韓國林學會誌 74 : 29-36. 1986
Jour. Korean For. Soc. 74 : 29-36. 1986

이태리포푸라 I-214 葉肉組織에서 原形質體 分離에 미치는 몇가지 要因[1]

朴 龍 求[2] · 孫 聖 鎬[2]

Factors Affecting the Isolation of Mesophyll Protoplasts from *Populus euramericana* cv. I-214[1]

Young Goo Park[2] · Sung Ho Son[2]

要 約

이태리포푸라 I-214 (*Populus euramericana* cv. I-214)의 器內培養한 葉肉組織에서 原形質體 分離에 미치는 몇가지 要因에 對해 調査, 檢討하였다. 器內에서 培養된 芽를 多量으로 增殖하기 위한 培地는 MS基本培地에 0.1 mg/ℓ의 BAP를 添加한 것이 가장 좋은 성적을 나타냈다. 葉 1 g 當 2.4×10^6개의 가장 높은 原形質體 分離 빈도를 나타낸 것은 Cellulase R-10 2 %, Macerozyme R-10 0.8 %, Hemicellulase 1.2 %, Driselase 2.0 %, Pectolyase Y-23 0.05 %에 DTT와 MES 완충액을 添加한 후 삼투압 안정제로 0.6 M의 Mannitol을 넣고 pH를 5.6으로 조정한 酵素溶液이었다. CPW溶液으로 洗淨한 후 0.6 M의 Sucrose 溶液에 處理한 것이 回收率 51.8 %로 가장 높게 나타났다.

ABSTRACT

A method isolating *Populus euramericana* cv. I-214 mesophyll protoplasts was developed to facilitate application of genetic engineering techniques to this species. The suitable medium for shoot multiplication *in vitro* was MS basal medium with 0.1 mg/l BAP. The effects of several factors influencing protoplast isolation could be evaluated quickly by using leaf *in vitro* and known volumes of maceration and washing media.

The best yields of mesophyll protoplasts were obtained using leaves *in vitro* in 2.0% Cellulase R-10, 0.8% Macerozyme R-10, 1.2% Hemicellulase, 2.0% Driselase, 0.05% Pectolyase Y-23, and 0.6M Mannitol in addition to DTT and MES buffer adjusted to pH 5.6. Over 2.4 x 10^6 protoplasts per gram of leaf were produced using these conditions. For protoplast purification, the most favorable sucrose concentration of floating solution was 0.6M after washing them with CPW solution.

This method of screening factors affecting protoplast isolation could be applicable to other species.

Key words: mesophyll protoplast; protoplast culture; Populus euramericana *cv. I-214.*

---

[1] 接授 3月 4日 Received on March 4, 1986.
[2] 慶北大學校 農科大學 College of Agriculture, Kyungpook National University, Daegu, Korea.
*本 硏究는 1985年度 文敎部 學術造成硏究費에 依해 수행된 것임.

緒 論

최근 組織培養法은 林木育種 分野에서 大量增殖, 抵抗性 個體選拔 및 早期檢定 等 여러 分野에서 많은 成果를 올리고 있다.

組織培養法 中에서 原形質體에 對한 硏究는 아직 그 歷史는 짧으나 在來育種法의 限界인 性的 장벽을 넘을 수 있는 體細胞 融合法에 利用 될 수 있으며 다른 細胞의 遺傳物質인 DNA나 RNA의 導入에 依한 形質轉換 等의 可能性을 가지고 있기 때문에 새로운 育種法으로 각광받기 시작하고 있다(Ahuja, 1983).

林木은 生理的 特性에 있어서 一年生 草本類와는 差異가 많아 組織培養이 쉽지 않다. 特히 原形質體 硏究에 있어서 一年生 草本類는 原形質體 分離 및 培養, 細胞膜形成 後 分裂, callus 形成을 유도하여 植物體 分化를 시키는 等 상당한 成果를 올리고 있으나 林木의 경우에는 이에 대한 硏究 成果가 그다지 크지 못하다(Ahuja, 1984a).

林木 中에서도 포푸라類는 脫分化와 再分化가 쉬운 樹種 中의 하나로써 1964年 Mathes가 3倍체 사시나무에서 callus를 유도한 以來 1970年 Winton은 *Populus tremuloides* 에서 分化에 成功하였으며 그 이후 大量增殖(Kim *et al.* 1980), 不定芽 유도, 葯培養에 依한 半數體유도(Sato, 1981) 等의 硏究가 報告된 바 있다.

針葉樹나 濶葉樹에서 原形質體 分離에 관한 報告는 一年生草本에 比해 많지 않다. Rona & Grignon (1972)는 단풍나무(*Acer pseudoplatanus*)에서 처음으로 原形質體를 分離하였으며 針葉樹에서는 子葉과 callus 組織을 사용하여 *Picea abies* (Huhtinen & Winton, 1973), *Pinus contorta* (Hackman & von Arnold, 1983), *Pinus pinaster* (David & David, 1979), *Picea excelsa* (Strmen & Cierna, 1981), *Pseudotsuga menziesii* (Winton *et al.* 1975) 等에서, 濶葉樹에서는 *Citrus* sp. (Vardi *et al.* 1975; Vardi *et al.* 1982; Kobayashi *et al.* 1983), *Ulmus* (Redenbaugh *et al.* 1980), *Fagus sylvestris* (Ahuja, 1984b) 等에서 原形質體 分離에 對한 報告를 하였으나 培養에 成功하여 완전한 植物體를 얻은 것은 *Citrus* 類에 불과하다. 포푸라類의 原形質體 硏究는 *P. euramericana* (齋藤, 1976), *P. tremuloides*, *P. tremula* (Ahuja, 1983), *P. alba* × *grandidentata* (Chun, 1985)에서 原形質體를 分離하여 培養하였을 때 몇번의 細胞分裂을 관찰하였으나 유상조직 形成은 실패하였다.

이태리포푸라는 우리나라 속성 造林樹種 中의 하나로써 callus 유발과 大量增殖에 對한 報告가 있으나 原形質體에 관한 硏究는 국내에서 報告된 바가 없다.

본 硏究는 林木의 原形質體 分離와 추출법 및 抽出된 原形質體 培養法에 관한 기초 자료를 제공하는데 目的이 있다.

材料 및 方法

原形質體를 유리시키기 위한 材料를 얻기 위해 무균상태로 器內에서 不定芽를 유도한 다음 大量增殖을 시킨 후 各各의 葉을 충분히 展開시켜 사용하였다.

1. 不定芽 유도 및 大量增殖

慶北大學校 구내에 있는 20年生 이태리포푸라 I-214를 試料木으로 선정하여 當年生 가지를 約 30 cm 길이로 採取한 뒤 붙어 있는 葉을 除去한 줄기를 1~2 cm 길이로 잘라 수도물에 충분히 세척한 후 70% 알콜에 50초간 침적시킨 뒤에 다시 5% NaOCl 용액에 5分間, 1% H_2O_2 용액에 3分間 소독한 다음 무균수로 충분히 씻어 不定芽 유도를 위해 1/2 MS 기본배지에 BAP 0.2 mg/ℓ와 NAA 0.1 mg/ℓ를 첨가한 후 器內 치상하였다. 유도된 shoot는 MS (Murashige & Skoog) 基本培地에 BAP 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 3.0, 5.0 mg/ℓ씩 첨가한 培地에 옮기어 줄기의 增殖力을 調査하였다.

그 결과에 따라 增殖速度가 가장 빠른 培地에서 multiple shoot를 유도하였으며 증식된 줄기는 생장조절물질을 첨가하지 않은 1/2 MS 배지에 이식하여 잎의 展開 및 생장을 도모하였다.

2. 原形質體 分離를 위한 要因調査

器內培養한 葉肉組織 1g을 무균상 안에서 1mm 간격으로 잘게 자른 다음 효소 溶液 20 ml를 넣고 30℃에서 20分間, 120 stroke/min로 진탕한 다음 효소용액을 버리고 새로운 용액을 넣어 같은 方法으로 30分間 진탕하여 一次 회수를 하고 分解가 완전히 일어나지 않은 葉肉組織에 다시 같은 양의

효소를 첨가하여 30분 마다 二次, 三次 회수를 하였으며 매 회수마다 분리된 原形質體의 數는 Hemocytometer (L×W; 0.0025mm²: D; 0.100mm)로 생체중 1g當 原形質體 數를 계산하였고 原形質體의 생존율은 Evans blue 0.2% 溶液으로 2分間 생체 염색 후 검경하여 전체 原形質體 數에 대한 백분율로 계산하였다. 分離된 原形質體의 정제는 효소용액 처리가 끝난 뒤 56μm nylon 체로 걸러서 分解되지 않은 葉肉組織을 제거하고 表 1의 洗淨溶液에서 500rpm으로 3分間, 浮遊溶液에서 500rpm으로 5分間 원심분리하였다.

Table 1. Compositions of washing and floating solution

Reagents	Washing solution	Floating solution
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	148 mg	24 mg
KH_2PO_4	17 mg	-
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	25 mg	-
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	3 mg	-
Dextran (T40)	-	9.6 g
BSA*	-	120 mg
Sucrose	-	24.65 g
Mannitol	10.93g	-
H_2O	100 ml	120 ml
pH	5.6	5.6

*BSA: Bovine Serum Albumin

① 處理酵素別 處理時間에 따른 原形質體 分離 및 生存率

處理酵素는 Cellulase R-10, Macerozyme R-10, Hemicellulase, Driselase와 Pectolyase Y-23을 混合하여 4가지의 서로 다른 처리구를 만들어 사용하였다(表 2). 회수 時間은 酵素處理後 50分, 80分, 110分, 3회 실시하였다.

② 處理酵素溶液內 Mannitol 농도에 따른 原形質體 分離 및 生存率

가장 分離能이 높은 酵素液에 Mannitol 농도를 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8M이 되도록 조절하여 원형질체 分離 수율과 生存率을 調査하였다.

③ 酵素溶液의 pH에 따른 原形質體 分離 및 生存率

가장 分離能이 높은 酵素液의 pH를 5.0, 5.6, 6.2, 6.8로 조절하여 pH 효과를 調査하였다.

④ 酵素溶液內 DTT 및 MES 緩衝液의 첨가효과

효소액에 SH基 보호제로써 DTT와 pH 안정제로써 MES 완충액을 단용 또는 혼용하여 그 效果를 비교하였다.

Table 2. Compositions of four types of enzyme solutions, used to degrade cell wall

(%)

Reagents	I	II	III	IV
Cellulase 'onozuka' R-10	2.0	1.0	2.0	1.0
Macerozyme R-10	0.4	0.4	0.8	0.8
Hemicellulase 'sigma'	1.2	1.2	1.2	1.2
Driselase	2.0	2.0	2.0	2.0
Pectolyase Y-23	0.05	0.05	0.05	0.05

Potassium Dextran Sulfate	1.0	g
Potassium Citrate	166	mg
DTT*	30	mg
MES buffer**	3	mM
BSA***	100	mg
Calcium Chloride, Dihydrate	18	mg
Potassium Dihydrogen Phosphate	17	mg
Magnesium Sulfate	25	mg
Calcium Nitrate	3	mg
Mannitol	10.93	g
Distilled Water	100	ml
pH	5.6	

* DTT: Dithiothreitol
** MES buffer: 2(N-Morpholino) ethane sulfonic Acid
*** BSA: Bovine serum albumin

⑤ 原形質體 정제 회수時 Floating Solution 內의 Sucrose 濃度別 回收 效果

分離된 原形質體를 洗淨液으로 處理한 다음 floating solution에서 浮遊시켜 순수한 原形質體를 回收하였는데, 이때 sucrose 농도를 각각 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8M로 하여 回收效果를 調査하였다.

結果 및 考察

1. 不定芽 誘導 및 大量增殖

野外에서 자란 林木個體에서의 原形質體 抽出은 박테리아 및 雜菌에 의한 오염 때문에 效率이 떨어질 뿐만 아니라 무균상태로 完全滅菌하기가 매우 어렵다(齋藤, 1985, ; Chun, 1985).

野外 개체의 1年生 가지를 소독하여 1/2MS 基本培地에 BAP 0.2와 NAA 0.1mg/ℓ를 첨가한 培地 위에서 새순을 자라게 하였다. 이렇게 하여 자란

새순은 2~3cm 길이로 잘라서 大量增殖을 위한 multiple shoot를 유도하였다. multiple shoot 에 가장 적합한 배지를 찾기 위해 MS基本培地에 BAP를 각각 0.00, 0.01, 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80, 1.00, 3.00, 5.00mg/ℓ씩 첨가한 10가지 처리구에서 multiple shoot 발생정도를 調査하였다(그림 1).

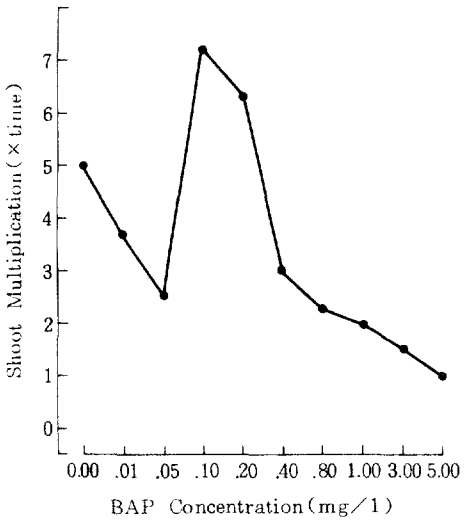

Fig. 1. Relation of shoot multiplication on MS basal medium to BAP supplemented at various concentrations.

이식 1個月後에 調査한 結果 BAP 0.1mg/ℓ를 첨가한 培地에서 처음 移植한 것에 比해 7倍 이상의 multiple shoot가 발생하였으며 0.2mg/ℓ로 부터 0.3mg/ℓ까지는 점진적으로 낮아졌으며 3.0mg/ℓ에서는 거의 생육하지 않았다. 단지 비교구에서 상당히 높은 수준의 multiple shoot가 발생하였는데 이것은 줄기 발생을 유도하기 위해서 처리한 BAP 효과가 남아있어서 나타난 결과로 생각되며 時間이 지남에 따라 비교구에서는 multiple shoot의 발생이 감소되었으며 정상적인 생육을 하게 되는 것을 관찰할 수 있었다. Kim 等(1981)은 현사시의 multiple shoot 조사 결과 BAP 0.2mg/ℓ에서 가장 높은 증식효과를 얻었다고 보고하였으며, 같은 樹種에서 Park & Han(1986)은 BAP 0.4mg/ℓ에서 높은 증식효과를 관찰한 바 있다. BAP를 처리하여 줌으로써 multiple shoot를 발생케 하는 것은 외생 cytokinin이 정아우세를 억제하여 엽병에 있는 잠아를 자극하여 shoot를 發生하는 것으로 알려져 있다(George & Scherington, 1983). 그러나 그 농도가 낮거나 높으면 그 효과가 감소되었으며, 樹種에 따라 반응이 각각 다르게 나타나는 것은 같은 樹種內의 유전자형 間에도 반응에 對한 차이가 있는 것으로 사료된다(Park & Han, 1986).

2. 原形質體 分離를 위한 要因調査

① 處理酵素別 處理時間에 따른 原形質體 分離調査

네가지 서로 다른 酵素조합에 따른 원형질체 분리율 및 生存率은 그림 2와 같다. 處理 50分後에 回收한 一次回收에서는 酵素조합間에 큰 差異가 없었으며 80分後에 回收한 二次回收에 있어서는 Ⅲ酵素處理區(Cellulase R-10 2.0%, Macerozyme R-10 0.8%, Hemicellulase 1.2%, Driselase 2.0%, Pectolyase Y-23 0.05%)에서 10.5×10^5개로 가장 높았으며 處理後 110分 뒤에 回收한 三次回收에서도 Ⅲ處理區가 2.4×10^6개로 나머지 Ⅰ, Ⅱ, Ⅳ 처리구에서 보다 높은 분리율을 나타내었으며, Ⅰ, Ⅱ, Ⅳ 처리구 間에는 거의 差異가 없었다. 生存率은 一次回收에서는 酵素處理 間에 거의 차이가 없이 높게 나타났으며(93.3~98.0%), 二次回收와 三次回收에서는 각각 88.5~94.0%, 85.3~90.5%로 점차 낮게 나타났으나 酵素處理間에는 Ⅲ조합에서 85.3%로 낮게 나타났으나 크게 차이는 없었다.

한편 Ahuja(1983)는 *Populus tremula*의 葉肉

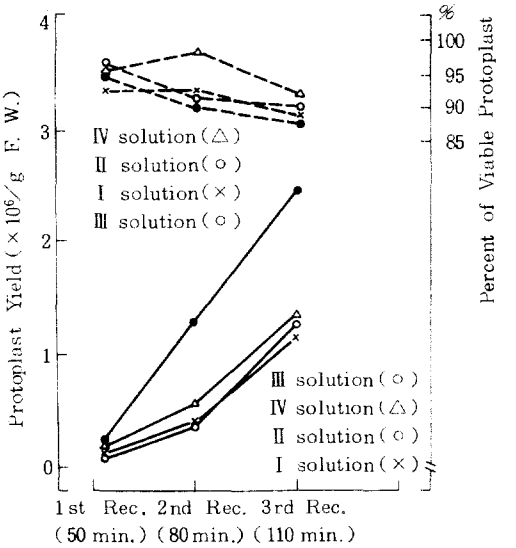

Fig. 2. The effect of four enzyme concentrations on protoplast yield (—) and viability (···) at 3 incubation times.

組織에서 Cellulase R-10 0.5%, Macerozyme R-10 0.1%의 酵素조합으로 20~22時間 處理하였으며 Redenbaugh 等(1980)은 느릅나무(*Ulmus americana*)의 花粉母細胞에서 Cellulase R-10 2.0%, Driselase 2.0%, Meicelase 2.0%, Hemicellulase 2.0%, Pectinase 1.0%, Macerozyme 0.5%의 酵素조합으로 30時間 처리하여 原形質體를 分離해 냈다. 또한 Kobayashi 等(1983)은 감귤의 葉肉組織에서 Cellulase R-10 0.2%, Macerozyme R-10 0.3%, Driselase 0.1%의 酵素조합으로 16時間 處理하였으며 Chun(1985)은 *Populus alba*×*grandidentata*의 葉肉組織에서 Cellulase 0.5%, Macerase 0.1%를 15~20時間 處理하여 原形質體를 分離하였다. Hyun 等(1985)은 참나무類의 어린잎에서 Cellulase R-10 2.0%, Macrozyme R-10 1.0%, Pectinase 250 unit/ℓ 조합을 사용하여 26℃에서 5~6時間 處理함으로써 原形質體를 分離해 내었다.

齊藤(1985)는 포푸라類에서 본 연구와 같은 종류의 酵素인 Cellulase R-10 2.0%, Macerozyme R-10 1.0%, Hemicellulase 2.0%, 조합을 사용하여 生存率이 높은 原形質體를 分離해냈다. 이와 같이 대부분 저농도의 酵素處理에서는 장시간(16~20시간)을 요구하였으며 느릅나무 花粉母細胞 處理 이외에는 Cellulase와 Macerozyme을 사용하고 있으며 감귤에서는 Driselase를 첨가하여 사용하고 있으나 본 연구에서와 같이 5가지의 酵素조합을 사용한 例는 없다. 따라서 處理酵素 溶液의 농도가 너무 높거나 장시간 處理할 때 원형질막이 침해될 수 있으므로 되도록 단시간 처리를 하거나 酵素濃度를 낮게 長時間 處理하는 것이 원형질막에 손상을 주지 않을 것으로 사료된다.

그림 3은 삼투압 안정제로써 mannitol 농도에 따른 원형질체 회수율 및 생존율을 나타낸 것이다.

생존율 間에는 거의 변이가 없었으며 原形質體 回收率은 0.6 M에서 가장 높게 나타났다. 그러나 0.5 M과 0.8 M에서는 급격히 감소되는 경향을 나타냈다.

효소조합에 따라 삼투압 안정제의 농도도 다르게 나타나는 보고가 많다. 한편 Ahuja(1983. 1984 b)는 너도밤나무와 *Populus tremula*에서 0.7 M의 mannitol을 사용하였고 Redenbaugh 等(1980)은 0.35 M의 mannitol과 0.35 M의 sorbitol을 處理했으며 Kobayashi 等(1983)은 감귤에서 삼투압 안

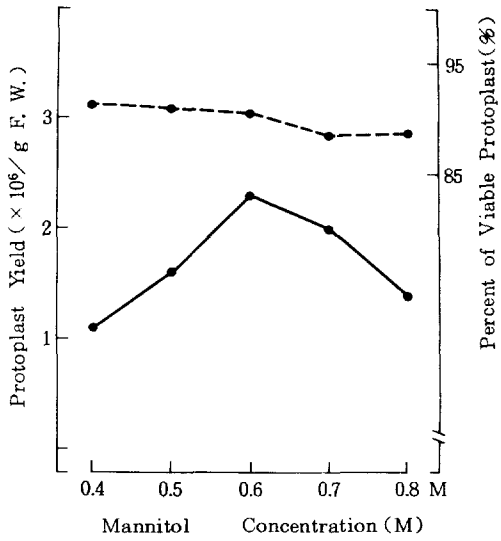

Fig. 3. The relation of protoplast yield (—) and viability (···) to mannitol concentration in enzyme solution

정제로써 0.15 M의 sucrose와 0.45 M의 glucose를 이용하였다. 본 연구의 결과 0.6 M은 감귤에서 사용한 것과 같은 농도로써 너도밤나무나 포푸라의 0.7 M 보다는 낮은 농도를 나타냈다. 이와 같은 결과는 사용하는 시료의 종류에 따라 삼투압 조절제의 효과가 달라질 뿐 아니라 處理하는 酵素種類와 첨

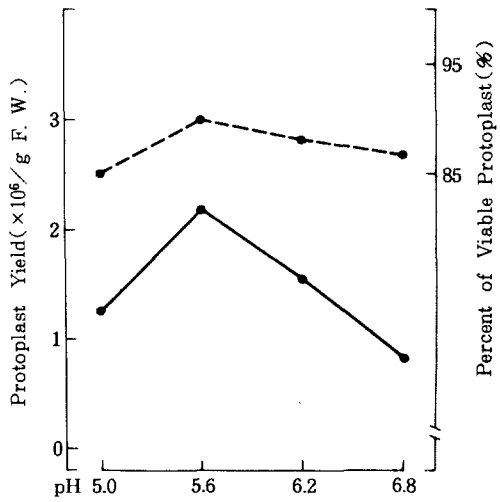

Fig. 4. The relation of protoplast yield (—) and viability (···) to pH of enzyme solution.

가물질에 따라 서로 다르게 나타남을 보여주고 있다고 생각된다.

그림 4에는 酵素溶液의 pH에 의한 영향을 나타낸 것이다.

4가지 처리중에 pH 5.6일 때 가장 많은 原形質體가 유리되었으며 pH 5.0이나 pH 6.8일 때는 급격히 그 수율이 떨어졌다. 林木의 경우 대부분이 pH 5.5～5.7을 사용하였으며 본 연구의 결과도 비슷하게 나타났다. 酵素溶液內 DTT와 MES의 첨가 효과는 그림 5와 같다.

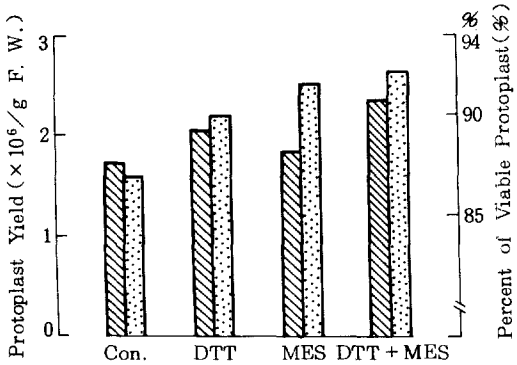

Fig. 5. The effect of DTT and MES buffer on protoplast yield (▨) and viability (⊡)

DTT나 MES 단독처리구 또는 복합처리구에서는 처리하지 않은 대조구에 比해 原形質體 分離收率이 증가하였는데 단독처리구보다 복합처리한 구에서 효과가 크게 나타났다.

林木의 葉에는 많은 量의 phenol 性 物質이 함유되어 있어서 이들이 산화하면 산성화되어 원형질체 분리 및 배양에 영향을 주게 되므로 SH基 보호제로써 DTT와 pH 안정제로써 MES buffer의 첨가효과가 높은 것으로 보고된 바 있다(齊藤, 1985).

表 3에는 原形質體 정제時 浮遊溶液內 sucrose 濃度別 効果를 나타낸 것이다.

0.4 M부터 0.8 M 사이의 5단계 sucrose 溶液에 處理한 결과 原形質體 回收率은 0.6 M일 때 51.8 %로 가장 높게 나타났으며 0.4 M과 0.5 M에서는 45～46 %, 0.7 M과 0.8 M에서는 27～31 %의 낮은 回收率을 나타냈다. 그러나 生存率은 거의 差異가 없게 나타났는데 0.6 M일 때 94.9 %로 가장 높게 나타났다.

Table 3. Effect of several sucrose concentrations in floating solution on protoplast purification

Factors \ Sucrose con.	0.4M	0.5M	0.6M	0.7M	0.8M
Density ($\times 10^6$)	3.9	3.8	4.4	2.3	2.6
Viability (%)	89.7	91.8	94.9	92.3	89.8
R. Rec.* (%)	46.6	45.5	51.8	27.5	31.2
R. Deb.** (%)	1.8	2.7	2.2	3.1	4.0

* R. Rec. : Rate of recollected protoplasts
** R. Deb. : Rate of debris

이상의 결과를 요약해 볼 때 무균적으로 배양한 葉肉組織에서의 原形質體 유리 方法은 균일한 시료를 무균적으로 大量培養하기 위해 먼저 잠아를 배양한 다음 multiple shoot用 培地로 옮겨야 하는데 이때 가장 적합한 것은 0.1 mg/ℓ의 BAP를 함유한 MS 基本培地였으며, 葉의 展開를 위해서는 호르몬이 함유되지 않은 1/2 MS 培地를 이용하였다.

본 硏究에 사용된 酵素조합인 Cellulase 2.0 %, Macerozyme 0.4 %, Hemicellulose 1.2 %, Driselase 2.0 %, Pectolyase Y-23 0.05 %를 사용하였을 때 가장 높은 分離率을 나타냈는데 이 중에서도 Cellulase의 농도가 중요한 要因이였으며 Cellulase의 농도와 Macerozyme의 농도가 높을수록 생존율은 감소하였다. 또한 삼투압 조절제인 mannitol

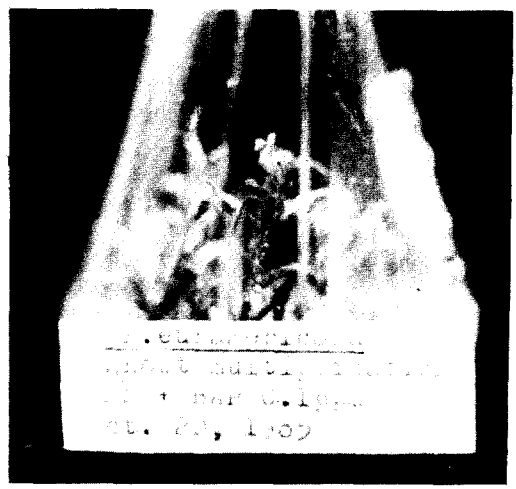

Fig. 6. Shoot multiplication on MS medium with 0.1 mg/1 BAP

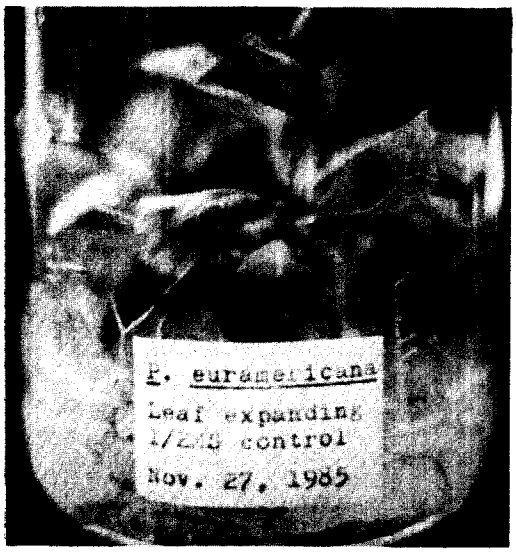

Fig. 7. Leaf expanding on 1/2 MS medium without phytohormone

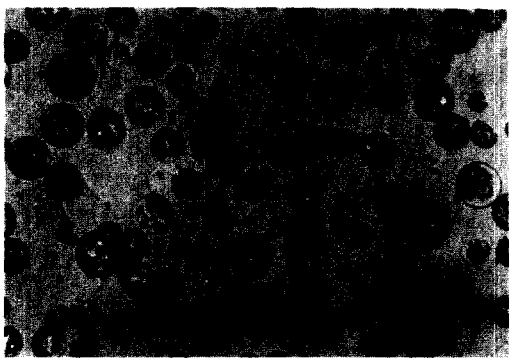

Fig. 8. The mesophyll protoplasts isolated from *Populus euramericana* cv. I-214

의 농도에 따라 原形質體 分離率이 크게 달랐으며 0.6 M의 mannitol에서 가장 크게 나타났다. 효소용액의 pH는 5.6일 때 가장 좋은 효과를 나타냈으며 SH基 보호제로써의 DTT와 pH 안정제인 MES의 첨가효과도 큰 것으로 나타났다.

본 연구는 이태리포푸라의 器內培養한 葉肉組織에서 原形質體 分離를 위한 몇가지 要因을 調査한 것으로 앞으로 原形質體 培養 및 callus 유도와 再分化를 위한 기초자료를 제공할 것으로 기대된다.

引 用 文 獻

1. Ahuja, M. R. 1983. Somatic cell differentiation and rapid clonal propagation of aspen. Silvae Genetica 32: 131-135.
2. Ahuja, M. R. 1984a. Protoplast research in woody plants. Silvae Genetica 33: 32-36.
3. Ahuja, M. R. 1984b. A commercially feasible micropropagation method for aspen. Silvae Genetica 33: 174-176.
4. Ahuja, M. R. 1984c. *In vitro* induction of organogenesis in juvenile and mature beech. Silvae Genetica 33: 241-242.
5. Chun, Y. W. 1985. Isolation and culture of Italic cultured *Populus alba* × *P. grandidentata* protoplast. J. Korean For. Soc. 71: 45-49.
6. David, A. and H. David. 1979. Isolation and callus formation from cotyledon protoplasts of pine *(Pinus pinaster)*. Z. Pflanzenphysiol. 94: 173-177.
7. George, E. F. and P. D. Scherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture. 307pp. Exegetics Ltd.
8. Hackman, I. C. and S. von Arnold. 1983. Isolation and growth of protoplasts from cell suspensions of *Pinus contorta* Dougl. ex Loud. Plant Cell Rep. 2: 92-96.
9. Huhtinen, O. and L. Winton. 1973. Cell and tissue culture for production of haploid, polyploid and clonal propagation. pages 1-12, *in* IUFRO Workshop for methods in biochemical genetics of forest trees. Gottingen. Germany.
10. Hyun, J. O., J. H. Kim. and S. S. Chang. 1985. Studies on factors affecting isolation and fusion of protoplasts of Italic species. Jour. Korean For. Soc. 71: 66-73.
11. Kim, J. H., S. K. Lee. and Y. W. Chun. 1981. Mass propagation of tree species through Intalic culture. I. Bud culture of *Populus alba* × *P. glandulosa* F_1. Res. Rep. Inst. For. Gen. Suwon, Korea. 17: 57-64.
12. Kobayashi, S., H. Uchimiya. and I. Ikeda. 1983. Plant regeneration from 'Trovita' Orange protoplast. Japan. J. Breed. 33: 119-122.
13. Mathes, M. C. 1964. The culture of isolated triploid aspen tissue. For. Sci. 10: 35-38.

14. Park, Y. G. and K. H. Han. 1986. *In vitro* shoot multiplication, isolation and culture of protoplasts from *Populus alba* × *glandulosa*. J. Korean For. Soc. 73: in press.
15. 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.
16. Rona, J. P. and C. Grignon. 1972. Obtention de protoplasts a partir de suspension de cellules d' *Acer pseudoplatanus* C. R. Acad. Sci. D. 247: 2976-2979.
17. 齋藤明. 1976. キリとポプラの葉肉細胞からのプロトプラストの分離. 日林誌. 58: 301-305.
18. 齋藤明. 1985. 林木育種とバイオテクノロジー. 農業および園藝 第60卷 第1號: 193-199.
19. Sato, T. 1981. Effects of the amount of NH_4-NO_3 and the concentration of zeatin on shoot formation in aspen callus cultures. J. Jap. For. Soc. 63: 46-50.
20. Strmen, J. and M. Cierna. 1981. Cell wall regeneration of the spruce *(Picea excelsa)* tissue culture protoplasts. In: Collegue International Sur la culture *"In vitro"* des Essences Forestieres, AFOCEL, Nangies, France pp. 355-359.
21. Vardi, A., P. Spiegel-Roy. and E. Galun. 1975. *Citrus* cell culture: Isolation of protoplasts, plating densities effect of mutagenes and regeneration of embryos. Plant Science Letters 4: 231-236.
22. Vardi, A., P. Spigel-Roy, G. Ben-Hayyin. and E. Galun. 1982. Protoplast derived plants and fusion experiments in different *Citrus* species. Pages 619-620 *in* A. Fujiwara ed. Plant tissue culture, Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture.
23. Winton, L. L. 1970. Shoot and tree production from aspen tissue cultures. Amer. J. Bot. 57: 904-909.