

有用樹種의 組織培養에 關한 研究^{*1}

金 在 生^{*2} · 李 三 變^{*3}

Studies on the Tissue Culture of Some useful woody species^{*1}

Jai Saing Kim.^{*2} · Sam Sup Lee^{*3}

In order to subtract the time and cost of propagation for inducing the haploid plants per each species. 500 anthers of late uninucleate microspore on early binucleate microspore stage of *Robinia pseudoacacia* (Fuel tree) *Punica granatum* (Ornamental tree). *Aleurites fordii* (Fatty tree) and *Styrax japonica* (Silvicultural tree) were cultured on the modified Murashige and Skoog's medium supplemented with Kinetin, 2,4-D and NAA as growth regulators.

And I observed the samples of cultured anthers under the microscope which were made by Microtoming method and Paraffin method.

The results were summarized as follows:

- 1) Among 500 cultured anthers per each species, anther numbers inducing the diploid callus were as follow: *Styrax japonica* 20 (4% for the species total); *Aleurites fordii* 10 (2% for the species, total) and *Punica granatum* 45 (9% for the species total) were showed.
- 2) 2n Callus were induced from anther wall, but haploid callus were induced from anther locule.
- 3) Haploid callus were induced only in 25 anthers (5% for the species total) of *Robinia pseudoacacia*.
- 4) These haploid callus were not originated from body cell of anther wall tissue, but from reduced microspores,
- 5) Since already reported many herbaceous haploid plants were induced from the callus which were originated from reduced microspores, I conclude that the anther of woody plant which induced the haploid callus also will be cultured haploid plant.

Energy 資源이 될 수 있는 油脂樹木인 油桐과 造景資源이 될 수 있는 石榴나무 및 壞죽나무, 國土綠化 및 速成燃料資源이 될 수 있는 아카시아나무等 4樹種에 對하여 種子와 苗木生產에 必要한 時間과 經費를 節減시킬 目的으로 半數體植物을 誘起시키고자 1~2核性小孢子期의 藥을 Kinetin과 2,4-D, NAA等의 生長促進物質을 添加한 Murashige and Skoog's medium에다 培養하였던 바 다음과 같은 結果를 얻었다. 여기에서 培養된 材料는 Paraffine method와 Microtoming method에 依하여 標本을 만들어 檢鏡하였다.

1. 各樹種別로 각각 500個씩의 藥을 接種하여 培養한 結果 2n Callus가 發生된 것은 *Styrax japonica*에서 20個(全體의 4%), *Aleurites fordii*에서는 10個(全體의 2%), *Punica granatum*에서는 45個(全體의 9%)가 發生되었다.
2. 2n Callus는 藥壁組織에서 생기고 半數性 Callus 만은 藥腔의 内部에서만 생겨나왔다.
3. n Callus는 *Robinia Pseudoacacia*에서만 25個(全體의 5%)가 發生되었다.
4. 이들 半數性 Callus의 組織의인 發生起源은 모두가 다 藥壁組織由來의 體細胞性 Callus가 아니고

*1. Received for publication on July 20, 1979.

*2. 慶尙大學, Gyeong Sang National University.

*3. 서울 大學校農科大學 College of Agriculture, Seoul National University

還元性小胞子 由來의 Callus였다.

5. 只今까지 報告된 바 있는 一年生草本의 半數體植物들이 誘起된 Callus들도 모두가 다 이와 같은 莖腔內에서 小胞子가 變化되어 多核小胞子와 多細胞體로 變化되어서 誘起된 것이었기 때문에 *Robinia pseudoacacia*에서 半數體植物이 誘起될 것이 確實하다.

緒論

植物體의 組織培養이라하면 多細胞로 된 植物體의 器管과 組織 또는 細胞들을 植物體에서 摘出하거나 分離시켜서 綜合營養分이 들어있는 Medium에서 培養하여 Callus를 誘起시키든가 또는 植物體가 器管의 Callus를 原來의 組織片에서 直接分化시키는 一連의 作業을 말하는 것인데 植物性의 器管은 大量의 細胞와 組織으로서 有機的으로 모여 統一되어 있기 때문에 이와 같은 組織培養이 可能하게 되는 것이다. 따라서 組織培養의 目的是 植物體의 뿌리나 茎, 花봉우리나 胚乳等을 培養하여 幼植物體를 誘起 시킬 수 있어야 하는 것이다.

그런데 以上에서 言及한 바 있는 組織培養에 關한 研究活動은 Haberlandt⁵⁾가 報告한 以來 많은 國內外의 研究陣들에 依하여 Callus가 形成 되었다든지 形成된 그 Callus에서 幼植物體가 誘起發生 되었다고 하는 報告等이 있다.

그리고 이 중에서도 特히 最近에 와서 植物體의 有性繁殖器管의 하나인 成熟花蕾內의 花粉을 所定 Medium內에 移植培養하여서 Callus나 幼植物體等의 多細胞體를 誘起시킨 例가 있다.

即 *Gingko biloba*⁶⁾에서 多細胞 Callus等이 出現 된 바 있았고 *Taxus brevifolia*⁷⁾에서 花粉의 肥大現狀과 異狀分裂이 일어 났으며 *Brassica oleracea* × *Brassica alcoagra*의 F₁花粉에서 Callus가 形成¹⁵⁾ 되었다는 報告가 있지만 이와 같은 組織培養에서는 半數體는 誘起되지 않았다. 그런데 그後 Guha and Maheshwari⁹⁾는 *Datura innoxia*의 組織中의 하나인 莖을 培養해서 半數體植物을 誘起하는데 成功하였고, 中田, 田中³⁴⁾는 *Nicotiana tabaccum*에서 新關·大野²⁷⁾는 Rice에서 韓·高^{7~10)}는 *Solanum nigrum*에서 Kameya and Hinata¹⁶⁾는 *Brassica*의 莖組織을 培養하여 각각 半數體植物을 作出하는데 成功하였고 金^{18~21)}은 木本植物인 *Prunus armeniaca*¹⁸⁾와 *Paeonia Suffruticosa*¹⁹⁾, *Paeonia albiflora*²⁰⁾等의 莖組織을 培養하여 Haploid Callus를 誘起시키는데 成功한 바 있다. 이와 같이 組織培養에 關한 技術이 充分히 開發되면 自殖性植物의 育成에서는 F₁世代에 各種因子의 花粉의 種類와 同數의 半數體가 생

길 것이고 이것을 倍加하여 多個體를 만들 어 넸수 있으므로 純系로 短時日에 固定할 수 있어서 育成世代가大幅縮減될 수 있을 것이다. 또한 他殖性植物에서는 F₁種子生產의 母體를 Homo狀態로 만들어 수 있기 때문에 優良하고 同一한 F₁種子를 만들 수 있고 自殖劣勢植物에서는 純化하기 爲한 反復自殖을 할 必要가 없으며 因子가 Homo인 繁殖植物도 Homo狀態로 만들어 Hetero에 依한 強勢한 새 個體를 만들 수 도 있을 것이다.

이와같이 最近 國內外 學界에서 莖組織의 培養에 對한 觀心이 漸次高調되어 가고 있고 重要視되어 가고 있음을 謂만아니라 이 技術이 開發되었을 때 가져오는 利得은 產業的으로 보아 큰 意義를 가지고 있는 것이다.

따라서 只今까지 생긴 植物體의 大部分이 體細胞由來의 것이었고 還元小胞子에서 植物體가 誘導된 小胞子起源의 半數體育成에 成功된 것은^{8, 9, 10, 13, 16)} 草本植物과 一部의 木本植物에 不過하였다.

따라서 筆者等은 供試樹種으로서 4種의 木本植物의 莖組織을 培養하여 半數體植物을 誘起시켜 가장 短時日內에 急進의으로 大量의 幼苗를 增殖시킬 뿐만 아니라 林木의 種子生產에 對한 時間과 努力, 經費등을大幅의으로 節減시켜 現下 우리나라의 綠色產業開發에 寄與할 目的으로 이번에는 Energy 資源開發에 寄與될 수 있는 油脂樹木과 造景資源이 될 수 있는 花木類와 燃料資源樹種等을 材料로 하여 有用樹木類의 莖組織을 培養하여 보았던 바 몇가지의 結果를 얻었기에 여기에 報告하는 바이다.

研究史

高等植物 特히 林木은 多數의 細胞가 모여서 組織을構成하고 또 이 組織이 모여서 器管을 形成하여 有機的으로 統一된 植物體를 만들고 있다.

植物의 器管이나 組織을 器內에서 培養하고자 試圖한 것은 19世紀末부터 今世紀初에 限한 Vöchting, Rechinger Haberlandt等이었다. Vöchting (1978, 1892, 1906)는 植物의 組織片을 器內에서 培養하여 組織의 極性을 研究하려고 하였고 Rechinger (1893)는 Popular의 줄기와 사탕단풍나무, 민들레의 뿌리等을 濾過紙에 培養해서 Callus形成을 觀察하였다. 오늘날과 같은 現

正한 意味의 組織이나 細胞를 人工培地에서 培養할려고 한 것은 有名한 植物學者 Haberlandt(1902)이었다. 그는 *Tradescantia*의 葉肉, 表皮, 孔邊細胞, 수술의 텁, 細胞等을 人工培地에서 키울려고 努力하였지만 全部 失敗로 돌아갔다.

取扱材料도 構造의 으로나, 生理의 으로나 高度로分化 또는 特殊化된 細胞群이 되어 分裂能力이 없는 것을 썼다는 것도 있고 또 그當時에는 植物의 営養要求에 對한 知識이 極히 貧弱하였고 培養技術水準이 極히 낮았었기 때문이었다고 생각한다.

그後 1930年初까지 約 30年間 여러 사람들에 依한 組織培養의 努力은 많았지만 別로 進展이 없었다. 그동안의 特記할 만한 일은 1910年代에 哺乳動物의 組織培養이 血清, 胚, 細胞搾汁液等을 使用하여 成功되자 여기에 刺戟을 받아 植物學者들도 植物의 汁液이나 人工培地를 써서 培養해 볼려고 努力하였다.

오늘날 우리가 말하는 그런 意味의 組織培養이始作된 것은 美國의 White와 佛蘭西의 Gautheret부터인데, White(1932, 1934)는 Tomato의 뿌리를 蔗糖이나 無機鹽類等의 酵母抽出液等 添加한 人工培養地에서 長期間 繼代培養하는데 成功하였고 그後 約 30年동안 계속 研究하여 오늘날의 친환경 植物組織培養의 土臺을 構築하였다.

white와 때를 같이 하여 Gautheret(1932)는 줄기의 形成層部位와 柔組織等을 材料로 하여始作하였는데 이것은 오늘날의 真正한 意味의 組織培養에 該當된다고 생각된다. 그는 그後 數많은 論文을 發表하였다. 이 두사람은 모두 1960年代에 總說도 많이 썼는데 그것들은 오늘날 組織培養의 初學者에게는 百科事典과 같은 役割을 하고 있다. 이들의 業績을 여기서 그치지 않고 이들의 弟子, 追從者들에 依해 더욱 깊고 넓게 研究되었기 때문에 White와 Gautheret의 이름은 植物組織培養 分野에서는 永遠히 記憶될 것이라고 생각한다. 그리고 1930年代의 中, 末期에 Gautheret Nobecourt, White들이 각각 獨立의 으로 담배와 당근의 形成層의 長期培養에 成功하였는데 이 形成層에서 생긴 Callus系統들은 오늘날까지 살아있어 研究에 利用되고 있다. 또한 1940年代의 Callus培養은 1950年代에 들어와서 Steward派와 Torrey等이 이런 Callus에서 單細胞를 分離하여 細胞培養을 하기 시작하였고 Steward(1958)는 드디어 당근의 單細胞에서 個體를 만들어 냈다.

이것이 契機가 되어 Callus나 Callus由來의 單細胞에서 植物體를 分化시키는 研究가 1960年代에 活發히 進行되었다.

한편 1950年代에 Morel와 Holmes, Kassanis等은

Virus罹病의 無性繁殖球根植物에서 生長點培養에 依해 Virus-free stock를 만드는 方法을 開發하였는데 이것은 1960年代에 와서는 實用化되어 많은 球根花卉類와 채소에서 無毒植物을 쉽게 만들어 내게 되었다. 또한 1960年代初에 Morel은 洋蘭業界에 크게貢獻하였다. 그리고 1960年代의中期에는 印度의 Maheshwari의 後繼者들이 藥을 培養해서 花粉由來의 牛數體誘起研究가 活發히 進行되고 있다. 또한 最近 40年來 植物의 胚幼나 種子의 成熟胚를 培養하는 胚培養이 여러 가지 目的으로 實施되어 왔다. 胚培養은 200餘年前에도 試圖되었지만 實際로 이 技術이 開發된 것은 1920年代의中期에 와서 Laibach와 Jrgensen等에 依하여 이루어졌으며 1930年代에서 1940年代로 오면서 雜種種子를 얻는데 利用되기 始作하였다. 1940年代 末부터는 實際分野뿐 아니라 胚發生時에 物質代謝와 胚分化等의 基礎研究로 移行되었는데 Blakeslee는 처음부터 Tomato의 뿌리組織에서 原形質體를 分離해서 培養한 것이 契機가 되어 1970年을 前後하여 이러한 研究가 美國, Canada, 獨逸 其他 各國에서 漸次 많아져 가고 있다. 또한 white, Gautheret에서 基礎가 세워진 植物의 組織培養은 1950年代에서 1970年代까지는 爆發의 으로發展하여 培養對象이 된 植物의 種類數가 많아지고 새로운 培地나 培養方法의 開發 및 各 分野에의 基礎學研究의 實用度의 脣增, 培養材料와 目的의 多岐化等 多彩로 와서 結局 藥培養과 原形質體培養이라는 데까지 이르렀는데 이것은 모두 植物의 Callus나 細胞가 가지고 있는 全體形成技能이라는 奕력과 高等植物細胞를 微生物과 같이 取扱하여 研究材料로 쓸 수 있다는 事實等으로 研究人口가 最近 10餘年間에 急增된데 因因된다고 생각한다. 最近의 이 많은 研究者와 그들의 業績을 主要研究機關別로 紹介한다면 다음과 같다.

佛蘭西 Paris의 Laboratory of plant Biology에서는 Gautheret 派가 生理, 形態形成等을, Versailles의 Laboratory of Physiology에서는 組織培養의 開拓者の 한사람인 Morel이 生理, 病理等을 研究하고 있는데 前記한 氏의 Mericlon에 依한 洋蘭의 增殖은 有名하다.

Xheeve-sur-Yvette의 National Center of Scientific Research에서는 Nitsch가 営養 및 Auxin의 代謝等 生化學的研究를 하고 있다. 또한 美國의 Bar Harbor의 Jackson's Laboratory의 White에 對해서는 前記한 바와 같고 Cornell university의 steward가 이끄는 研究陣은 Coconut milk 其他 植物汁液의 成分研究를 하였으며 Wisconsin University의 Skoog一派에 依한 Kinetin의 發見과 Kinetin의 作用에 對한 研究는 後日 이 分野의 研究에 큰 刺戟이 되었고, 同大學의

Hildebrandt를 爲始한 植物病理研究陣에 依한 診斷, 遊離單細胞培養等은 有名하다.

Harvard University의 Torrey는 獨逸의 Reinert와 같은 高等植物의 細胞懸濁培養法을 쓴 바도 있다. 그리고 英國及 Canada에서는 Nottingham University의 Cocaing一派에 依해 原形質體의 培養, Canada, Saskatchewan의 Prairie Regional Laboratory의 研究陣들에 依해 廣範圍하게 研究되고 있는데 原形質體培養은 今後 更に 分野에 利用될 것이라고 생각한다. 印度에서는 Delhi University의 植物發生學者인 故 Maheshwari一派에 依해 有名한 子房內授粉, 試驗管授精, 藥培養에 依한 花粉由來의 半數體誘起等이 이루어졌다.

그리고 소련에서의 植物組織培養은 歷史도 長고 研究內容도 대단치 않으나 1950年代 末에서부터 1960年代初에 와서 組織培養이 이루어졌는데 이들은 대개 植物의 胚培養에 主力하고 있고 1960年 初까지에 보면 各種組織培養의 技術改善에 努力하고 있는 것 같다. 이와 같이 이들은 培養組織을 利用한 形態形成, 生理, 生化學, 診斷學等의 研究는 1960年代 中期까지도 活潑치 못했던 것 같다.

그런데 우리나라에서는 1950年代 末頃에 洋蘭, 벼等의 胚培養이 있었지만 所謂 近代 組織培養이 本格의 研究된 것은 1968年부터 緒言에서 列舉한 바와 같은 各種 一年生 草本植物과 一部의 木本植物에 있어서 藥培養을 試圖하여 半數體幼植物과 半數性 Callus가 誘起되었다고 하는 報告等이 있는데 특히 앞으로는 有用 木本植物에서의 半數性 Callus와 半數性幼植物體의 作成에 對한 成功을 期待하는 바가 더욱 크다고 하겠다.

材料 및 方法

材料로서는 Energy 資源이 될 수 있는 油脂樹木과 燃料 및 木材資源이 될 수 있는 燃料樹木, 食糧資源이 될 수 있는 有實樹와 造景資源이 될 수 있는 花木類等을 使用하였다. (Table 1.)

培養한 藥은 Uninucleate microspore期의 것을 廣尚大學構內와 晉州市內에서 採取(Table 2.)한 것을 70% Alcohol에 約 5秒동안 침적하였다가 곧 Calcium hypochloride에 10分間 滅菌한 後 殺菌水로서 셋고 培養基에 培養하였다. 培養基는 Modified Murashige and Skoog's medium을 基本培地로 하고 (Table 3.)여기에 Kinetin과 Auxin, 2,4-D等의 生長促進物質을 각각 3mg/l씩, 그리고 yeast Extract를 5,000mg/l 添加하여서 만들었다.

表 1. 材料 및 採集場所

Table 1. Materials and Location where they were collected.

Species	Location
<i>Styrax japonica</i>	Gyeongsang University
<i>Aleurites fordii</i>	Gyeongsang University
<i>Punica granatum</i>	Chinju City
<i>Robinia pseudoacacia</i>	Chinju City

表 2. 藥期 및 採集日字

Table 2. Stage of anthers and the dates they were collected.

Species	Collected date	Stage
<i>Styrax japonica</i>	May. 17	Uninucleate Microapore
<i>Aleurites fordii</i>	May. 20	Uninucleate Microapore
<i>Punica granatum</i>	June. 9	Uninucleate Microapore
<i>Robinia pseudoacacia</i>	May. 24	Uninucleate Microapore

表 3. 무라시-그와 스코-그스의 培養基

Table 3. Modified Murashige & Skoog's medium.

Component	mg/l	Component	mg/l
NH ₄ NO ₃	1,650.00	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.025
KHC ₈	1,900.00	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440.00	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370.00	Glycine	20.00
KH ₂ PO ₄	170.00	Nicotinic acid	5.00
Na ₂ -ELTA	74.60	Pyridoxine-HCl	5.00
FeSO ₄ · 7H ₂ O	56.60	Thiamino-HCl	201.00
H ₃ BO ₃	6.20	Inositol	30,200.00
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.30	Sucrose	20,000.00
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	10.60	Agar	8,000.00
KI	0.83		

또한 pH는 IN HCl과 IN NaOH로 調整하여 autoclaving 한後 6이 되도록 하였으며 花薑의 滅菌, 藥의 摘出, 接種等 모든 操作은 使用器具들을 alcohol lamp等에 無菌作業하였고 藥이 接種된 Test Tube는 平均 26°C의 Black chamber 내에서 培養하였다. 그리고 培養途中에 있는 小孢子와 藥組織의 變化狀態를 觀察하기 为하여 培養된 藥을 一定한 間隔으로 Microtoming method(Table 4.)와 Paraffine method (Table 5.)에 依하여 標本을 만들어 檢鏡하였다.

表 4 마이크로토一정의 過程과 方法

Table 4. Process of Microtoming Method.

Microtoming Method	Microtoming Method
1. Materials	2. Dryoven 37°C 48h.
3. Xylol I 30 min.	4. Xylol II 20 min.
5. Alcohol I 10 min.	6. Alcohol II 10 min.
7. 95% alcohol 10 min.	8. 90% alcohol 10 min.
9. 80% alcohol 10 min.	10. 10% alcohol 10 min.
11. Washing 30 min.	12. Iron alum riquied 30 min.
13. Washing 10-30 min.	14. Haematoxin 30 min.
15. Washing 10-30 min.	16. Iron alum destaining.
17. 70% alcohol 1 min.	18. 80% alcohol 10 min.
19. 90% alcohol 10 min.	20. 95% alcohol 10 min.
21. 100% alcohol I 10 min.	22. 100% alcohol II 10 min.
23. Car-Xylol 20 min.	24. Phenol xylol 20 min.
25. Xylol I 30 min.	26. Xylol II 30 min.

表 파라핀 법의 過程

Table 5. Process of paraffine method.

Paraffine	Method
1. Materials	
2. Fixation	
3. Water washing	
4. 30% alcohol	30 min.
5. 50% alcohol	30 min.
6. 70% alcohol	30 min.
7. 80% alcohol	30 min.
8. 90% alcohol	30 min.
9. 95% alcohol	30 min.
10. 98% alcohol	30 min.
11. al. Xylol I	30 min.
12. al. Xylol II	30 min.
13. Xylol soft paraffine I	2 h.
14. Xylol soft paraffine II	2 h.
15. Hard paraffine I	2 h.
16. Hard paraffine II	2 h.
17. Embedding	

結果 및 考察

各樹種의 培養藥과 小胞子의 變化狀態를 보면 接種한 날로부터 約 1週日頃이 되면 黑褐色으로 變化한다

그러나 培養한 4個樹種中 *Styrax japonica*는 淡黃色 그대로 變化되었고 *Punica granatum*은 濃濁色으로 變化하는 特徵이 있었는데 이와 같은 색깔에 對한 變色의 有無에 不拘하고 枯死되는 것은 하나도 없었으며 藥壁組織이나 藥絲의 細胞가 肥大하여 지면서 細胞分裂을 하게 된다.(Fig. 3.)

또한 이렇게 하여 分裂된 藥組織은 藥絲가 붙은 部分의 紡織이나 藥絲가 붙은 部分의 紡織이나 藥絲가 붙어 있는 縫合線인 藥隔組織에서 淡黃色 또는 白色의 Callus가 形成되기도 하며 藥腔內의 分裂된 紡織에서 도 Callus가 形成되어 急激히 增殖된다.(Fig. 4-6)

그런데 이때 培養當時의 藥組織(Fig. 2.)은 完全하며 纖維組織은 거의 消失되어 간다. 그리고 黑褐色이나 濃濁色等으로 變色된 藥은 大部分이 當初의 크기보다 約 4倍程度로 肥大하여지게 되는데 이와같이 肥大되는 理由는 그 肥大된 藥의 內部組織에서 Callus가 形成되고 小胞子들이 變化 또는 增殖되기 때문이라고 생각한다. 또한 培養後 約 2個月程度가 되면 藥의 縫合線에서나 藥壁組織에서 淡黃色의 Callus가 急激히 생기게 되는데(Fig. 1.) 이들의 Callus는 2倍性 Callus(2n Callus)와 半數性 Callus(n Callus)의 2種類였다. 그런 데 이중 2n Callus는 *Styrax japonica*와 *Aleurites fordii*, *Punica granatum*등의 花絲나 藥壁組織에서 나온 體細胞由來의 Callus였고 n Callus는 *Robinia Pseudoacacia*의 藥腔內部에서 發生된 小胞子由來의 Callus(Fig. 4)였다. 換言하면 Callus의 起源이 달랐었는데 (Fig. 3.6) 上述한 바와 같이 *Robinia Pseudoacacia*에서는 培養한 2個月 程度가 되면 藥의 被層에서 甚한 細胞分裂이 일어나서 多細胞花粉이나 多核小胞子等으로 分裂되어서 藥腔內部의 褊은 Callus가 紡織絲가 되기 때문에 이것이 即 Callus塊로 되어 튀어 나오게 되는데(Fig. 1.) 이것은 體細胞起源의 Callus가 아니고 小胞子由來의 半數性 Callus였으므로 이와같은 半數性 Callus는 *Solanum nigum*¹⁹⁾에서나 *Prunus armeniaca* *ansu*¹⁸⁾에서나 *Paeonia Suffruticosa*¹⁹⁾에서나 *Paeonia*

表 6. 各樹種의 藥에서 發生된 n과 2n Callus數

Table 6. The number of anther induced n and 2n Callus in each species.

Species	Number of inoculated	Number of 2n Callus	%	Number of n Callus	%
<i>Styrax japonica</i>	500	20	4	—	—
<i>Aleurites fordii</i>	500	10	2	—	—
<i>Punica granatum</i>	500	45	9	—	—
<i>Robinia pseudoacacia</i>	500	—	—	25	5

*albiflora*¹⁸⁾에서 나온 小孢子由來의 Callus와 꼭 같은 現象의 것이었기 때문에 틀림없이 半數體植物이 誘起되는 Callus라고 생각되며 各種藥에서 發生된 n 와 $2n$ Callus의 數는 Table 6.과 같다.

結論

以上의 4個 供試樹種에 對하여 各樹種마다 500個씩 的 藥을 Modified Murashige and Skoog's medium에 依하여 培養 하였던 바, 그 Callus形成의 過程에서 藥 및 小孢子의 變化狀態와 培養을 組織學的으로 調査觀察 한 結果는 Table 6.과 같이 *Styrax japonica*에서 $2n$ Calls가 20個(全體의 4%), *Aleurites fordii*에서도 $2n$ callus만 10個(全體의 2%), *Punica granatum*에서도 $2n$ Callus가 45個(全體의 9%)가 發生되었고 n Callus는 어느 것에서도 發生되지 沒有지만 *Robinia Pseudoacacia*에서는 n Callus만 25個(全體의 5%)가 發生되었고 $2n$ Callus는 發生하지 아니하였다.

이와 같은 3個樹種의 Callus는 $2n$ Callus로서 藥隔 또는 藥內壁의 柔組織들이 形成된 것으로서 母體와 同一한 染色體를 가진 體細胞由來의 Callus였었는데 *Robinia Pseudoacacia*에서 만은 小孢子由來의 n Callus로 變化하게 된 것은 그렇게 容易한 일이 아니고 그例가 흔하지 않는데도 이와같이 木本植物인 *Robinia Pseudoacacia*의 藥에서 또 한번 더 n Callus가 誘發되었다는 事實은 今後의 有用樹種의 增殖에 對한 藥培養技術의 改善에 더욱 큰 貢獻이 되리라고 생각 한다.

Literature cited

- 足立初雄・田測公清, 1970. 園藝植物のやく培養に より生じたカルスの起源. 日本園藝學會 秋季 發表要旨, 224~225.
- Deveux, M. 1970. New Possibilities for the *in vitro* Cultivation of plant cells. *Eurospectra* 9(4): 105-110.
- Guha, S. and S.C. Maheshwari, 1964. *In vitro* Production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204 (57):497.
- and —, 1966. cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura* *in vitro*. *Nature* 212 (5057):97-98.
- Haberanat, G., G., 1902 Kulturversuche mit isolierten pflanzenzellen sit zungeber. *Akad. wiss. Wien. kl. III*:69-92.
- 韓昶烈, 1969. 藥培養에 關한 研究. 韓國作物學會誌 7:161-165.
- 韓昶烈, 高英瑞, 鄭德教, 金秉煥, 1969. 菜蔬의 藥培養에 關한 研究. (1) 오이의 2倍性 Callus. 韓國園藝學會誌 6:25-27.
- , 1969. 벼의 藥培養에 關한 研究. 韓國育種學會誌 1:1-12. 9.
- , 1970. *Nicotiana tabacum* 의 藥培養에 關한 研究, 韓國作物學會誌 8:117-120.
- , —, 1970. *Solanum nigrum* 의 藥培養에 關한 研究, 韓國育種學會誌 2:29-36.
- , 黃貞姬, 1970. 벼의 藥培養에 關한 研究, Haploid Callus의 發生 및 分化에 關여하, 護天李容夏教授 記念論文集, 71-74.
- , —, 1970. 벼의 藥培養에 關한 研究, 2. 分化培地에 移植된 Haploid Callus의 發生 및 分化, 韓國植物學會誌 13(3):17-19.
- Harn, C., 1971. Studies on anther culture in *Solanum nigrum*. *SABRAO news letter* 3(1):39-42.
- 龜谷壽昭, 1967. 花粉からの カルス形成(豫報), 育種 17刷 2:107.
- , 日向康吉, 1970. *Brassica*の花粉からの 半數體育成. 日本植物學會誌 20:14-19.
- Kameya, T. and Hinata, 1970. Induction of haploid plants from pollen grains of *Brassica*. Japan. J. Breeding 20(2):82-87.
- 片山義勇・根井正利, 1964. 植物の半數性に 關する 研究. 宮崎大學 農學部 育種學 研究室報告 2:1-78.
- 金在生, 1971. 木本植物의 藥培養에 關한 研究, 韓國林學會誌 13:23-39.
- 金在生, 1974. *Paeonia suffruticosa* Andr.의 藥培養에 關한 研究, 韓國林學會誌 23:9-16.
- 金在生, 1976. *Prunus Mume Siebold & Zuccarini* 外 3種의 藥培養에 關한 研究, 韓國林學會誌 31 (9)
- 金在生, 姜謂平・金三植・黃洋性, 1976. 經濟樹種의 藥培養에 關한 研究, 農業研究所報 10:67~76.
- 前川文夫, 竹内正辛, 加藤博文, 1963. 器內培養における“培發生”植物研究雜誌, 38:79-104.
- 村上寛一, 1967. 藥培養で 半數體をつくる, 農業及び園藝, 42(6):971-972.
- 中田和房, 田中正雄, 1968. 藥의 組織培養による

- 花粉からのタバコ 幼植物の分化、日本遺傳學會誌, 43(1):65-71.
25. —, —, 1968. 花粉の組織培養によるタバコ半數體の育成、農業び園藝, 43:685-686.
26. Niizeki, H. and K. Oono, 1968. Induction of haploid rice plant from anther culture. proc. Japan Acad 44:554-557.
27. 新關宏夫・大野清春, 1968. 薬培養によるイネ半數體の育成、農業技術, 23(7):27-28.
28. Nishi, T. and S. mitsuoka, 1969. Ocurrence of various ploidy plant from anther and ovary culture of rice plant. Japan. J. Genetics 44(6): 341-346.
29. Nitsch, J.P. and C. Nitsch, 1969. Haploid plants from pollen grains. science. 163:85-87.
30. 西貞夫, 豊田努・大澤勝次, 1970. やく培養の利用に關する研究、日本園藝學會春季研究發表要旨 166-167.
31. —, —, —, 1970. アブラナ科 そ菜の やく 培養に 關する 研究. 日本園藝試驗場研究年報, 2-11.
32. —, —, —, 1970 バラ科 そ菜の やく 培養に 關する 研究. 日本園藝試驗場研究年報 12-16.
33. Sunderland, N. and F. M. Wicks, 1969. Cultivation of haploid plants from tobacco pollen. Nature. 224:1227-1229.
34. 田中正雄・中田和男, 1969. 薬培養によつて得られたタバコの種類と半數體の染色體數倍加處理について、日本遺傳學會誌 44:47-54.
35. Tulecke, W., 1957. The pollen of *Ginkgo biloba* in vitro culture and tissue formation. Amer. Jour. Bot. 44:602-608.
36. Tulecke, W., and N. schgal, 1963. Cell proliferation from pollen of *Torreya nucifera* contrib. Boyce Thompson Inst. 22:153-163.
37. Tulecke, W., 1959. The pollen culture of C.D. La Rue: A tissue from the pollen of *Taxus*. Bull. Torrey Bot. Club 86:283-289.

Explanation of Figures

Fig. 1. Large Callus mass (C) in testtube

Fig. 2. Cross Section of Control anther

Fig. 3. Somatic Callus (C) arising from anther wall (W)

Fig. 4. Multinucleate microspores (1,2)

Fig. 5. Callus (C) Orginated from microspore emerges out of the anther slip W: anther wall

Fig. 6. Enbringing or dividing microspores in anther Cavity

