

수원포플러와 구아디 포플러 原形質體 融合에 의한 體細胞雜種體 誘導¹

박용구² · 김정희³ · 손성호⁴

Induction of Somatic Hybrid by Protoplast Fusion between *Populus koreana* × *P. nigra* var. *italica* and *P. euramericana* cv. *Guardi*¹

Young Goo Park², Jung Hee Kim³ and Sung Ho Son⁴

ABSTRACT

Protoplasts isolated from leaf mesophyll tissues of *Populus koreana* × *P. nigra* var. *italica* were fused with those of *P. euramericana* cv. *Guardi*. Well expanded healthy leaves of 5 to 7 week-old-plantlet grown *in vitro* were used as source materials. Leaves from *P. koreana* × *P. nigra* var. *italica* and *P. euramericana* cv. *Guardi* were digested in enzyme solution I (2.0% Cellulase, 1.2% Hemicellulase, 0.4% Macrozyme, 2.0% Driselase, 0.05% Pectolyase ; w/v) and enzyme solution II (1.0% Cellulase, 1.2% Hemicellulase, 0.4% Macrozyme, 2.0% Driselase, 0.05% Pectolyase ; w/v), respectively. The highest frequency of fusion among the protoplasts originated from the two source materials was approximately 21% using 40% PEG or 15% dextran. In addition, fusion frequency was enhanced by incorporating 30mM of Ca²⁺ in eluting solution at pH 10.5. Dividing cells and/or mini-calli were obtained by culturing the fusion products in a liquid 8p-KM medium supplemented with 0.6M sucrose, 0.45μM 2,4-D, and 0.5μM BA. Shoots were regenerated from the fusion product-derived calli after culture on MS medium containing 5.0μM zeatin. To verify the putative hybrid or cybrid, SDS-PAGE was carried out. From the 24 regenerants, just two plants showed intermediate protein band patterns compared with those of the original source plants.

Key words : poplar, protoplast fusion, putative hybrid and/or cybrid

I. 緒 論

林木에 있어서 原形質體融合의 窮極的 目的은 樹種이 서로 다른 細胞를 融合하여 有用한 形質을 가진 雜種細胞에서 새로운 個體를 創出해 내는데 있다. 따라서 原形質體融合의 對象樹種은 原形質體培養에 의해 再分化 및 脫分化가 성공적

으로 誘導될 수 있는 樹種이어야 한다.

林木의 原形質體 培養에 있어서 再分化에 성공한 例는 많지 않으나 Oka와 Ohyama(1985)는 뽕나무의 成熟葉에서, Vardi 등(1982)은 柑橘에서, Russell과 McCown(1986)은 *Populus alba* × *P. grandidentata* 葉肉組織에서, Sticklen 등(1986)은 *Ulmus* "Pioneer"의 callus에서 原形質體를 分離, 培養하여 植物體 再分化를 報告한 바

¹ 接受 1992年 5月 26日 Received on May 26, 1992.

² 慶北大學校 林學科 Dept. of Forestry, Kyungpook Natl. Univ., Taegu 702-701. Korea.

³ 慶南林業試驗場 Gyeongnam Forest Research Institute, Chinyang-Gun, Gyeongnam 663-870, Korea.

⁴ 林木育種研究所 Institute of Forest Genetics, Suwon 440-350. Korea.

있다. 또한 우리나라에서는 *Populus alba* × *P. glandulosa* (朴과 孫, 1988), *Populus glandulosa* (朴 등, 1990), *Populus nigra* (李 등, 1987), *Populus nigra* × *P. maximowiczii* (Park and Son, 1992)에서 個體分化에 成功한 報告가 있다.

林木의 原形質體 融合에 관한 報告로는 Saito (1980)가 타이완 오동나무와 이태리 포플러에서 原形質體를 分離, 融合하여 兩種의 融合細胞를 誘導하는데 成功하였으나 再分化는 失敗한 바 있고, *Citrus*屬에 속하는 樹種의 原形質體를 融合시켜 植物體를 再分化시킨 것(Ohgawara et al., 1990)을 除外하고는 林木의 原形質體 融合을 통해 個體分化에 成功한 例는 報告된 바 없다.

本 實驗에 사용된 수원 포플러(*Populus koreana* × *P. nigra* var. *italica*)와 구아디 포플러(*P. euramericana* cv. *Guardi*)는 아직까지 原形質體 分離 및 融合에 대해 報告된 바 없으며 수원 포플러는 최근 林木育種研究所에서 산지실형 중에 있는 形質이 優秀한 種間交雜種이며 구아디 포플러는 포플러 病害蟲 중 가장 많은 被害를 입히는 포플러 落葉病(*Marssoniana brunnea*)에 강한 것으로 알려져 있다.

本 研究는 이들 두 樹種을 對象으로 性的交雜

法이 아닌 體細胞 融合에 의해 新種을 創出해 내는데 있으며, 이 研究의 結果는 組織培養 및 原形質體 培養이 어려운 林木에 대해 原形質體 融合에 의한 個體를 얻어냄으로서 林木育種의 發展에 새로운 契機가 될 것으로 期待된다.

材料 및 方法

植物 材料

수원포플러 및 구아디 포플러의 當年생 가지를 採取하여 잎을 除去하고 2-3cm 크기로 調製하여 70% 에탄올에 1분, 5% sodium hypochlorite (NaOCl)에 5분, 5% hydrogen peroxide(H₂O₂)에 5분간 消毒하고 滅菌水로 완전히 水洗하여 表面 殺菌한 후 수원 포플러는 BA 0.5μM, 구아디 포플러는 BA 2.0μM이 含有된 MS(Murashige and Skoog, 1962)培地에 置床하여 大量增殖시킨 다음 1/2 MS배지에 繼代培養하면서 展開된 잎을 原形質體 分離에 이용하였다.

原形質體 分離

酵素溶液으로 處理하기 前 1/2MS培地에서 完全히 擴張된 잎을 하루동안 暗狀態에 두었다. 原形質體 分離에 사용한 酵素溶液 組合은 표 1과

Table 1. Composition of enzyme solutions for protoplast isolation from *P. koreana* × *P. nigra* var. *italica* and *P. euramericana* cv. *Guardi*.

Reagent	Enzyme solutions % (w/v)			
	I	II	III	IV
Enzymes				
Cellulase Kinki, Yakult Ltd., Jaoan	2.0	1.0	2.0	1.0
Hemicellulase Sigma Chem. Co., USA)	1.2	1.2	1.2	1.2
Macerozyme(Kinki, Yakult Ltd., Japan)	0.4	0.4	0.4	0.4
Driselase Kyowa Hakko, Japan)	2.0	2.0	2.0	2.0
Pectolyase Seishin Ltd., Japan)	0.05	0.05	0.05	0.05
Minerals(mM)				
Calcium chloride, dihydrate			1.0	
Potassium dihydrogen phosphate			0.5	
2-N-morpholino) ethanesulfonic acid			1.0	
Potassium citrate			0.5	
Calcium nitrate			0.5	
Magnesium sulfate			0.5	
Bovine serum albumin(mM)			0.5	
Potassium dextran sulfate(mg/100ml of D.W. *)			100.0mg	
Osmotica(M)				
Mannitol			0.6	
pH			5.6	

*D.W. : distilled water

갈다. 酵素溶液 10ml당 15-20개 잎을 處理하였으며, 28°C로 維持된 暗狀態의 水槽에서 9-10시간동안 定置한 후 54 μ m 나일론 mesh로 濾過시킨 다음 1,000rpm으로 5분간 遠心分離하여 상등액은 버리고 침전물을 水洗溶液으로 씻은 다음 回收하였다. 沈澱物을 소량의 0.6M mannitol溶液으로 희석한 다음 0.7M sucrose가 含有된 浮游液에서 500rpm으로 5분 원심분리하여 건전한 원형질체만을 모았다. 4가지 酵素溶液에서의 原形質體 收率은 hemocytometer로 調査하였다.

原形質體 融合

두 樹種의 葉肉組織 由來의 原形質體를 同量으로 섞어 plastic petri-dish의 중앙부분에 原形質體 混合液을 0.5ml 떨어뜨린 후 5분간 放置하여 原形質體가 가라앉게 하였다. 原形質體 混合液에 2배 가량의 融合溶液(0.5M glucose, 10mM CaCl₂ · H₂O, 0.7mM KH₂PO₄, 30% PEG, pH 5.8)을 添加하여 20분간 실온에 두었다. 融合처리된 原形質體 混合液에 稀釋溶液(100mM glycine, 0.4M glucose, 60mM CaCl₂ · H₂O, pH 10.5)을 添加한 뒤 5분후에 融合溶液과 稀釋溶液을 제거하고 培養培地로 水洗하였다. 두 樹種間의 融合頻度を 높이기 위해 融合誘導劑인 polyethylene glycol(PEG, MW : 1540)와 dextran(MW : 40,000)의 濃度(PEG : 20, 30, 40, 50%, dextran : 15, 20, 25%), 融合용액 처리시간(10, 20, 30, 40분), 稀釋溶液內 Ca²⁺의 濃度(30, 60, 90, 120, 150mM)와 pH(9.5, 10.5, 11.5, 12.5)에 따른 融合率을 調査하였으며, 融合率은 *P. koreana* × *P. nigra* 由來 原形質體를 0.6M mannitol, 140mM CaCl₂ · 2H₂O, 0.06% neutral red가 包含된 染色液으로 染色하여 融合시킨 후 顯微鏡下에서 調査하였다.

融合된 原形質體의 培養 및 植物體 再分化

融合處理된 두 樹種의 原形質體는 0.6M sucrose, 4.5 μ M 2,4-D, 0.5 μ M BA가 포함된 8 p-KM배지(Kao & Michayluk, 1975)로 稀釋하여 定置 혹은 震湯培養 하였다. 배양시기에 따른 培地內 滲透壓을 減少시키기 위해 0.4M sucrose가 包含된 培養培地를 添加하였다. 形成된 雜種 callus를 여러가지 生長調節物質(BA, kinetin, 2 ip, zeatin)이 含有된 再分化用 培地에 移植하여

植物體 形成率을 調査하였다.

雜種個體의 確認

雜種與否를 確認하기 위한 方法의 하나로써 再分化된 個體의 葉內組織을 이용하여 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)을 실시하였다. 일정량의 잎을 gel-loading buffer(sample : buffer=1 : 3 ; v/v)와 液體窒素가 든 주발에서 갈아서 100°C에서 약 3-5분간 끓인 다음 초원심분리를 하여 찌거기를 제거시켰다. gel상에서 蛋白質을 展開시키기 위해, 각 lane당 30 μ g의 蛋白質을 넣은 후 5% stacking gel이 혼합된 12% resolving gel에서 72mA로 약 8시간동안 泳動하였다. gel의 염색은 Coomassie Brilliant Blue로 하였으며 蛋白質의 size는 Rainbow™ molecular weight market (RPN 755 & 756, Amersham Crop, Arlington Hts, IL)를 사용하여 결정하였다.

結果 및 考察

原形質體 分離

4가지 酵素溶液(표 1)으로 수원 포플러와 구아디 포플러의 葉內組織에서 原形質體를 分離한 結果 수원 포플러는 酵素溶液 I에서 생체중량 1g당 4.04 × 10⁷개, 구아디 포플러는 酵素溶液 II에서 2.45 × 10⁷개로 가장 많은 原形質體가 分離되었다(표 2).

포플러를 비롯한 林木의 原形質體 分離에 있어서는 高濃度의 酵素溶液으로 단시간 處理하여 成功的으로 原形質體를 分離시킨 예가 많이 있으나 (Park & Han, 1986; 朴과 孫, 1986, 1988; Saito, 1976), 本 研究에 使用한 原形質體 分離 方法은 slicing과 震湯을 하지 않고 9-10시간 定置하여 成功的으로 原形質體를 分離하였다. 이 方法은 葉內組織을 칼로 흠집을 내지않을 뿐만 아니라 酵素溶液에 넣어 震湯을 하지 않음으로서 분리된 原形質體가 파손되는 것을 줄일 수 있어 높은 수율의 原形質體를 얻을 수 있었다. 朴 등 (1990)은 *P. glandulosa* 葉절편을 slicing과 震湯을 하지 않고 酵素溶液에 定置處理하므로써 많은 原形質體를 分離해 낸 바 있다. 本 실험에서는 原形質體 分離 時 滲透安定劑와 試料의 狀態가 原形質體 收率에 많은 影響을 미쳤다.

Table 2. Effect of enzyme combinations on protoplast yield from leaf mesophyll tissues of *P. koreana* × *P. nigra* var. *italica* and *P. euramericana* cv. Guardi.

Species	Types of enzyme solution			
	I	II	III	IV
<i>P. koreana</i> × <i>P. nigra</i> var. <i>italica</i>	4.04*	0.78	2.38	2.80
<i>P. euramericana</i> cv. Guardi	1.43	2.45	2.08	0.68

* Yield : (x 10⁷/g f.w.)

原形質體 融合

그림 1은 수원 포플러와 구아디 포플러의 原形質體 融合頻도를 높이기 위한 要因實驗의 結果이다. PEG 濃도가 40%일때, 그리고 dextran 濃도가 15%일때 각각 20.5%와 21.5%로 良好한 接合效果를 나타냈으며, PEG濃도가 增加함에 따라 양수종간 1:1 接合이 아닌 多數의 原形質體 接合이 높은 頻도로 나타났다. PEG 處理時間別 融合率은 20분 處理하였을때가 가장 높은 29.1%의 接合率을 나타냈으며, 處理時間이 40분 以上이었을때는 原形質體에 극심한 被害를 주어 接合率이 급격히 減少하였다. 融合誘導劑의 稀釋液內의 Ca²⁺농도와 pH도 融合率에 큰 影響을 미쳤는데, pH 10.5일때 두 수종간 1:1융합비율이 30, 60, 90mM에서 모두 30% 정도로 높았고, 120 mM이상에서는 다수의 原形質體間 融合이 상당히 많이 이루어졌다.

PEG를 이용한 原形質體의 融合方法은 植物의 原形質體融合에 매우 널리 使用되어지는 方法이다(Kao & Michayluk, 1974). 本 研究 結果 PEG 40%를 사용했을때가 가장 좋았는데 이러한 結果는 Willin 등(1974)이 報告한 것과 일치한다. PEG를 사용할 경우 回收가 容易하고 接合率은 높은 반면 原形質體에 미치는 유독성이 커서 융합 원형질체 배양이 어렵다고 알려져 있다. 따라서 融合誘導劑로 PEG를 사용할 경우 適正濃度의 選擇이 융합 원형질체의 生存에 중요한 因子로 思料된다. 한편 PEG의 有毒性 때문에 장시간 處理는 原形質體에 損傷을 입혀 原形質體 生存, 融合產物 培養 및 植物體 再分化에 惡影響을 미칠 수 있으므로 적정시간 處理가 중요하다. Kao와 Muichayluk(1974)은 *Vicia hajastana*와 *Pisum sativum*의 融合時 10-20분간의 處理를 報告한 바 있으며 이는 本 實驗의 結果와 一致한다.

稀釋液의 높은 pH 조건 또한 細胞膜間의 인지

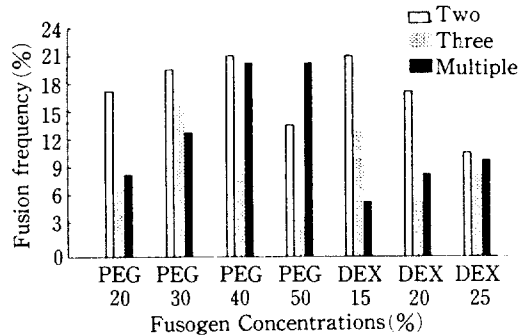


Fig. 1. Fusion frequency of mesophyll protoplasts between *P. koreana* × *P. nigra* var. *italica* and *P. euramericana* cv. Guardi by PEG and dextran treatment.

질 形成을 促進하여 原形質體 融合率을 增加시킬 수 있으며(Kao, 1980), 稀釋液의 첨가제인 Ca²⁺이온은 PEG와 結合하여 陰電荷를 띠는 原形質體間에 다리를 形成시켜 融合率을 높이는데 效果의 이라고 알려져 있다(Keller & Mekchers, 1973).

融合產物の 培養 및 植物體 再分化

融合된 原形質體는 0.6M sucrose, 4.5μM 2, 4-D, 0.5μM BA가 包含된 8p-KM 培地에 培養하였다. 8p-KM 培地는 여러종류의 vitamine과 아미노산을 함유하여 原形質體의 生育에 좋은 影響을 미치는 것으로 사료된다. 탄소원과 삼투안정제로 使用된 sucrose는 一般的으로 原形質體 培養에 適合하지 않다고 알려져 있지만 本 研究에서는 sucrose를 사용하여 活力있는 原形質體와 倂거기를 分離시키므로써 原形質體의 生長을 促進시킬 수 있었다. 이러한 結果는 다른 포플러 樹種인 *P. glandulosa*의 原形質體 培養에서 報告된 바 있다(朴 등, 1990). 培養初期에는 5cm falcon petri-dish에서 liquid planting 方法으로 培養하였으며, 培養 2-3일 후 細胞分裂이 시작되었고 2주후에 세포괴를 觀察할 수 있었다. 세포

Table 3. Effect of cytokinins on shoot regeneration from fusion product derived calli

Conc. (μ M)*	Number of shoots per callus***			
	BA	2ip	Kin	Zea
0.0	0.0 ^{d**}	0.0 ^d	0.0 ^b	0.0 ^g
2.5	0.0 ^d	0.0 ^d	0.0 ^b	0.0 ^g
5.0	0.1 ^c	1.9 ^a	0.2 ^a	4.0 ^a
7.5	0.4 ^b	0.0 ^d	0.1 ^a	3.8 ^b
10.0	1.1 ^a	0.2 ^c	0.0 ^b	2.2 ^c
12.5	0.2 ^{bc}	0.0 ^d	0.0 ^b	1.0 ^d
15.0	0.0 ^d	0.0 ^d	0.1 ^{ab}	0.0 ^g
17.5	0.0 ^d	1.2 ^b	0.0 ^b	0.2 ^f
20.0	0.0 ^d	3.1 ^a	0.0 ^b	0.4 ^{ef}

* All treatments contained 0.05 μ M IBA.

** Means with each column followed by different letters are significantly different at 1% levels, followed by the Duncan's Multiple Range Test.

*** Three pieces of calli (ca. 3cm in diameter) were assigned to conic flask with 3 replications (Data were collected after 8 weeks of culture).

과에서 Mini-callus로의 발달을 위해 petri dish를 회轉震湯器에서 低速(40rpm)으로 震湯培養하였으며, 0.4M sucrose가 포함된 8p-KM 培地를 添加하여 培地內 滲透壓을 減少시켰다. Mini-callus는 培養 2달후에 켈러스를 형성하였다. Mini-callus의 震湯培養은 세포의 凝集을 원활히 해줌으로서 細胞生長을 促進한 것으로 사료된다.

形成된 雜種 켈러스를 cytokinin과 auxin이 含有된 MS배지에서 植物體 再分化를 誘導한 結果는 表 3과 같다. 各 生長調節物質 處理區에서 植物體가 再分化되었으나 5.0 μ M zeatin 處理區에서 가장 많은 줄기가 發生하였다. zeatin은 雜種 原形質體 由來 켈러스에서 식물체로서 재분화에 효과적이었는데, 朴 등(1990)은 수원사시나무의 葉肉組織 由來 켈러스에서 7.5 μ M의 zeatin을 처리하여 植物體 再分化를 誘導한 바 있다.

雜種個體의 確認

融合産物에서 再分化된 植物體의 雜種性 與否를 알아보기 위해 SDS-PAGE를 實施하였다(그림 2. H). 全體 24개의 分化個體 中 밴드형에 비교적 差異가 있는 5개체의 단백질 분리형을 나타냈다. 수원 포플러와 구아디포플러의 中間型을 나타내는 것은 5個體 中 I, II, III lane이며 이들은 融合産物에서 再分化된 雜種個體로 推定된다. 그러나 IV, V lane은 두 樹種의 中間型이 아닌 수원포플러와 비슷한 밴드형을 보여 수원포

플러 원형질체에서 再分化된 個體들로 推定된다. SDS-PAGE에 의한 蛋白質分離型으로 보아 두 樹種의 中間型을 보이는 個體는 일단은 雜種植物體라고 推定할 수 있지만 再分化 個體들의 確實한 根源을 밝히기 위해 此後 形態學的 및 遺傳學的인 기초연구가 더 必要할 것이다.

摘 要

有望 速成樹로 開發中인 수원포플러(*P. koreana* × *nigra* var. *italica*)와 포플러 落葉病에 耐性을 가진 구아디포플러(*P. euramericana* cv. *Guardi*)의 葉肉組織에서 原形質體를 分離 融合하여 雜種植物體를 生産하였다.

實驗材料인 수원포플러는 BA 0.5 μ M, 구아디포플러는 BA 2.0 μ M 處理된 MS 培地에서 大量 增殖시킨 후 1/2 MS배지에서 繼代培養하여 展開된 葉組織을 使用하였다. 수원포플러는 酵素溶液 I (Cellulase 2.0%, Macerozyme 0.4%, Hemicellulase 1.2%, Driselase 2.0%, Pectolyase 0.05%)에서 구아디포플러는 酵素溶液 II (Cellulase 1.0%, Macerozyme 0.4%, Hemicellulase 1.2%, Driselase 2.0%, Pectolyase 0.05%)에서 原形質體를 分離하여 각각 4.04×10^7 , 2.45×10^7 개의 높은 收率을 얻었다. 兩樹種間의 原形質體 融合率은 PEG 40%가 包含된 融合溶液에 20분 處理하고 Ca^{2+} 30mM 添加된 稀釋液(pH 10.5)을 使用하였을때 兩樹種間 1:1 融合率이 30%정도로 높게 나타났다. 融合된 原形質體는 0.6M sucrose, 4.5 μ M 2, 4-D, 0.5 μ M BA가 添加된 8p-KM에서 定置 혹은 震湯培養하여 2개월후 켈러스를 얻을 수 있었으며, 5.0 μ M zeatin 處理區에서 평균 4개의 植物體가 再分化되었다. 融合産物에서 由來한 植物體의 雜種性 與否를 確認하기 위해 SDS-PAGE를 實施하였다. 母樹인 수원포플러와 구아디포플러간에는 단백질형에 差異가 있었으며 再分化 個體中 兩親의 中間型을 나타내는 個體는 細胞融合에 의한 再分化個體로 推定할 수 있었다.

謝 辭

本 論文은 「遺傳工學 技法을 利用한 高等植物의 形質轉換」에 對한 研究로써 1988년부터 1991

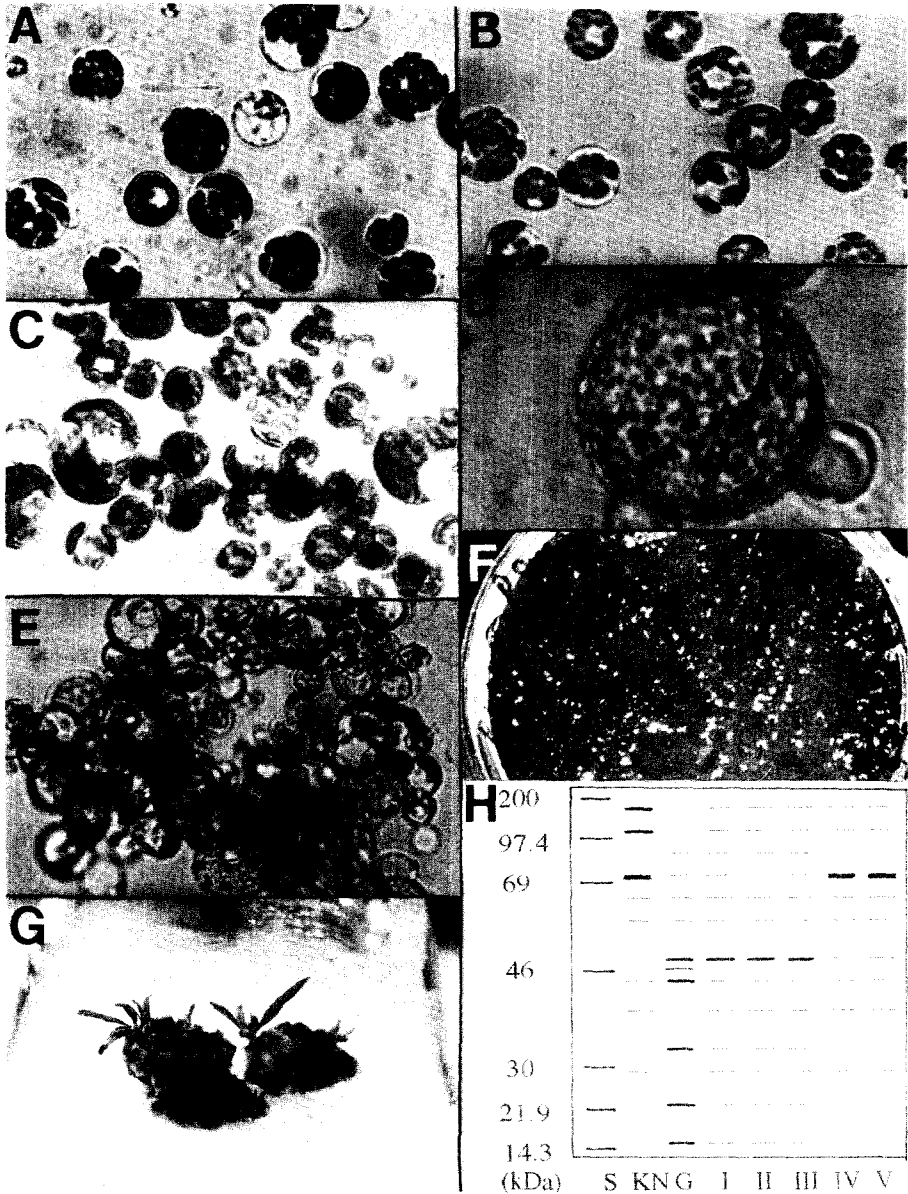


Fig. 2. Plantlet regeneration from fused mesophyll protoplasts between *Populus koreana* × *P. nigra* var. *italica* and *P. euramericana* cv. Guardi
 A. Isolated protoplasts from *P. koreana* × *P. nigra* var. *italica* (x100)
 B. Isolated propoplasts from *P. euramericana* cv. Guardi (x100)
 C. Fused propoplasts between *P. koreana* × *P. nigra* var. *italica* (stained by neutral red) and *P. euramericana* cv. Guardi (non-stained; x150)
 E. Colony formation from fusion products (x150)
 F. Callus formation from the colony
 G. Shoots regeneration on MS medium supplemented with 5 μM zeatin
 H. Coomassie Brilliant Blue stained SDS-PAGE gel of putative hybrid and/or cybrid
 S : standard molecular weight market KN : *P. koreana* × *P. nigra* var. *italica*
 G : *P. euramericana* cv. Guardi I-IV : putative hybrid and/or cybrid

년까지 3개년간에 걸쳐 韓國科學財團 目的基礎研究費에 의해 遂行된 研究임. 本 研究를 위해 培養實驗에 많은 도움을 준 慶北大學校 林學科 森林遺傳學研究室의 崔明錫, 許經 君과 鄭恩伊 嬢에게 感謝를 드립니다.

參 考 文 獻

1. Kao, K.N. and M.R. Michayluk. 1974. A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplast. *Planta* 115 : 355-367.
2. Kao, K.N. and M.R. Michayluk. 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajasthana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid medium. *Planta* 126 : 105-110.
3. Kao, K.N. 1980. Expression of foreign genetic material through protoplast fusion, through uptake of prokaryon cells and cell organelles. In : *Plant Cell Culture*. Elsevier/North Holland Biomedical Press, pp195-205.
4. Keller, W.A. and G. Mekchers. 1973. The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion. *Z. Naturforsch* 28 : 734-741.
5. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227 : 680-685.
6. 李載順·李錫求·張錫成·李延周. 1987. *Populus nigra*의 callus유래 원형질체로부터 식물체분화. *林育情報* 23 : 143-148.
7. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-479.
8. Ohgawara, T., S. Kobayashi, S. Ishii, K. Yoshinaga and I. Ohyama. 1990. Somatic hybridization in *Citrus* : navel orange(*Citrus sinensis* Osb.) and grape fruit(*C. paradisi* Macf.) *TAG* 78 : 609-612.
9. Oka, S. and K. Ohyama. 1985. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of *Brou-*

- sonetia kazinoki* Sieb(Paper mulberry). *J. Plant Physiol.* 119 : 455-460.
10. 朴龍求·孫聖鎬. 1986. 이태리포푸라 I -214엽육조직에서 원형질체 분리에 미치는 몇가지요인. *韓國林學會誌* 74 : 29-36.
11. Park, Y.G. and K.H. Han. 1986. Isolation and culture of mesophyll protoplasts from *in vitro* cultured *Populus alba* × *glandulosa*. *J. Korean For. Soc.* 73 : 33-42.
12. 朴龍求·孫聖鎬. 1988. 현사시나무의 器內培養 葉肉組織에서 분리된 原形質體 培養 및 植物體 再分化. *韓國林學會誌* 77 : 208-215.
13. 朴龍求·崔明錫·金貞姬. 1990. 수원사시나무의 葉肉組織 由來 原形質體로부터의 植物體 再分化. *韓國植物組織培養學會誌* 17(3) : 189-199.
14. Park, Y.G. and S.H. Son. 1992. *In vitro* shoot regeneration from leaf mesophyll protoplasts of hybrid poplar(*Populus nigra* X *P. maximowiczii*). *Plant Cell Reports* 11 : 2-6.
15. Russell, J.A. and B.H. McCown. 1986. Culture and regeneration of *Populus* leaf protoplasts isolated from non-seedling tissue. *Plant Science* 46 : 133-142.
16. Saito, A. 1980. Fusion of protoplasts isolated from somatic cell of tree species. *Bull. For. Proc. Res. Inst.* 309 : 7-12.
17. Sticklen, M.B., S.C. Domir and R.D. Lineberger. 1986. Shoot regeneration from protoplasts of *Ulmus* "Pioneer". *Plant Science* 47 : 29-34.
18. Vardi, A., P. Spiegel-Roy, G. Ben-Hayyin and E. Galun. 1982. Protoplast derived plants and fusion experiments in different *Citrus* species. (ed.) A. Gujiwara, *Plant Tissue Culture*, Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture, pp.619-620.
19. Wallin, A., K. Glimelius and T. Eriksson. 1974. The induction of aggregation and fusion of *Daucus carrota* protoplast by polyethylene glycol. *Z. Pflanzenphysiol* 74 : 64-80.