.95
Mean														8.68(100%)
4n - 1st	5	51	69	21	2	2							150	9.30
4n - 2nd		5	36	66	31		7	2	1	1	1		150	12.73
4n - 3rd		7	41	59	30	10	3						150	12.23
Mean														11.41(131.5%)

Table 13. Protoplasts diameter for the isolation solution of method III in 2n and 4n *P. alba* × *P. glandulosa* mesophyll (field)

Yields	Frequency of protoplast diameter (1 = 2.5 μ)											Total	Mean
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
2n - 1st	10	86	40	13	1							150	8.23
2n - 2nd	13	56	65	13	2	1						150	8.68
2n - 3rd	5	73	52	17	1	1						149	8.98
Mean												150	8.63(100%)
4n - 1st	35	68	43	1	3							150	7.40
4n - 2nd	5	51	62	26	4	1	1					150	9.40
4n - 3rd	1	10	47	47	23	14	7		1			150	12.30
Mean												150	9.70(12.5%)

Table 14. Protoplasts diameter for the isolation solution of method I in 2n and 4n *P. alba* × *P. glandulosa* mesophyll "in vitro"

Yields	Frequency of protoplast diameter (1 = 2.5 μ)											Total	Mean
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
2n - 1st												170	11.60
2n - 2nd		9	59	68	28	5						170	14.25
2n - 3rd		6	25	52	60	24	2	3				170	13.25
Mean												170	13.03(100.0%)
4n - 1st		5	53	80	25	6	1					170	11.80
4n - 2nd			3	40	78	43	6	6				170	14.75
4n - 3rd			4	38	88	32	8					170	14.75
Mean												170	13.76(105.6%)

량을 조사한 성적인데, 방법 I에 의한 수율이 방법 III에 대하여 2n과 4n에서 높다. 그리고 엽육조직에서와는 달리 수량이 적을 뿐만 아니라, 4n이 2n조직에서보다 어느 단리방법에서나 낮다.

Table 10은 “in vitro”의 엽병조직의 원형질체 수량을 단리방법 I, II, 그리고 III에 의거 조사하였는데 3가지 방법에서 4n에 비하여 2n의 조직의 수량이 많아서, 엽육조직의 수량과는 반대 결과이다. 그리고 방법 I의 수량이 2n, 4n 공히 가장 많다.

3. 2n과 4n 원형질체의 분화 요인

융합체 배양 체계를 수립하기 위하여 2n과 4n의 엽육의 원형질체에 대한 phytohormone의 영향을 시험하였는데, 그 결과는 table 15와 같다. 즉, 일반적으로 세포분열의 초기 속도는 2n보다 4n 원형질체가 빠른 경향이거나, callus의 형성상태는 2n이 좋은 편이다. 그리고 2n과 4n 엽육 원형질체는 BAP 0.5 mg/l, 2,4-D 2.0 mg/l과 NAA 2.0 mg/l에서 colony와 cluster, 그리고 callus 형성율이 가장 높으나, 고농도 phytohormone 첨가에서는 2n과 4n 다같이 분화 상태가 낮다. 특히 2n체는 BAP 0.5 mg/l, 2,4-D 10.0 mg/l과 NAA 10.0 mg/l에서, 그리고 4n체는 BAP 0.5 mg/l, 2,4-D 10.0 mg/l과 NAA 10.0 mg/l에서 그리고 BAP 0.5 mg/l, 2,4-D 2.0 mg/l와 NAA 10.0 mg/l에서 분화 상태가 불량하여, 4n체의 분화 상태가 대체적으로 저조한 경향이다.

Table 15. Effect of concentrations of BAP, 2,4-D and NAA on cell differentiation in 2n and 4n mesophyll protoplasts

source of protoplast	M.S. (-NH ₄ NO ₃) medium with phytohormone (mg/ℓ)		Normal (%)		cell division (%)		Microcolony formation (%)		Callus formation after 21 days		
	BAP	2,4-D	NAA	after 7 days	after 14 days	after 21 days	after 7 days	after 14 days		after 21 days	
2n	0.1	2.0	2.0	17.0	6.4	17.0	13.5	14.0	32.2	+++	
	0.1	10.0	2.0	13.0	4.1	6.0	10.2	12.6	7.4	28.4	+++
	0.1	10.0	10.0	10.4	10.0	17.4	10.4	8.2	9.6	25.6	++
	0.5	2.0	2.0	21.0	2.4	4.4	15.9	23.8	32.5	+++	
	0.5	2.0	10.0	13.5	10.5	6.0	14.0	13.6	10.6	21.1	+++
4n	0.1	2.0	2.0	17.0	23.0	10.2	10.3	4.0	8.0	9.1	+
	0.1	2.0	2.0	44.8	12.1	8.4	23.9	5.7	9.9	16.3	++
	0.1	2.0	10.0	21.8	17.1	10.7	21.8	11.1	27.5	+++	
	0.1	10.0	2.0	21.8	17.1	9.8	9.0	2.8	3.2	19.7	+
	0.1	10.0	10.0	25.8	17.1	9.8	9.0	2.8	3.2	15.2	+
mesophyll	0.5	2.0	2.0	40.7	28.0	28.5	14.0	8.4	16.0	28.5	+++
	0.5	2.0	10.0	36.9	15.9	57.4	23.3	8.7	9.3	10.1	+
	0.5	10.0	10.0	40.7	12.1	15.9	23.3	3.4	5.1	7.5	+
	0	0	0	37.7	13.4	18.6	2.7	7.2	11.6	2.4	-

4. 배지에 따른 2n 과 4n 원형질체 분화 요인

M. S. ($-NH_4NO_3$)와 W.P.M. ($-NH_4NO_3$)배지와 비교시험은 배양 21 일에 조사하였는데, 그 결과는 table 16 과 같이 M.S.배지는 2n 원형질체가 4n 보다 callus 형성률이 높은 경향이 나, colony 와 cluster 의 형성상태는 4n 에서는 W.P.M. 배지가 높다. callus 형성상태는 M.S. 와의 큰 차이가 없으나, M.S. medium 보다 떨어지는 경향이다.

5. 공존배양의 효과 시험

공존배양으로 융합체의 분화를 돕는 시험을 한 결과는 table 17 과 fig. 2 와 같다. 즉, 엽육체 배양시험에서 가장 홀몬의 배지 첨가로 배양을 하였는데, 2n 엽육조직과 4n *Hibiscus syriacus* 의 callus 를 공존배양한 결과는 callus 의 형성률은 28.0 %로 가장 높고, 쑥의 callus 와의 공존배양구는 2n 엽육이 17.8 %의 callus 형성으로 4n 엽육보다는 높다. 한편 *Hibiscus cannabinus* 의 callus 와의 공존배양 결과도 2n 엽육의 원형질체에서 높은 율의 callus 형성을 관찰할 수 있었으나, Tatemichi 등^{22, 23)}은 *H. cannabinus* 와의 공존이 단독구보다 생존률이 (30 %) 좋음을 보고하고 있으나, 본 시험에서 4n 의 *Hibiscus syriacus* 와의 공존배양에서 callus 형성이 가장 좋고, 다음은 쑥의 callus 이다. 그리고 4n 의 엽육의 원형질체와의 공존배양보다는 2n 엽육조직과의 공존배양이 callus 분화에 도움이 되었다.

6. 2n 과 4n 원형질체 융합 구명

원형질체 융합은 PEG법, dextran법, 고 pH + 고 Ca^{2+} + 온도법, 그리고 el-

Table 16. Effect of media on microcolony and callus formation in 2n and 4n mesophyll protoplasts

Protoplasts	Media	Phytohormone (mg/l)		Normal (%)	Cell division (%)	Colony and cluster formation (%)	Callus formation after 21 days
		BAP	2.4-D NAA				
2n mesophyll	M.S.	0.1	10.0	17.4	16.7	25.6	++
	W.P.M.	0.1	10.0	42.9	41.6	12.4	+
4n mesophyll	M.S.	0.1	10.0	9.8	6.0	15.2	+
	W.P.M.	0.1	10.0	47.0	23.1	28.5	+

Table 17. Effect of nurse culture on different species callus in 2n and 4n *populus alba* × *P. glandulus* mesophyll

Combination of protoplasts	M. S. (-NH ₄ NO ₃) medium with phytohormone (mg/l)		Normal		Cell division		Formed colony and cluster		Formed callus		Total
	BAP	2.4-D NAA	No	%	No	%	No	%	No	%	
2n mesophyll + 4n callus of <i>H. syr.</i>	0.5	2.0	42	51.2	12	14.6	5	6.1	23	28.0	82
	do	do	27	37.0	23	31.5	10	13.7	13	17.8	73
2n mesophyll + <i>Artemisia pri.</i> var. <i>orientalis</i>	do	do	81	50.0	38	23.5	27	16.7	16	9.9	162
	do	do	75	44.1	78	45.9	13	7.7	4	2.4	170
4n mesophyll + do	0.1	10.0	60	43.5	72	52.2	5	3.6	1	0.7	138
2n mesophyll + <i>Hibiscus camabinus</i>	do	do	60	43.5	72	52.2	5	3.6	1	0.7	138
4n mesophyll + do	do	do	60	43.5	72	52.2	5	3.6	1	0.7	138

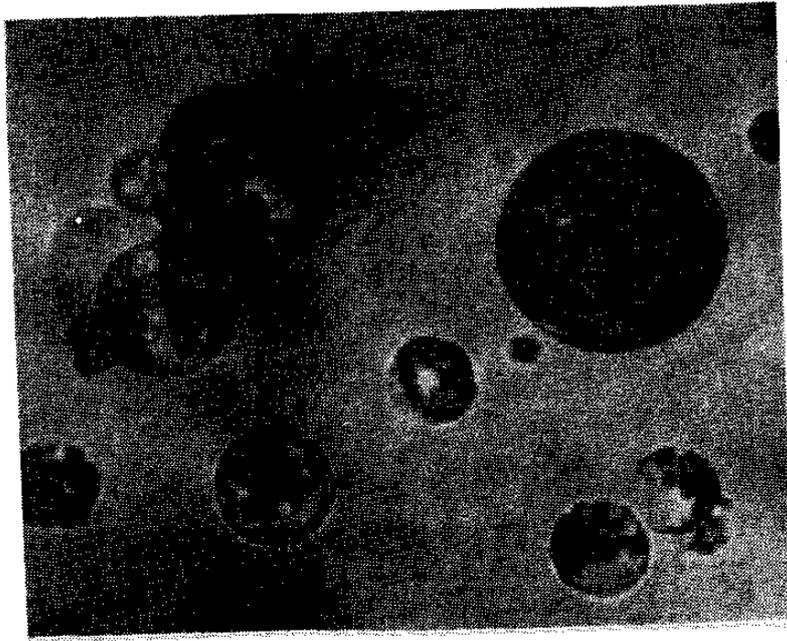


Fig. 2. Nurse culture with mesophyll protoplast of *P. alba* × *P. glandulosa*.

a : mesophyll protoplast.

b : callus protoplast of 4n *H. syriacus*.

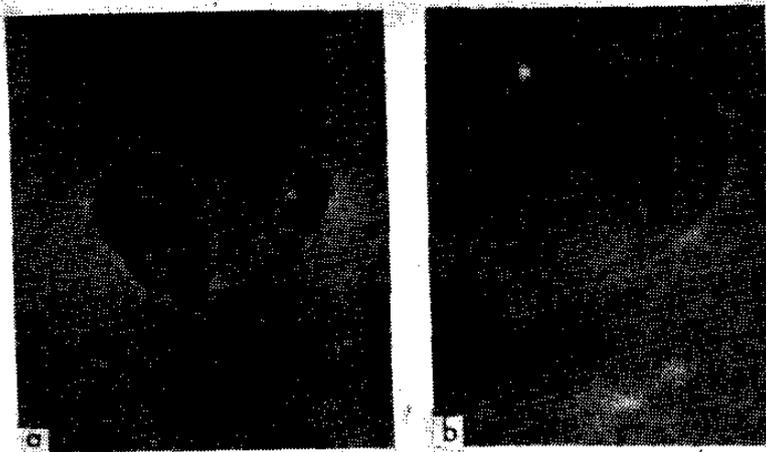


Fig. 3. Progress of PEG fusion after 20 min. (a) and early stage of the fused cell between protoplast of mesophyll and callus (b).

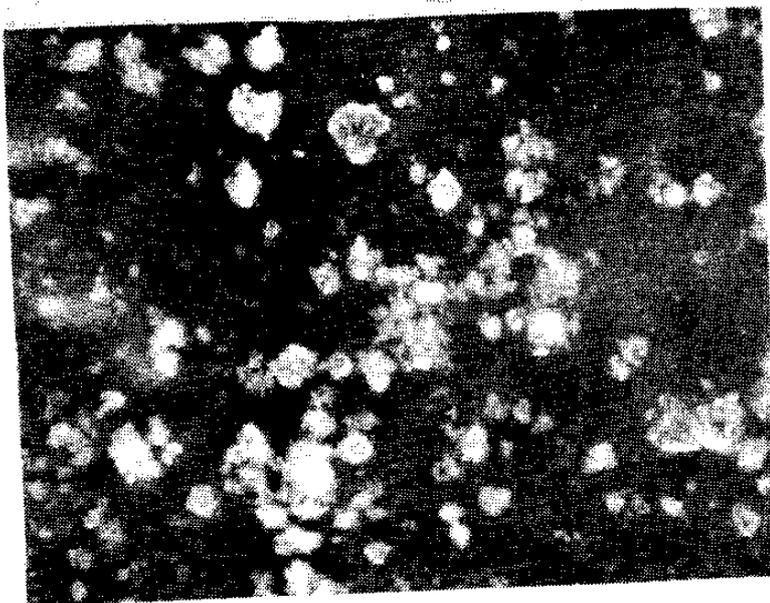


Fig. 4. Callus formation from fused protoplast after 8 weeks in culture.

ectrofusion 법의 4 가지로, 2n 의 엽육과 4n 의 callus 원형질체에 대하여 실험하였는데, 융합체의 판별은 엽육체가 있는 녹색의 원형질체와 백색의 callus 와의 융합이므로 색에 의한 식별이 용이하였고, 또한 형광 염료에 의한 잔존 세포벽과 엽육체의 발광특이성으로 판별하였다. 그 성적은 다음과 같다.

가. PEG 법은 분자량과 농도를 달리한 PEG 융합유발제로, 35 °C에서 융합한 성적은 table 18 과 fig. 3 과 같다. 즉, 융합을 위한 점착후 35 분에 조사하였는데, 15 % PEG 의 농도에서는 1,540 PEG 가 31 %로, 가장 융합률이 높고, 66 %구에서도 1,540 PEG 가 융합률이 높다. 어느 분자량의 PEG 에서나 분자량에 영향은 적고, PEG 의 농도에 영향하는 경향이며, 어느 농도에서나 분자량이 높을수록 큰 차이는 없지만 융합률이 낮아지는 경향이다. 차등도³⁾콩의 원형질체와 담배의 엽육체와의 융합에서 PEG 의 분자량과의 차이는 그리 없으나, 농도에서는 큰 차이가 있어 30 %보다는 50 % 4,000 PEG 에서 36 % 융합함을 보고하고, Tademich²²⁾는 *Eucalyptus* 의

Table 18. Effect of concentration of PEG 1,540, 4,000 and 6,000 on fusion among 2n mesophyll and 4n callus protoplasts

PEG (M.W.)	Concentration (%)	Total (No)	Normal		Fusion	
			(No)	(%)	(No)	(%)
1,540	15	120	83	69.2	37	31
4,000	15	136	97	71.3	39	29
6,000	15	119	85	71.4	34	29
1,540	66	192	142	74.0	50	26
4,000	66	158	123	77.8	35	22
6,000	66	150	121	80.7	29	18

35 °C when adherence.

융합에 있어 6,000 PEG가 33%로서 융합률이 가장 높다고 보고하고 있으나, 1,540 PEG는 수종에 따라서 높은 융합을 함을 보고하고 있다.

Table 19. Effects between different molecular weight and concentration of PEGS

PEG (M.W.)	Concentration (%)	Total (No)	Normal (%)	Cell division (%)	Colony and cluster formation(%)	Callus formation (%)
1,540	15	134	15.7	8.2	25.4	11.9
4,000	15	120	35.0	16.7	15.0	15.0
6,000	15	147	21.1	25.9	12.2	6.8
1,540	66	182	18.7	14.8	2.2	0.5
4,000	66	474	13.9	7.0	4.2	0.9
6,000	66	250	14.4	4.0	5.6	2.4

Note : All date were recorded after 21 days in fusion.

Table 19는 PEG법에 의거한 융합체의 세포 분화상태를 분자량과 농도와의 관계로 조사한 결과인데, 15%의 PEG처리구에서는 1,540 PEG에서 colony와 cluster, 그리고 callus가 37.5%로 가장 다수 분화하고, 6,000 PEG가 19%로 가장 적게 분화하고 있다. 한편 66%구에서는 6,000 PEG에서 8.0%의 분화로 가장 다수이다. 가장 낮은 분화율은 66%의 1,540 PEG 처리구이고, PEG의 농도가 높은 것보다 낮은 처리에서 세포 분화상태가 좋다.

Fig. 4는 융합체처리 4주 후부터 B5 + hormone (BA + NAA + 2.4-D)로 배양하여 8주 경과한 융합체에서 callus가 형성된 상태인데, 분

화속도의 차이에 따른 callus의 크기가 상이한 callus 덩어리를 관찰할 수 있었는데, 증식속도가 속한 것은 배수체의 일반적인 특징인 6n 잡종일 가능성이 높아서 이것만의 subculture 로 shooting 하는 데 이르렀다. (Fig. 4, 6)

나. 고 pH / Ca^{2+} / 온도 / glycine - NaOH buffer 의 융합유발제를 사용한 원형질체 융합은 2n mesophyll 과 4n callus 의 원형질체로 수행하였는데 그 성적은 table 20 과 같이 pH 6.8 구보다 pH 10.5 구가 평균 융합률이 높다. 가장 높은 융합률은 pH 10.5, glycine - NaOH 100 mM buffer 로, 35 °C 에서 점착시킨 것인데 34.2 %의 융합률인데, Melchers¹³⁾ 와 Ito⁵⁾ 도 pH 와의 관계가 깊음을 논하고 있다. 그리고 pH 6.8 구에서는 35 °C 하에서 융합률이 높아서 고온과의 관계가 깊음을 시사하고 있다.

PEG 법에 의한 융합유발제와 같이 이용성이 높다고 할 수 있다. 또한 고 pH / Ca^{2+} / 온도 / glycine - NaOH buffer 의 융합 유발제를 사용한 융합 원형질체의 분화는 융합후 7일만의 조사인데 그 결과는 table 21 과 같이 buffer 의 pH 6.8 과 10.5 에서 다같이 융합체 정치온도가 25 °C 보다 는 35 °C 의 고온에서 융합체의 평균 callus 형성률이 좋고, 더욱이 pH 6.8 의 35 °C 에서 100 mM buffer 로 처리한 구가 91.4 %의 callus 를 형성하고 있다.

한편 glycine - NaOH buffer 의 농도는 50 mM 보다 는 100 mM 의 처리구가 어느 온도구에서나, 또는 어느 pH 구에서나, 원형질체의 callus 형성률이 높았다. 그러나 colony 와 cluster 형성률은 pH 10.5 의 25 °C 처리구를 제외하고는, 50 mM buffer 처리구가 형성률이 높아서 callus 형성시와 반대 현상이다. 융합체의 분화는 PEG 의 농도도 영향하지만 HEPES buffer 의 Ca^{2+} salt 와 pH 가 크게 영향함을 Ito⁵⁾ 와 Melchers¹³⁾ 의 보고가 있다.

Table 20. Relationship between high pH / Ca²⁺ / temp. / glycine - NaOH buffer on fusion

pH	Temp. (°C)	Buffer glycine-NaOH (mM)	Total	Normal		Fusion	
				(No)	(%)	(No)	(%)
6.8	25	50	187	154	82.4	33	17.6
		100	232	202	87.1	30	12.9
	35	50	127	95	74.8	32	25.2
		100	152	114	75.0	38	25.0
10.5	25	50	174	137	78.7	37	21.3
		100	191	151	79.1	40	20.9
	35	50	154	122	79.2	32	20.8
		100	114	75	65.8	39	34.2

다. Electrofusion법은 두가지 조건의 전기장 하에서 실시한 융합 성적은 table 22와 fig. 5와 같다. 즉 2n mesophyll과 4n callus의 원형질체를 1 : 1로 혼합한 1.6 ml를 전장 chamber에 넣고 1 MHz의 교류로 원형질체막에 극성을 형성시켜, protoplast pearl chain을 만들고 다시 직류의 전개강도의 전기 pulse로 원형질막에 소공을 만들어 인접한 원형질체가 들어가 융합되도록 하고 10분후 조사하였는데, 두 원형질체 또는 그 이상의 수의 원형질체가 융합하는 것이 관찰되었다.

조건 I에서는 4n callus + 4n callus의 융합과 접촉률은 40.8%로 가장 융합률이 높고, 2n mesophyll + 2n mesophyll은 8.1%로 가장 낮다. 한편 조건 II에서는 4n callus + 2n mesophyll의 융합과 접촉률은 41.0%로 가장 높아서, 조건 I의 4n callus끼리의 융합률보다도 높은 경향이다. 그러나 2n mesophyll + 2n mesophyll은 전혀 융합하지 않고 있어 조건 I에서와 같이 mesophyll끼리의 융합은 어려운 것 같다.

조건 I 이나, 조건 II에서 $4n$ callus + $2n$ mesophyll 에서 두 원형질체의 융합률이 24.5%, 36.4%로 나타났는데, 이것은 Togawa, et al.²⁴⁾이 지적하듯이 전기융합이 조작의 간편성, 재현성도 높지만 잡종세포의 고수율에 기능이 있는데다가 용적이 큰 callus와 그에 비하여 용적이 작은 원형질과의 융합으로 인한 것이 아닌가 생각되어 장차 이종간의 융합에 밝은 전망을 주고 있다.

전기적 융합에 의한 체세포의 heterokaryon 융합에 관한 연구로 *Nicotiana*에 관한 Watts and King²⁷⁾의 상세한 연구외에, *Brassica*,²⁹⁾ *Avena*,²⁵⁾ *Nicotiana*¹¹⁾ 등의 보고가 있으나 융합률은 그리 높지 않을 뿐만 아니라 다년생 식물에 대한 연구가 결여되어 있어, 본 연구에서 높은 융합은 이종 융합체 육성에 기대가 된다.

라. 기왕의 방법 II에 의거한 단리, 세정 원형질체에 대하여 6% NaCl의 dextran (500,000) 10%와 15% 농도의 융합액으로 처리융합시킨 원형질체 현탁액을 NaCl - NaOH 용액으로 처리하고 세정하였는데 그 융합 성적은 table 23과 같다. 즉, 10%의 dextran 처리에서는 6% NaCl 보다는 8% NaCl 용액의 처리가 융합에 유효하고, 또한 NaOH의 저농도 보다는 고농도에서 융합율이 높은 경향이다. 특히 8% NaCl - 0.3% NaOH 처리는 71.9%의 융합율로, 가장 높은데, 이 결과는 Kameya^{7,8,9)} 등의 성적과 유사하다. 한편 15% dextran에, 6% NaCl - 0.6% NaOH 용액 처리는 59%로 다음으로 우수한 성적이다. 이 결과는 Kameya^{7,8,9)}는 많은 dextran 처리에서 NaOH 용액의 농도가 중요하다고 보고하고 있는데, 2%까지는 이 농도에는 융합되지만 고농도에서는 원형질체의 파괴가 심하여 융합체가 관찰되지 못하였다고 보고하고 있다. PEG 보다는 독성이 낮다고 하는 dextran 융합체는 앞은 융합체 배양단계에서 여러 융합체보다 효과적일 것이라 사료되어 사용시도할 가치가 높다고 본다.

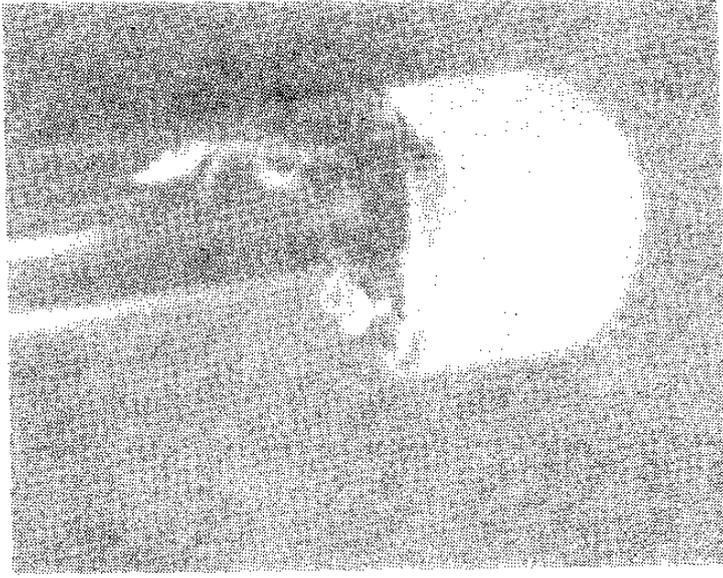


Fig. 6. Shoot induced on B_5 medium with phytohormones.

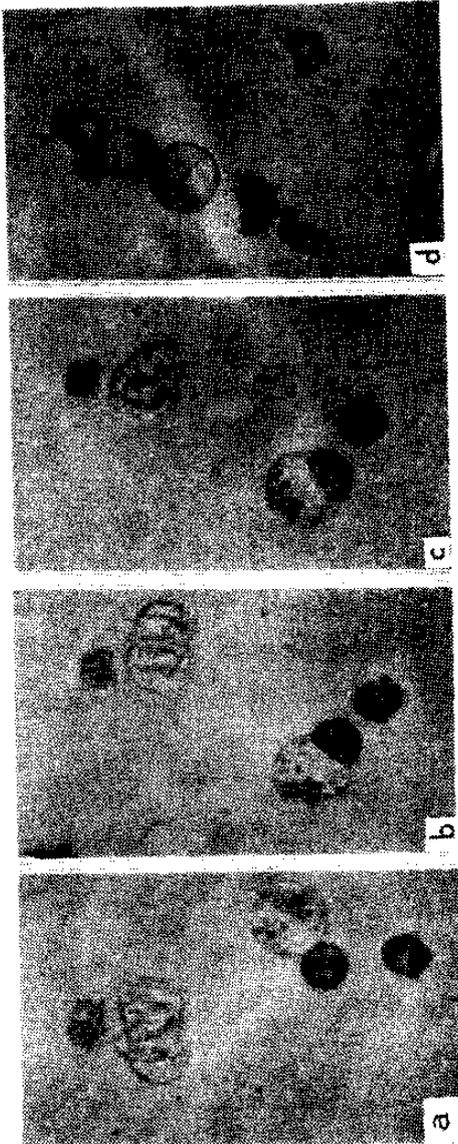


Fig. 5. Protoplast adherence in $2n$ mesophyll and $4n$ callus of *Populus alba* \times *P. glandulosa*.

- a. Early stage of the adherence of two protoplasts.
- b. Progress of fusion after 12 min. (white protoplast;
4n callus origin and green protoplast; mesophyll
origin)
- c. Very close fusion of two protoplasts.
- d. Formed pearl chain by 4 protoplasts.

Table 21. Effect of high pH / temperature / glycine - NaOH buffer on fusion in 2n mesophyll and 4n callus of *P. alba* × *P. glandulosa*

pH	Temp. (°C)	Buffer Glycine-NaOH (mM)	Normal		Cell division		Colony and cluster formation		Callus formation		Total (No)
			(No)	(%)	(No)	(%)	(No)	(%)	(No)	(%)	
6.8	25	50	24	33.3	6	8.3	18	25.0	24	33.0	72
			28	34.1	5	6.9	13	15.9	36	43.9	82
			14	40.0	7	20.0	4	11.4	10	28.6	35
10.5	25	50	0	0	1	2.9	2	5.7	32	91.4	35
			33	33.0	19	19.0	12	12.0	36	36.0	100
			9	11.5	2	2.6	35	44.9	32	41.0	78
10.5	35	50	1	2.0	1	2.0	22	44.0	26	52.0	50
			1	3.1	1	3.1	1	3.1	29	90.6	32
			1	3.1	1	3.1	1	3.1	1	3.1	1

All observed after 7 days in fusion.

Table 22. Protoplasts adherence of 2n mesophyll and 4n callus in electric field

Conditions	Nonadhesion protoplasts (No)	Adhesion of 2 protoplasts		Adhesion of 3 protoplasts		Adhesion of 4 or more protoplasts		Total	
		(No)	(%)	(No)	(%)	(No)	(%)		(No)
Condition I	98								
4n callus + 4n callus		18	18.4	10	10.2	12	12.2	40	40.8
4n callus + 2n mesophyll		24	24.5	0	0	0	0	24	24.5
2n mesophyll + 2n mesophyll		6	6.12	2	2.0	0	0	8	8.1
Condition II	88								
4n callus + 4n callus		10	11.4	0	0	2	2.3	12	13.7
4n callus + 2n mesophyll		32	36.4	2	2.3	2	2.3	36	41.0
2n mesophyll + 2n mesophyll		0	0	0	0	0	0	0	0

Table 23. Relation between concentration of dextran and NaCl-NaOH solution on fusion among 2n mesophyll and 4n callus protoplasts

Dextran 500,000 (M. W.) with NaCl-NaOH solution	Total (No)	Normal (No) (%)	Fusion (No) (%)
10 % dextran			
with 6 % NaCl - 0.1 % NaOH	114	54 47.4	60 52.6
do - 0.3 % NaOH	146	63 43.2	83 56.8
do - 0.6 % NaOH	126	55 43.7	71 56.3
with 8 % NaCl - 0.3 % NaOH	89	25 28.1	64 71.9
15 % dextran			
6 % NaCl - 0.6 % NaOH	156	64 41.0	92 59.0

라. Dextran에 의한 융합유발제로 처리한 원형질체의 배양성적은 table 24 과 같이, dextran의 농도와 NaCl-NaOH solution의 농도와의 관계를 조사하였는데, 10 % dextran 농도에, 8 % NaCl-0.3 % NaOH solution 구가 68.8 %로 callus의 형성율이 가장 높았다. 다음은 15 % dextran에 6 % NaCl-0.6 % NaOH solution 처리가 45.5 % callus형성과 colony 그리고 cluster형성이 양호하여서, dextran 농도보다는 NaCl-NaOH solution의 농도가 많은 영향을 하는 경향이다.

第 2 節 花芽分化 및 稔性向上

1. 화아분화시험

입목의 화아분화가 늦는것은 입목육종에 큰장해가 되고있다. 더욱이 포푸라류는 개화에 10여년이 소모되므로 조기 화아분화는 그만큼 육종연한을

Table 24. Relationship between the different concentration of dextran and protoplast differentiation in 2n mesophyll/4n callus of *P. alba* × *P. glandulosa*

Dextran 500,000 (M.W.) with NaCl-NaOH solution	Total (No)	Normal (No) (%)	Cell division (No) (%)	Colony and clu- ster formation (No) (%)	Callus formation (No) (%)
10 % dextran	37	0	0	37	0
with 6 % NaCl - 0.1 % NaOH	31	26	1	2	2
- 0.3 % NaOH	8	6	0	1	1
- 0.6 % NaOH	16	3	0	2	11
with 8 % NaCl - 0.3 % NaOH					
15 % dextran	110	18	4	38	50
6 % NaCl - 0.6 % NaOH		16.4	3.6	34.5	45.5

단축시키게 된다. amino acid와 vitamine을 첨가한 배지로 광주기를 달리 하고 화아분화유발제로, 화아분화 촉진을 위한 시험을 실시한 결과는 table 25와 같다. 즉 3월의 줄기에서 발생한 맹아로 6주간처리를 광주기 10 시간조사구에서는 3% sucrose에, BAP의 3가지 농도의 첨가구가 평균 줄기의 생육이 가장 좋고, B₉의 첨가구가 가장 생육이 불량하다. 또한 B₉과 BAP 첨가구는 저농도에서 shoot의 생육이 좋으나, PEG에서는 고농도첨가가 좋다. 같은 탄소원에 광주기 16시간 조사구에서는 PEG 첨가구가 평균 성장량이 가장 좋고, B₉첨가구가 가장 불량하다. 그리고 분화촉진제의 농도의 영향은 PEG 첨가구는 10시간 광주기구와 같이 고농도인 5%에서 성장 좋으나, B₉는 10시간구에서와 같이 농도에 영향이 없다. 그리고 BAP는 40 ppm 고농도구에서는 약해가 심하였다. 한편 sucrose 9% 첨가구의 10시간 광주기구는 BAP 10 ppm 첨가구가 가장 성장량이 좋고, B₉첨가구는 3% sucrose 첨가구에서와 같이 생장이 가장 불량하다. 또한 같은 탄소원에, 16시간 조사구에서는 10시간 조사구에서와 같이 PEG, B₉다같이 생장이 불량하였다. 특기할 것은 multiple shoot이 3% sucrose, 16시간 광주기구하의 PEG 5% 첨가구와 B₉ 1000 ppm 첨가구, 그리고 9% sucrose에 10시간 광주기구하의 BAP 10 ppm 첨가의 각각구에서 발생하고 있는데, 이것은 화아분화에 저해현상이다. 또한가지 특기현상은 3% sucrose, 16시간 광주기하의 B₉ 200 ppm 첨가구의 개체가 발생한 것은 대형인것과, 3% sucrose, 10시간 광주기구하의 PEG 5% 첨가구의 한개체에서 화아가 형성되어, 단일처리로 PEG 첨가가 화아 분화에 영향을 주는 것으로 추측되고, 또한 모든 control에 비하여 PEG, B₉, BAP는 공히 줄기생장이 불량하여 성장에 저해작용을 한다고 추측되나, 3% sucrose에, 16시간 광주기에 PEG 1~5% 첨가구는 줄기생장에 유효하게 작용하고 있어 줄기의 성장과 화아분화에는 PEG가 가장 좋은 것으로 추측

Table 25. Effect of scion treatment with different concentration of sucrose and flowering inducing substance on growth and flowering in *Populuse alba* × *P. glandulosa*

Photo - periods	Chemical (concn.) with 3% sucrose	Number of survival	Growing state after an inoculum on medium
10 hrs	Control	9	Shoots elongated from axillary bud (18 ~ 60 mm in length)
	PEG 1% (4,000)	3	Dormant bud
	5	4	Flower bud formation on one scion
	B ₉ 200 ppm	8	Shoots elongated from axillary bud (14 mm in length)
	500	3	Do (8 mm in length)
	1,000	7	Do (7 mm in length)
	BAP 10 ppm	5	Bud development
	20	4	Shoots elongated from axillary bud (20 mm in length)
	40	4	Do (9 mm in length)
	4	4	Do (8 mm in length)
16 hrs	PEG 1% (4,000)	5	Do (30 mm in length)
	2	4	Do (26 mm in length)
	5	5	Shoots multiple (38 mm in length)
	B ₉ 200 ppm	7	Shoots elongated from axillary bud (15 mm in length)
	500	5	Bud elongated from initials (12 mm in length)
	1000	3	Shoots multiple (15 mm in length)
	BAP 10 ppm	5	Bud elongated from initials (3 ~ 11 mm in length)
	20	6	Shoots elongated from axillary bud (15 mm in length)
	40	4	Damage of BAP

Table 25. Cont.

Photo - periods	Chemical (concn.) with 9% sucrose	Number of survival	Growing state after an inoculum on medium
10 hrs	Control	3	Shoots elongated from axillary bud (5 ~ 35 mm in length)
	PEG 1%	5	Bud development
	2	4	Shoots elongated from axillary bud (5mm in length)
	5	4	Bud development
	B ₉ 200 ppm	5	Dormant bud
	BAP 10 ppm	8	Shoots multiple (5 ~ 40 mm in length)
16 hrs	Control	4	Shoots elongated from axillary bud (4 ~ 51mm in length)
	PEG 1%	4	Shoots elongated from axillary bud (5 ~ 9 mm in length)
	2	3	Bud development
	5	4	Shoots elongated from axillary bud (6mm in length)
	B ₉ 200 ppm	4	Bud development
	500	4	Shoots elongated from axillary bud (6mm in length)
	1000	4	Do

되는데, 이같은 사실은 ¹⁾ *Asparagus*의 종자 PEG 처리에서 4~8% 화아분화율을 얻고 있어 이에 뒷받침하고 있다.

第3節 器內受精

1. HPLC에 의한 자방의 내재 IAA 조사.

기내수정을 위한 생식기관의 기내배양은, 원연의 식물체간의 수정률 향상과 노지에서 임성이 낮은 식물체와 그리고 배수체간의 임성향상을 위하여 연구가 진행되고 있는데,^{2,28)}본 실험에서는 우선 2n과 4n에 대한 엽육조직내의 IAA차이와 자방의 IAA의 함량을 HPLC에 대하여 6월 5일 조사하였다. 그 결과는 fig. 7,8과 같이 4n엽육조직은 standard에 비하여 72.3% 검출되었으나, 2n에 비하여 103% 증가하고 있어, 일반 배수체 식물의 특징인 화학성분의 증가 현상과 같다.

한편 2n체의 유엽은 성숙유엽에 비하여 19%밖에 형성되지 않고 있어, 자람에 따라 IAA가 생성 증가함을 시사하고 있고, 그리고 자방의 IAA량은 standard에 비해서 19.6% 생성하고 있는데, 이것은 조⁴⁾의 팔의 상배축의 배양에서도 조직의 위치에 따라 상이함을 보고하고 있어, 이 결과는 기관의 종류에 따른 차이로 보아지며, 유엽보다는 68% 증가하고, 성숙유엽보다는 28%밖에 되지 않는다.

2. 배 형성과 발달 조사

Populus alba × *P. glandulosa*의 조직학적 연구는 김¹⁰⁾의 연구 외에는 없고 더욱이 생식기관의 조직학적 연구는 전무하다. Table 26은 심피 당배의 수를 조사한 성적인데, 2~4개가 자연상태에서 형성되어, 평균 2.5개

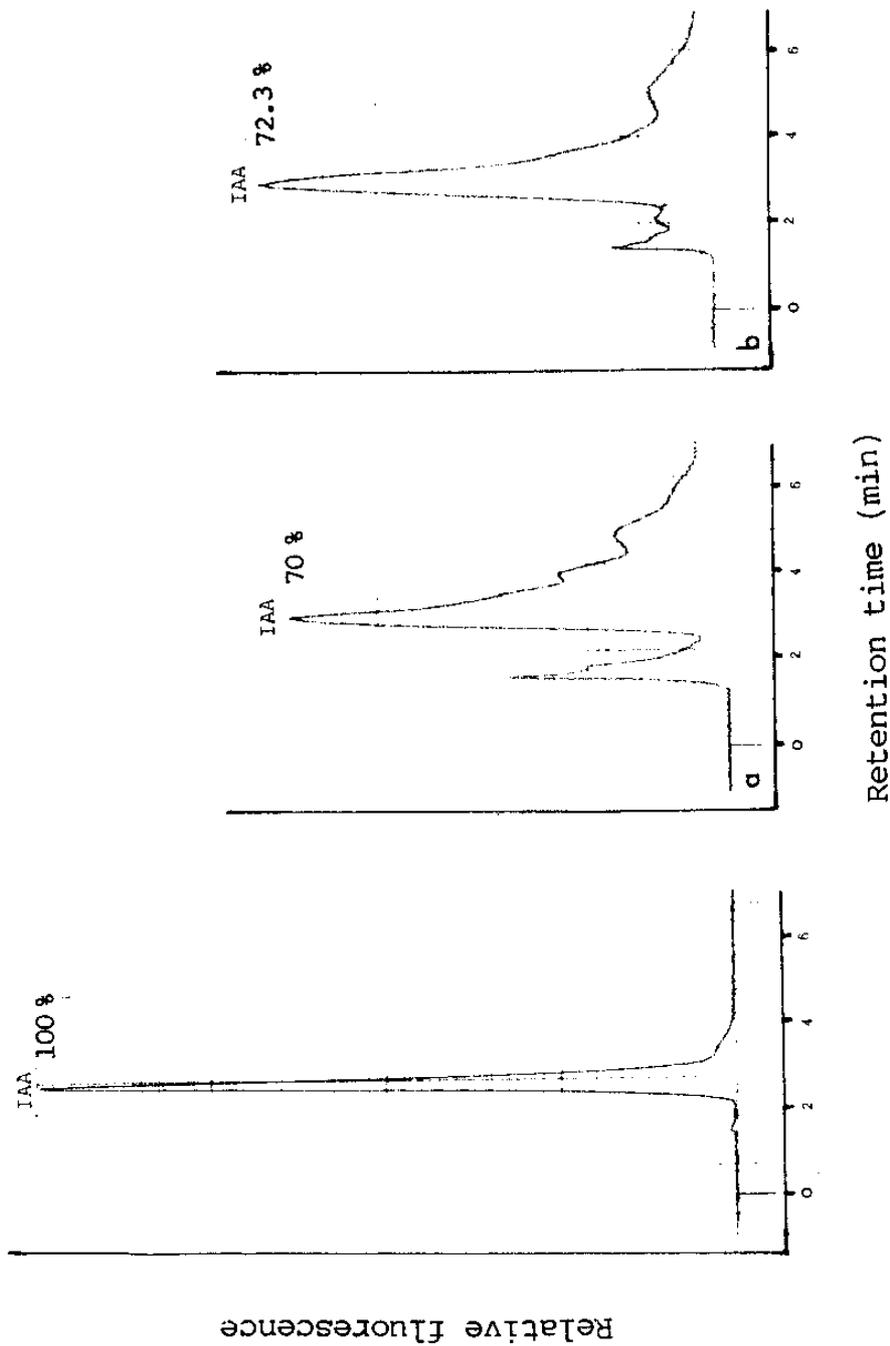


Fig. 7. HPLC chromatograms of IAA in extracts from the leaf blade of 2n

(a) and 4n (b) P. alba x P. glandulosa.

HPLC chromatographic conditions: Column, Zorbax ODS (150 x 4.6mm i.d.). Carrier solution, 85% H₃PO₄ in 22% MeOH (pH 6.8). Flow rate, 1ml/min. Detector, fluorescence, excitation 250 nm, emission 450 nm.

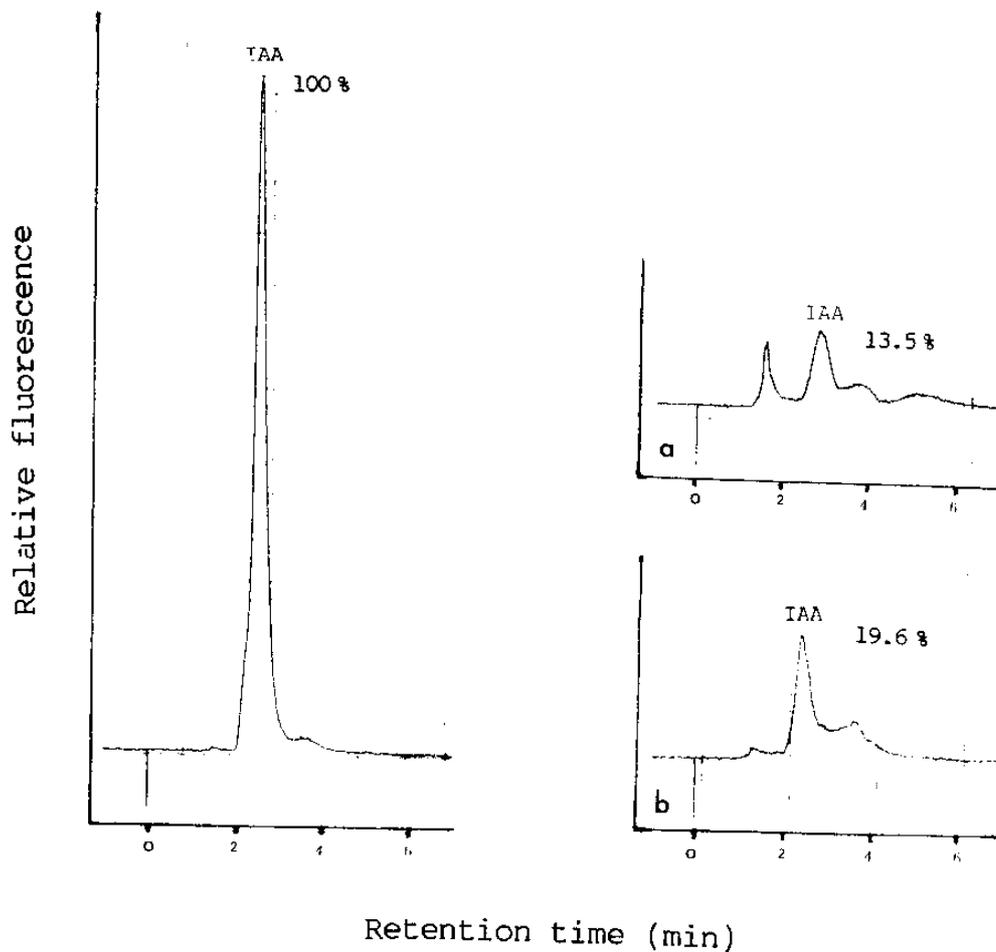


Fig. 8. HPLC chromatograms of IAA in extracts from the juvenile leaf (a) and ovary (b) of 2n *P. alba* x *P. glandulosa*.

HPLC chromatographic conditions : Column, Zorbax ODS (150 x 4.6 mm i.d.). Carrier solution, 85% H_3PO_4 in 22% MeOH (pH 6.8). Flow rate, 1 ml/min. Detector, fluorescence, excitation 250 nm, emission 450 nm.

가 발달하고 있다. 그러나 *Populus alba* × *P. glandulosa*는 1대잡종이므로 개체에 따른 배의 수에 변이가 있을 것이다. 기내배양으로 키워 인공 수정한 자방내의 배의 발달을 조사한 결과는 fig. 9와 같이 3개가 발생하고 있다. 성숙종자를 얻는 데까지는 이루지 못했지만 기내수정의 가능성을 시사하고 있다.

Table 26. Number of embryo per a carpel

	Number of embryo			Total
	2	3	4	
Frequence	42	28	5	75



Fig. 9. Embryo development from a carpel of *P. alba* × *P. glandulosa*. (14 days after pollination)

第4章 摘 要

Populus alba × *P. glandlosa*에 대한 배수체 육성연구의 2년차 연구에서 얻은 결과는 다음과 같다.

第1節 原形質 單離와 融合

1. 원형질체생존과 세포벽형성조사

가. 0.1% methyl blue solution에 대한 *Populus alba* × *P. glandulosa*의 원형질체의 염색성을 tungsten bulb에 의한 照射로, 건, 전여부의 식별이 barrier filter 사용여부에 관계없이 가능하였다.

나. 2.0% Evans blue solution에 대한 염색성은 tungsten bulb에 의한 조사로, barrier filter 불사용시 건, 전여부의 식별이 효과적이다.

다. 0.01% ~ 0.001% (pH 3.7) neutral red solution에 대한 반응은 tungsten bulb에 의한 조사로 건, 전여부의 식별이 barrier filter 사용시 효과적이다.

라. FDA, fluorescent brightener, FITC와 RITC에 대한 염색성발광은 mercury burner로 조사하고, barrier filter를 사용하지 않았을때가 더 효과적이고, 융합체의 세포벽형성과 염록체의 식별이 가능하다.

2. 2n과 4n 원형질체 단리법구명

가. 단리방법에 따른 2n과 4n의 염색조직 원형질의 단리율은 어

는 방법에서나 2n보다 4n에서 높고, 또한 방법Ⅲ은 2n, 4n 다같이 단리율이 가장 높다.

나. 단리방법에 따른 엽육조직의 원형질체 회수율은 방법Ⅱ에서 2n, 4n 공히 가장 높다.

다. 단리방법에 따른 노지원형질체 크기는 4n의 것은 방법Ⅱ에 의한 것에서 크고, 2n은 방법Ⅰ에 의한것에서 크다. 그리고 “in vitro”의 것도 단리방법 4n이 2n에 비하여 크나, 노지의 원형질체에 비하여 12%나 작다.

라. 노지식물의 엽병에 대한 원형질체 수량은 단리법Ⅰ에서 높고 또한 엽육조직에서보다 수량이 떨어지고, 그리고 4n에 비하여 2n 조직에서 수량이 많다.

마. “in vitro”의 엽병조직의 원형질체 수량은 4n보다는 2n조직에서 많고, 그리고 방법Ⅰ에 의한 수량이 2n, 4n 공히 높다.

3. 2n과 4n 원형질체 분화요인과 배지에 따른 분화구명

가. 원형질 융합체의 배양체계 수립을 위한 2n과 4n의 엽육조직의 원형질체 배양은 일반적으로 4n보다는 2n엽육조직에서 분화율이 높고, 2n과 4n엽육조직은 BAP, 0.5 mg/ℓ, 2,4-D, 2.0 mg/ℓ 그리고 NAA 2.0 mg/ℓ 첨가는 2n과 4n엽육조직 공히 분화율과 callus 형성이 가장 높다.

나. 원형질체의 callus 형성율은 W.P.M.보다 M.S. 배지가 좋은 경향이 다.

4. 공존배양의 효과시험

2n 포푸라 엽육조직과 4n *Hibiscus syriacus*의 callus와의 공존배양이 callus 분화에 가장 좋으나, 그러나 2n 식물의 callus는 4n보다는 2n 엽육조직과의 공존배양이 분화에 유익하다.

5. 2n과 4n 원형질체 융합구명

가. 1,540, 4,000, 그리고 6,000 PEG에 대한 2n 엽육과 4n callus와의 융합을 35°C에서 시도한 결과 15% 1,540 PEG가 가장 높고 PEG 분자량이 많을수록 융합율이 낮아지는 경향이다.

나. 15%로 PEG 융합처리한 원형질체 배양은 1,540 PEG가 colony, cluster 그리고 callus 형성율이 가장 높고, 66% PEG 융합처리한 원형질체의 배양은 6,000 PEG에 의한 융합체가 가장 많은 분화를 한다.

다. 고 pH / Ca²⁺ / 온도 / glycine - NaOH buffer의 융합유발제에 의한 원형질체 융합은 pH 10.5의 glycine - NaOH 100 mM buffer로, 35°C에서 짐작시킨 것이 가장 융합율이 높고, 그리고 pH 6.8보다는 pH 10.5의 buffer에서 융합율이 높다.

라. 고 pH / Ca²⁺ / 온도 / glycine - NaOH buffer 융합유발제에 대한 callus 분화 효과는 pH 6.8, 10.5의 어느 구에서나 100 mM의 buffer에서 높았고, 또한 저 pH구보다는 고 pH구에서 callus 형성률이 높았다.

마. Electrofusion은 전계강도 1.25 Kv/cm, pulse 전압 500 v, 그리고 pulse 폭 50 μs에서 전체융합률이 높고, 전계강도 1.00 Kv/cm, pulse 전압 400 v, 그리고 pulse 폭 100 μs에서는 4n callus + 2n mesophyll의 융합률이 높다.

바. Dextran (M.W. 500,000)을 이용한 원형질체 융합처리는 dextran 용액의 고농도보다는 저농도에서 융합률이 높다. 또한 8% NaCl - 0.3% NaOH 용액처리는 가장 효과적이다.

사. Dextran 융합 유발제에 의한 융합체의 callus 형성률은 10% dextran에 8% NaCl - 0.3% NaOH solution 처리가 가장 높다.

第2節 花芽分化 및 稔性向上

화아 분화 촉진을 위한 시험은 PEG, B₉, BAP의 화아분화 촉진제로 수행하였는데,

1. 3가지 촉진제 모두다 비 첨가구에 비하여 새 줄기의 발생과 성장량이 낮다. 그러나 그 중 3% sucrose와 16시간 광주기하에, PEG 첨가는 가장 생장이 좋다.

2. 화분아 저해 현상인 multiple shoot의 발생이 3% sucrose와 16시간 광주기하에, PEG 5% 첨가구, B₉ 1,000 ppm 첨가구, 그리고 9% sucrose와 10시간 광주기하에, BAP 10 ppm 첨가에서 각각 관찰되었다.

3. 3% sucrose에, 10시간 광주기하에, PEG 5% 첨가구에서 치상 6주만에 화아가 분화되었다.

第3節 器內受精

1. HPLC에 의한 자방 내재 IAA 조사

2n과 4n 엽육조직과 자방의 IAA의 정량분석결과, 엽령에 따라 IAA

의 정량이 차이가 있는데, 유엽보다는 성숙엽에 다량 함유하고 지방은 유엽에 비하여 68 % 증가하고, 성숙엽에 비하여는 28 % 감소하고 있다. 4n의 엽육조직은 2n에 비하여 103 % 증가하다.

2. “in vitro”로 배양한 *P. alba* × *P. glandulosa*에 있어, 인공수정으로 배의 형성과 발달이 가능하다.

引用 文 献

1. Abe, T. and T. Kameya. 1986. Promotion of flower formation by atrazine and diuron in seedlings of Asparagus. *Planta*, 169: 289-291.
2. Beasley, C.A. 1974. In tissue culture and plant. Science, (Street, ed.) Academic Press, London, 169.
3. 차 현철, 조 성호, 이 광용. 1982. 콩 원형질체 세포의 담배 엽록체 이입. *Kor. Jour. Bot.*, 25(4): 181-188.
4. 차 덕이. 1985. 팔의 상배측 절편의 부정근 형성에 있어서 HPLC 에 의한 IAA 의 분포와 정량분석. *한식조배지*, 12(2): 79-87.
5. Ito, K. 1985. Genetical studies on the induction of somatic hybrid plants in Solanaceous species. *Bull. Oji Inst. For. Tree Imp.*, 5: 1-62.
6. 伊藤祐道 . 1989. アズキ의組織培養에 이용한外植体採取의通年化 -木部及太由束の萌芽枝の利用- *林木の育種* , 151: 9-14.
7. Kameya, T. 1975. Induction of hybrids through somatic cell fusion with dextran sulfate and gelatin. *Jnp. J. Genetics*, 50(3): 235-246.
8. Kameya, T. 1979. Studies on plant cell fusion: Effects of dextran and pronase E on fusion. *Cytologia*, 44: 449-456.
9. Kameya, T. 1983. Studies on plant cell fusion by dextran: Effect of pH, inorganic salts and electrical stimulus. *Cytologia*, 48: 873-878.
10. 김 정석, 전 상근, 황 진성. 1980. Populus alba x P. glandulosa와 그의 양친종의 형태학, 해부학, 생리학적 연구. *한림지*, 49: 11-31.
11. 김 준철, 이 석구, 이 광용. 1987. Nicotiana tabacum 과 Petuda inflata 의 전기적 원형질체 융합에 의한 속간 체세포 잡종의 생성. *한식회지*, 30(1): 1-9.

12. Komamine, A. et al. 1990. Handbook of plant biotechnology. Asakura Book Co., pp. 261.
13. Melchers, G. and G. Labib. 1974. Somatic hybridization of plants by fusion of protoplast. Mol. Gen. Gent., 135: 227-294.
14. Park, Y.G. and K.H. Han. 1986. Isolation and culture of mesophyll protoplasts from in vitro cultured Populus alba x P. glandulosa Jour. Kor. For. Soc., 73: 33-42.
15. 박 용구, 손 성호. 1986. 이태리 포푸라 1-214 엽육조직에서 원형질체 분리에 미치는 몇 가지 요인. 한림회지, 74: 29-36.
16. 박 용구, 손 성호. 1988. 현사시나무 기내배양 엽육조직에서 분리된 원형질체 배양 및 식물체 재분화. 한림회지, 77(2): 208-215.
17. Patnaik, G., E.C. Cocking, J.Hamill and D. Pental. 1982. A simple procedure for the manual isolation and identification of plant heterokaryons. Plant Sci. Letter, 24: 105-110.
18. Redenbaugh, M.K., R.D. Westfall and D.F. Karnosky. 1980. Protoplast isolation from Ulmus americana L. Pollen mother cells tetrads, and microspores. Can. J. For. Res., 10: 284-289.
19. Redenbaugh, K., D.F. Karnosky and D. Westfall. 1981. Protoplast isolation and fusion in three Ulmus species. CAN. J. Bot., 59: 1436-1443.
20. Saito, K., Y.Hosoi, K.Ishii and T.Sato. 1987. Callus formation from protoplasts of mesophyll cells of Populus plantlets. J. Jpn. For. Soc., 69(12): 472-477.
21. Sasamoto, H., Y.Hosoi, K.Ishii, T.Sato and A.Saito. 1989. Factors affecting the formation of callus from leaf protoplasts of Populus alba. J. Jpn. For. Soc., 71(11): 449-455.
22. 土道良泰, 伊藤一弘, 伊藤昌樹. 1986. 木本植物におけるプロトプラストの融合に関する基礎研究 134回日林中心 61-63. 要旨.

23. —, —, 柴田 勝. 1988. ユーカリプロトプラストからの苗条原基の作成と苗化. 日育種誌, 38(2): 100-101.
24. Togawa, Y., K. Toda, S. Takayama, Y. Miura, T. Mochizuki and I. Iwasaki. 1987. Cell fusion by electric fields. Shimadzu review, 44(1): 17-25.
25. Verhoek, B., R. Hampp, H. Ziegler and U. Zimmermann. 1983. Electrofusion of mesophyll protoplasts of Avena sativa. Determination of the cellular adenylate-levels of hybrids and its influence on the fusion process. Planta, 158: 199-204.
26. Wample, R.E. and D.M. Reid. 1979. The role of endogenous auxins and ethylene in the formation of adventitious roots and hypocotyl hypertrophy in flooded sunflower plants (Helianthus annuus). Physiol. Plant, 45: 219-226.
27. Watts, J.W. and J. M. King. 1984. A simple method for large scale electrofusion and culture of plant protoplasts. Bioscience Reports, 4: 335-342.
28. Yang, H. Y. and C. Zhou. 1982. In vitro induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules. Theor. Appl. Genet., 63: 97-104.
29. Zachrisson, Z. and C. H. Bornman. 1984. Application of electric field fusion in plant tissue culture. Physiol. Plant, 61: 314-320.

< 주 의 >

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 특정연구개발 사업의 연구보고서이다.
2. 이 연구개발내 용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 한다.