

현사시나무 器內培養 葉肉組織에서 分離된 原形質體 培養 및 植物體 再分化^{1*}

朴龍求² · 孫聖鎬³

Culture and Regeneration of *Populus alba* x *glandulosa* Leaf Protoplasts Isolated from *in vitro* Cultured Explant^{1*}

Young Goo Park² · Sung Ho Son³

要 約

현사시(*Populus alba* × *glandulosa*) 器內培養한 葉肉組織에서 原形質體를 分離, 培養하여 植物體 再分化 過程에 關해 調查 檢討하였다.

NH₄NO₃를 뺀 MS培地에 BAP 0.5mg/l와 2,4-D 2.0mg/l를 添加하여 liquid plating 法으로 原形質體 를 培養하였을때 比較的 높은 細胞分裂이 일어났다. colony 形成率은 gauze를 넣은 semi-solid agar plating 法에서 가장 높게 일어나서 培養 5週後에는 micro-callus가 形成되었다. gauze를 除去한 後에는 原形質體 分離培養後 8週가 되었을때 mini-callus가 形成되었으며 이들 callus는 2,4-D 0.5mg/l와 BAP 0.1mg/l를 添加한 MS배지에서 증식되었다. shoot 形成은 zeatin 1.0mg/l를 添加한 배지에서 이식한지 3週 만에 일어나기 시작했으며 6週後에 뿌리발달을 도모하고자 生長調節物質이 添加되지 않은 1/2MS배지로 이식하였다. 이식한지 4週後에 많은 뿌리가 形成되었다. 發根이 된 個體는 溫室에 移植하였는데 原形質體를 分離하여 完全植物體로 分化시켜 溫室에 移植하기까지는 22週가 걸렸다.

ABSTRACT

The leaf mesophyll protoplasts of *Populus alba* × *glandulosa* were isolated from leaf of plantlet *in vitro* and cultured for plant regeneration. The MS medium (minus NH₄NO₃) with 0.5 mg/l BAP and 2.0 mg/l 2,4-D showed the moderate frequency of dividing protoplasts cultured by the lipid plating method during the first week of culture. The percentage of colony formation was revealed the highest frequency by the gauze contained semi-solid agar plating method after 5 weeks cultured. Ridding out the gauze, the micro-callus was formed on the same semi-solid medium in 8 weeks after protoplasts culture. For proliferation of callus, mini-callus was transferred on the MS solid medium with 0.5 mg/l 2,4-D and 0.1 mg/l BAP 12 weeks after culture. Shoot regeneration occurred when the calli derived from protoplasts were cultured on MS medium with 1.0 mg/l zeatin and such shoots could be readily rooted on the one half strengthen MS medium with non-phytohormone. Rooting shoots were planted in green-house 22 weeks after protoplast culture.

¹ 接受 3月 21日 Received on March 21, 1988.

² 慶北大學校 農科大學 College of Agriculture, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea.

³ Department of Forestry, Iowa State University, Ames, Iowa, U.S.A.

* 本 研究는 韓國科學財團借款研究費('85-'88)에 依해 遂行된 것임.

緒 論

林木의 原形質體는 새로운 遺傳子의 導入 및 林木 細胞의 生理遺傳學의 研究에 좋은 材料로서 많은 研究가 進行되고 있다.

林木의 原形質體 分離 要因 및 培養에 關한 研究는 단풍나무(Rona과 Grignon, 1972), 포푸라類(Park *et al.* 1986 a, b, c, d; 1987 a, b, c, d; Ahuja, 1984; 齊藤, 1976), 針葉樹類(Hackmann과 Von Arnold, 1983; Strmen과 Cierna, 1981), 너도밤나무(Ahuja, 1984) 등이 報告된바 있다.

그러나 林木의 原形質體를 培養하여 個體를 再分化시킨 例는 그리 많지 않다. Sticklen 등(1986)은 느릅나무 原形質體에서 植物體를 再分化 시키는데 成功하였고 Vardi 등(1982), Kobayashi 등(1983)은 감귤의 原形質體를 培養하여 再分化에 成功하였으며 Russell과 McCown(1986)은 *x Populus albagrandidentata*의 葉肉組織에서 分離된 原形質體를 培養하여 個體를 分化시키는데 成功하였다.

林木의 原形質體 分離는 callus組織이나 懸濁培養細胞에서 보다 葉肉組織에서 어려운 것으로 알려져 있으며 (Russell과 McCown, 1986) 같은 葉肉組織에서도 器內培養한 材料보다는 野外 個體에서 分離하기가 어렵다고 報告된바 있다(齊藤, 1985).

현사시나무의 葉肉組織 原形質體 分離要因에 關해서는 Park과 Han(1986)에 依해 適正酵素組合, 濃度 및 處理時間과 pH, 滲透壓에 對해서 既 報告된바 있다.

本 研究는 器內培養한 현사시나무의 葉肉組織에서 分離된 原形質體를 培養하여 micro-colony를 유발시키고 形成된 micro-colony에서 callus를 만들어 이 callus에서 完全한 植物體를 再分化시킨 研究 結果에 關한 것이다.

本 研究 結果는 Russell과 McCown(1986)의 *x Populus albagrandidentata*에서의 再分化 成功에 이어 포푸라 葉肉組織의 原形質體에서 個體 分化를 시킨 적은 例중의 하나이다.

이와같은 結果는 林木 原形質體를 이용한 遺傳子 導入 및 生理遺傳學의 研究에 基礎를 提供할 수 있으리라 기대된다.

材料 및 方法

1. 原形質體 分離

Park과 Han (1986)의 方法에 따라 Cellulase 'Onozuka' R-10 2.0%, Macerozyme R-10 0.8%, Hemicellulase 'Sigma' 1.2%, Driselase 2.0%, Pectolyase Y-23 0.05%를 組合한 酵素液 20ml를 pH 5.6으로 調整하여 器內培養한 현사시나무 葉肉組織 1g을 잘게 잘라 넣고 20分間 30°C에서 120 strok/min으로 진탕한 다음 酵素液을 버리고 새로운 酵素液을 넣어서 같은 方法으로 30分間 진탕하여 一次 回收를 하고 分解가 完全히 일어나지 않은 葉肉組織에 對해서는 같은 量의 酵素液을 添加하여 30分 마다 二次, 三次 回收를 하였다. 回收된 原形質體는 56 μ m nylon mesh로 걸러서 分解되지 않은 葉肉組織을 除去하고 洗淨液(Park과 Han, 1986)으로 100x g, 3分間 分離시켜 上澄液을 버리고 原形質體를 回收하여 浮遊液(Park과 Son, 1986)을 넣어 80x g으로 5分間 遠心시켜 파스텔 피펫으로 上部에 形成된 完全한 原形質體의 밴드를 採取하였다.

2. 原形質體 培養

完全하게 分離된 原形質體는 mannitol 0.6M의 CPW 溶液(CaCl₂ · 2H₂O 148mg, MgSO₄ · 7H₂O 25mg, Ca(NO₃)₂ · 4H₂O 3mg, KH₂PO₄ 17mg, mannitol 10.93g, H₂O 100ml, pH 5.6)에 넣어 25°C ± 2°C의 暗狀態에서 하루동안 보관한 후 다시 mannitol(0.6M) 溶液에 浮遊시켜 完全한 原形質體만 回收하였다. 10ml 洗淨液으로 濃度を 낮추어 100x g으로 3分間 遠心하여 上澄液을 버렸다. 모든 原形質體培養에 있어서 배지 滲透壓은 0.6M (mannitol 0.2M + glucose 0.4M)로 시작하였으며 micro-callus가 형성되는 배양 5주까지 1주일마다 배양배지 2ml에 對해 0.2ml의 삼투압 조절제가 들어 있지 않은 새로운 배지를 넣어서 전체의 삼투압을 낮추어 주었다.

2-1. 培地內 植物生長調節 物質添加가 細胞 分裂에 미치는 影響

NH₄NO₃를 뺀 MS 基本培地에 BAP와 2,4-D를 組合한 4가지 배지에 原形質體 濃度を 2.4 × 10⁵/ml로 調整하여 넣어준 뒤 細胞分裂 樣狀을 調査하였

다. 原形質體 培養은 25°C ± 2°C의 dim light하에서 liquid plating法으로 實施하였다.

2-2. 培地別 細胞分裂 및 colony 形成力 調査

MS(-NH₄NO₃), WPM(-NH₄NO₃)와 8p-KM 培地에 BAP 0.5+2, 4-D 2.0mg/l를 添加한 培養培地에 原形質體 濃度を 2.4×10⁵/ml로 조절하여 넣어준 뒤 dim light하에서 細胞分裂과 colony 形成率을 調査하였다.

2-3. 培養法에 따른 細胞分裂 및 colony 形成率 調査

直徑 6cm 팔콘 페트리 디쉬에 培地和 原形質體를 混合하여 2.4×10⁵/ml의 濃도로 調整하여 다음과 같이 處理하였다. 培地는 NH₄NO₃를 用 MS 培地에 BAP 0.5+2, 4-D 2.0ml/l를 添加하여 使用하였다(Fig 2). 原形質體 培養은 각각 25°C ± 2°C의 dim light하에서 實施하였다.

2-3-1. Hanging drop

原形質體와 混合된 培地를 한 방울씩 떨어뜨려서 培地 接觸面이 윗쪽으로 오도록 하여 培地가 페트리 디쉬 윗쪽에 달리도록 하여 물방울처럼 달린 배지 밑쪽으로 原形質體가 모이도록 하므로써 空氣 접촉 면을 넓게 해주었다.

2-3-2. Liquid plating

5.0ml의 원형질체와 혼합된 배지를 팔콘 페트리 디쉬에 넣고 밑면에 고루 깔리도록 가만히 흔들어 주었다.

2-3-3. Liquid drop

原形質體와 混合된 배지를 팔콘 페트리 디쉬에 한방울씩 3個所에 떨어뜨려 배양하였다.

2-3-4. Gauze contained semi-solid agar plating.

滅菌 gauze를 0.2% Difco agar를 添加한 배지 위에 4.0ml의 原形質體와 混合된 배지를 떨어뜨려 배양하였다.

3. Callus 生長과 個體 分化

BAP와 2, 4-D를 組合한 9가지 배지에서 callus 生長率을 調査하였으며 生長된 callus에서 shoot 分化率을 보기 위해 BAP, 2ip, zeatin을 각 10개 濃度씩 處理한 MS培地에 移植하여 生育狀態를 調査하였다. 배양실 온도는 25°C ± 2°C였고 1,500 Lux의 燈光하에서 日長은 16시간으로 調整하였다.

再分化된 shoot는 뿌리 發生을 위해 植物生長調

節劑가 들어 있지않은 1/2 MS 培地에 옮겨 發根을 調査하였다.

結果 및 考察

表-1은 MS(-NH₄NO₃) 基本培地에 BAP, 2, 4-D와 NAA의 4個 組合間에 liquid plating法에 의한 分裂 및 colony 形成率을 調査한 것이다.

細胞分裂은 培養 7日 후 調査하였으며 colony 形成率은 培養 14日만에 調査하였다.

Table 1. Effect of different hormone combinations on cell division and colony formation in protoplast culture

Phytohormone combinations			Cell division	Colony formation
BAP	2, 4-D	NAA		
0.5	2.0	-(mg/l)	+++	+++
0.5	-	2.0	++	++
2.0	0.5	-	+	++
2.0	-	0.5	+	++

* Visual estimation : - none, + poor, ++ good, +++ very good. Media : MS(-NH₄NO₃)

4가지 組合에서 다같이 細胞分裂을 관찰할 수 있었으나 BAP 0.5+2, 4-D 2.0mg/l 添加 배지에서 가장 活潑한 細胞分裂을 보였으며 培養 2週後에 觀察한 colony 形成에 있어서는 가장 좋은 배지로 觀察되었다.

表-2는 MS(-NH₄NO₃), WPM(-NH₄NO₃)와 8p-KM 培地別 細胞分裂과 colony 形成率을 調査한 結果이다.

Table 2. Effect of different culture medium on cell division and colony formation

Medium	Cell division	Colony formation
MS (-NH ₄ NO ₃)	++	+++
WPM(-NH ₄ NO ₃)	++	++
8p-KM	+++	-

* Visual estimation : + poor, ++ good, +++ very good. Hormone : 0.5mg/l BAP+2.0mg/l 2, 4-D

細胞分裂數는 8p-KM 培地에서 약간 높게 나타났으나 MS배지나 WPM배지에서도 相當數의 分裂을 보였으며 colony 形成率은 MS(-NH₄NO₃)배지에서 가장 높게 나타났다.

암모니아 이온이 들어있는 배지는 대부분의 植物 原形質體培養에서 細胞分裂을 심하게 抑制한다는 報告가 많이 있다.

Russell 등(1986)에 따르면 x*Populus albagrandidentata*의 葉肉原形質體培養에 있어서 WPM 培地에 암모니아태 질소를 4.94mM 이상 넣을 때는 細胞生長이 觀察되지 않았다고 보고 하였으며 또한 *Solanum*의 原形質體 培養에서 암모니아 이온이 激烈히 細胞 生育을 抑制함을, 그리고 *Artemesia*와 *Chrysanthemum*에서는 plating 效率이 현저히 감소하였다고 報告하였으나 *Nicotiana*에서는 암모니아 이온의 添加가 細胞分裂을 증가시킨다고 인용하여 보고하였다.

이와같은 報告를 토대로 하여 本 實驗에서는 암모니아태 질소를 除外시킨 培地를 使用하였다.

表-3은 培養方法別에 따른 細胞分裂 및 colony 形成率을 調査한 것이다. 細胞分裂은 liquid plating 方法으로 25.2%, colony 形成率은 gauze를 넣은 semi-solid agar planting 法에서 15.1%로 가장 높게 나타났다.

Table 3. Effect of different culture methods on cell division and colony formation

Culture methods	Cell division	Colony formation
Hanging drop	3.9%	2.1%
Liquid drop	8.2	9.3
Liquid plating	25.2	7.2
Gauze contained semi-agar plating	18.7	15.1

Media : MS(-NH₄NO₃) + 0.5mg/l BAP + 2.0mg/l 2,4-D

Ahuja(1983)는 너도밤나무에서 liquid plating 法으로 細胞分裂을 觀察하였으며朴과 孫(1986)은 이타리포푸라 I-214의 原形質體培養에서, Park과 Han(1986)은 현사시나무의 原形質體培養에서 liquid plating法을 利用하여 細胞分裂을 觀察하였으나 callus유발에는 失敗하였다.

그러나 Russell 등(1986)은 x*P. albagrandidentata*의 原形質體培養에서 floating disc system을 利用하여 個體 再分化에 成功하였다. Russell은 seive를 배지 위에 띄워 배양하므로써 다음과 같은 잇점이 있다고 하였다.

첫째 floating screen disc에 依해 細胞間 응집이 일어나지 않으며, 둘째 한층으로 培養되기 때문에 觀察하기 쉽고, 셋째 각 間別로 data를 내기 쉽고, 넷째 細胞들이 이 disc에 붙어 있어서 새로운 배지를 添加해주거나 갈아 줄때 손쉽게 할수 있으며, 다섯째 포리에스텔 솜을 넣어 배양 할때에는 원형질체

손상이 심하지만(Kirby와 Cheng, 1979) 細胞가 부착된 disc는 發育 또는 實驗을 위해 배지 이동을 매우 쉽게 할수 있었다.

本研究 結果는 gauze를 넣은 結果가 매우 좋게 나타나서 原形質體에서 colony를 形成시킬수 있었다.

表-4는 形成된 colony로 부터 BAP와 2,4-D를 각각 濃度別로 組合시킨 배지에서 callus 증식력을 調査한 것이다.

Table 4. Effect of different hormone combinations on growth of callus from colony derived from protoplasts

MS medium with phytohormone		Callus growth
BAP	2,4-D	
0.0 (mg/l)	0.0 (mg/l)	-
	0.5	++
	1.0	+
0.1	0.0	-
	0.5	+++
	1.0	++
0.2	0.0	+
	0.5	++
	1.0	++

* Visual estimation : - none, + poor, ++ good, +++ very good. Media : MS + 0.1mg/l BAP + 0.5mg/l 2,4-D

移植 4週後에 調査한 結果 가장 좋은 組合는 BAP 0.1과 2,4-D 0.5mg/l이 含有된 組合으로써 9 個 組合 중 가장 높은 成長率을 보였다.

이 結果는 양황철(Park과 Son, 1987)의 callus 증식 (2,4-D 1.0, BAP 0.1mg/l)에 비해 2,4-D 濃도가 낮은 것으로 나타났다. 같은 포푸라屬이라 할지라도 수종간의 生理反應의 差異를 推定할수 있었다.

表-5는 形成된 callus에서 shoot再分化를 調査하기 위해 MS 基本培地에 BAP, 2ip와 zeatin를 各 各 10가지 濃度別로 處理하여 shoot 發生率을 調査한 것이다.

分化培地로 옮기어 3주후부터 shoot가 發生하기 시작했으며, 이식 培養 5주후 zeatin 1.0, 1.5, 2.0 mg/l를 添加한 培地에서 再分化率이 가장 높게 나타났다.

發生한 shoot는 發根을 誘導하기 위해 植物生長 調節物質이 添加되어있지 않는 1/2MS基本培地에 옮겨서 觀察한 結果 대부분의 shoot에서 健康한 發根이 觀察되었다.

Table 5. Effect of different hormones on shoot induction from callus induced by protoplasts 5 weeks after subculture for shoot induction

Concentration Phytohormone	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0(mg/l)
BAP	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2ip	+	++++	+++	+	+	++	++	+	+	+
Zeatin	++	+++++	+++++	-++	++	++	++	++++	+	+

* Visual estimation : - none, + poor, ++ good, +++ very good, ++++ excellent

Russell과 McCown(1986)은 *xPopulus albagrandidentata*의 葉肉組織 原形質體를 使用하여 培養했는데 낮은 光度($10\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$)下에서 micro-colony가 形成되었으며 $1.0\mu\text{M}$ NAA와 $0.4\mu\text{M}$ BA를 添加한 배지에서 anthocyanin이 生成되었음을 報告하였다. $0.4\mu\text{M}$ 以下の BA를 添加한 培地에서는 friable 한 callus가 形成되었으며, NAA를 10-40 μM 로 증가시키면 callus의 發育이 훨씬 좋았고, 原

形質體 分離後 9個月만에 $1\mu\text{M}$ NAA와 $0.4\mu\text{M}$ BA에서 shoot가 發生되었다고 보고하였다.

Sticklen 等(1986)은 느릅나무 callus에서 배낸 原形質體를 8p-KM 培地에 2,4-D $1.0\mu\text{M}$, NAA $2.5\mu\text{M}$ 과 zeatin $1\mu\text{M}$ 를 添加하여 배양 2주만에 micro-colony를 얻었으며 2~3mm colony가 되었을때 0.5% Difco-agar를 넣은 고체배지로 옮겨 (pH 5.6), 日長 16시간 光度 $12\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 cool

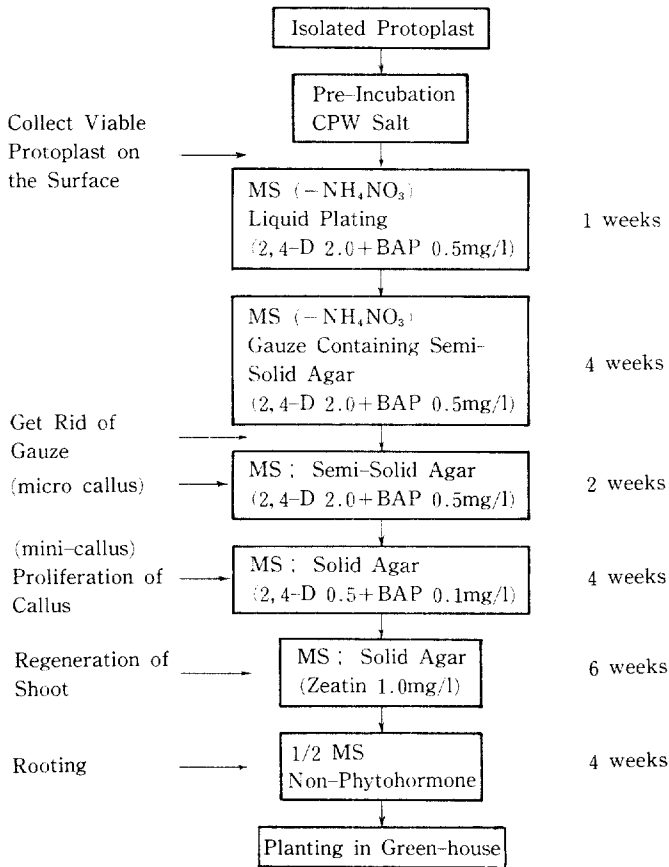


Fig. 1. The scheme of optimal culture procedures for mesophyll protoplast of *P. alba x glandulosa*

-white 형광하에서 培養하였다. 生長한 callus는 MS基本培地에 10~30 μ M BA를 添加한 培地에서 shoot 原基가 形成되었으며 BA 2.0 μ M이 添加된 배지로 이식하였을때 shoot가 生長하여 잎이 전개되었는데 原形質體 分離後 22~24週가 걸렸다.

本 研究 結果는 *P. alba* \times *glandulosa*의 原形質體를 NH₄NO₃를 뺀 MS 基本培地에 BAP 0.5mg/l와 2,4-D 2.0mg/l를 添加한 培地에서 liquid plating法으로 dim light 下에서 일주일간 배양한 후 같은 배지에 gauze를 넣은 semi-solid agar 배지를 이용 4주간 배양하여 micro-callus를 얻었다. micro-callus는 gauze를 除去한 semi-solid agar 배지에 2주간 배양한 후 mini-callus를 MS 기본 배지에 BAP 0.1, 2,4-D 0.5mg/l를 添加한 배지에서 4주간 배양 callus를 증식시켰다. 증식된 callus는 shoot 재분화를 시키기 위해 MS 기본배지에 zeatin 1.0mg/l를 添加하여 日長 16시간, 1,500 Lux 형광하에서 6주간 배양하였다. 誘發된 shoot는

發根을 시키기 위해 植物生長調節物質이 들어 있지 않는 1/2MS배지에서 4주간 배양하여 發根시켰으며 完全히 發根된 것은 퍼라이트와 버뮤큐라이트가 함유된 배양토에 植栽하여 溫室에서 활착시켰다. 原形質體分離에서 個體發生까지 20~22주가 걸렸다(그림-1, 그림-3).

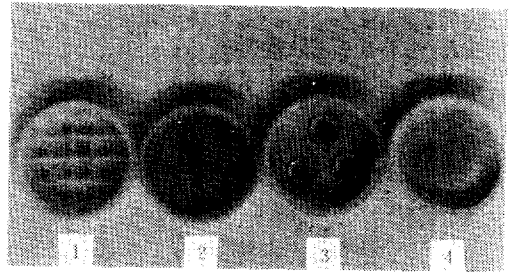
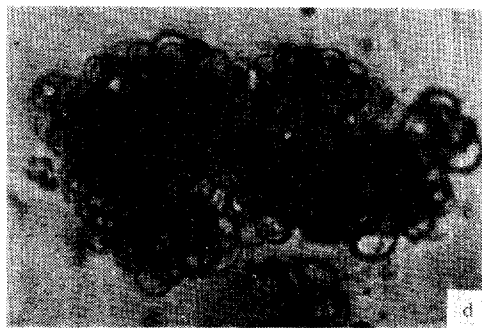
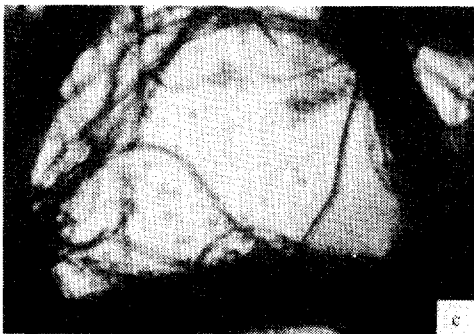
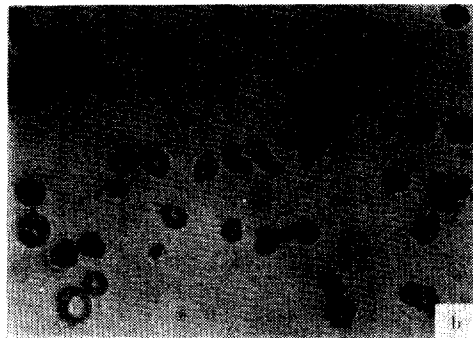


Fig. 2. Four methods for mesophyll protoplast culture; 1. Hanging drop method, 2. Liquid plating method, 3. Liquid drop method, 4. Gauze contained semi-solid agar plating method



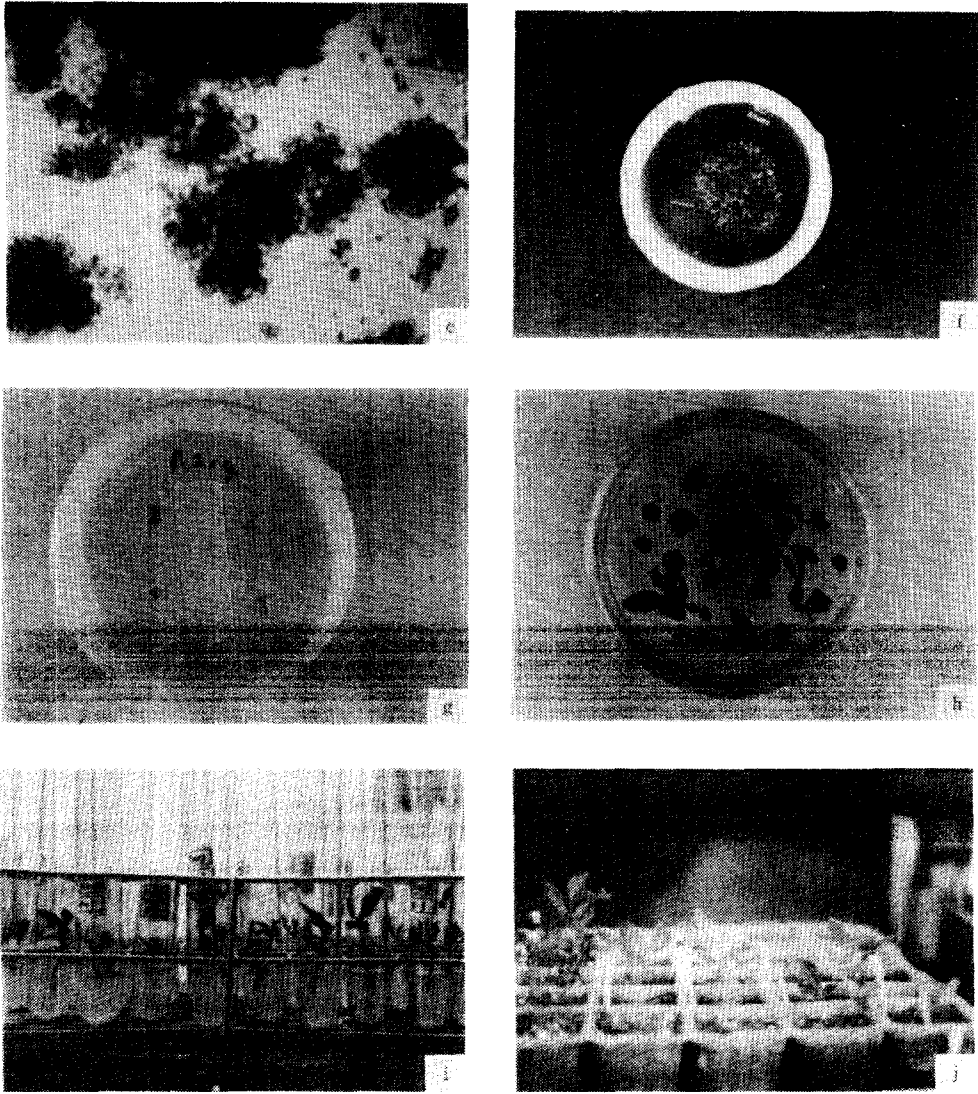


Fig. 3. Procedure showing the regeneration of shoot and root from the leaf mesophyll protoplasts of *P. alba x glandulosa*

- a. Freshly isolated protoplasts from leaf mesophyll (x300)
- b. Enlargement of protoplasts just before cell division (x200) ; 3 days after culture
- c. Cell aggregation and division around fiber of gauze containing semi-solid agar medium (x100) ; 10 days after culture
- d. Colony formation before get rid of gauze (x300) ; 3 weeks after culture
- e. Vigorous cell division after get rid of gauze (x200) ; 7 weeks after culture
- f. Mini-callus formation ; 11 weeks after culture
- g. Callus growth before subculturing for proliferation ; 12 weeks after culture
- h. Initiation of shoots from callus induced by protoplasts ; 18 weeks after culture
- i. Root initiation from the shoots ; 21 weeks after culture
- j. Planting in green-house ; 24 weeks after culture from the isolated protoplasts

Cited Literature

1. Ahuja, M.R. 1983. Somatic cell differentiation and rapid propagation of aspen. *Silvae Genetica* 32 : 131-135.
2. Ahuja, M.R. 1984. Protoplast research in woody plants. *Silvae Genetica* 33 : 32-36.
3. Hackman, I.C. and S.V. Arnold. 1983. Isolation and growth of protoplasts from cell suspensions of *Pinus contorta* Daugl ex Loud. *Plant Cell Rep.* 2 : 92-96.
4. Kirby, E.G. and T.Cheng. 1979. Colony formation from protoplasts derived from Douglas-fir cotyledons. *Plant Sci. Lett.* 14 : 145-154.
5. Kobayashi, S., H.Uchimiya and I.Ikeda. 1983. Plant regeneration from 'Trovia' orange protoplasts. *Japan. J. Breed.* 33 : 119-122.
6. 박용구. 1986 a. 임목육종과 조직배양. 경북대학교 개교 40주년 특집호. P 113-135.
7. 朴龍求, 孫聖鎬. 1986 b. 이태리포푸라 I-214 葉肉組織에서 原形質體分離에 미치는 몇가지 要因. 韓國林學會誌 74 : 29-36.
8. 朴龍求. 1986 c. 林業과 Biotechnology. 韓國農業科學協會. p 79-102.
9. Park, Y.G. and K.H. Han. 1986 d. Isolation and culture of mesophyll protoplasts from *in vitro* cultured *Populus alba* x *glandulosa*. *Jour. Korean For. Soc.* 73 : 33-42.
10. Park, Y.G., D.I. Shin, J.H.Woo, I.W. Sul and S.H. Son. 1987 a. Protoplasts isolation from mesophyll of *Populus alba*. *Korean J. Plant Tissue Culture* 14 : 49-59.
11. Park, Y.G. and S.H. Son. 1987 b. Isolation and culture of mesophyll protoplasts from *Populus* spp. *Sym. Genetic Manipulation of Woodyplants.* June 21-25. Kellog Center, Michigan State Univ. East Lansing, MI : p 56.
12. Park, Y.G. and S.H. Son. 1987 c. Culture methods of mesophyll protoplasts from *Populus alba* x *glandulosa*. Pacific Science Association 16th Congress : Seoul, Korea. p 190.
13. Park, Y.G. and S.H. Son. 1987 d. Protoplast isolation from callus and suspension cultured cells of *Populus alba*. *Korean J. Genetics* 9 : 133-140.
14. 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.
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. 齊藤明. 1976. 키리와포푸라 葉肉細胞 からのプロトプラスト의 分離. *日林誌* 58 : 301-305.
17. 齊藤明. 1985. 林木育種とバイオテクノロジー. 農業および園藝. 193.199.
18. Sticklen, M.B., S.C. Domir and R.D. Lineberger. 1986. Shoot regeneration from protoplasts of *Ulmus* x 'Pioneer'. *Plant Science* 47 : 29-34.
19. 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.
20. 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 and Cell Culture.* Tokyo, pp. 619-620.