

벼 Callus의 繼代培養이 植物體 再分化에

미치는 影響

孫再根 · 李承牧 · 金敬旻

慶北大學校 農科大學 農學科

Effect of Subculture on Plant Regeneration in Rice Callus Culture

Sohn, Jae Keun · Lee, Seong Mok · Kim, Kyung Min

Dept. of Agronomy, Coll. of Agriculture

Kyungpook National University

Summary

The effect of subculture intervals and passages on plant regeneration from seed-derived callus was determined.

Regeneration capacity of callus varied with rice cultivars and subculture intervals tested. The callus subcultured every 2 weeks produced more plants than that of 4 weeks. The calli from a Tongil-type rice cultivar, Milyang 23, lost easily their regeneration ability when the calli were subcultured every 2 weeks and 4 weeks. The callus induced from a *japonica* cultivar, "Yeongdeogbyeon", showed to maintain high frequency (>70%) of plant regeneration when it was subcultured every 2-week intervals.

Casein hydrolysate supplemented in callus induction medium enhanced callus growth and its regeneration. High frequency of plant regeneration was obtained from the calli transferred on N₆ medium supplemented with kinetin(2mg/l) and NAA(1mg/l). The subcultured calli in the medium supplemented with casein hydrolysate(2 g/l), myo-inositol (200mg/l) and thiamine-HCl(2mg/l) increased the frequency of embryogenic callus formation and plant regeneration.

緒 論

植物의 組織切片을 器內에 培養하여 形成된 callus를 새로운 培地로 移植하지 않고 一定期間 以上 經過하게 되면 callus의 生長이 鈍化되면서 漸次 褐變하여 마침내 再分化力을 喪失하게 되는데 이러한 callus의 老化原因으로는 培地內 營養分의 枯渴, 각종 生理作用의 不均衡, 抑制物質의 蓄積等과 같은 몇가

지 要因으로 說明되고 있다^{6,14)}.

一般적으로 callus로 부터 比較的 짧은 期間에 再分化된 植物體를 얻을 수 없을 경우에는 그 callus가 褐變되기 前에 一定期間 別로 새로운 培地로 移植하는 繼代培養法을 가장 普遍的인 方法으로 利用하고 있다. 특히 callus를 利用한 變異의 誘起나 變異體選拔, 二次代謝物質의 生産, 細胞懸濁培養 및 原形質體分離培養等의 效率을 높이기 위해서도

callus나 callus로부터 由來된 細胞의 繼代培養은 거의 必須的인 過程이다. 그러나 callus를 數回동안 繼代培養하게 되면 植物의 種類나 callus의 狀態, 培地の 組成 및 培養方法等에 따라 多少間의 差異는 있지만 대체로 繼代培養의 回數가 增加될수록 植物體 再分化力은 크게 낮아지는 것으로 알려져 있다^{9,13,19}. 그러므로 器內에 培養된 組織切片으로부터 callus의 誘起過程을 거쳐서 再分化 植物體를 얻고 있는 벼, 보리, 밀과 같은 禾本科 作物의 組織培養에서 植物體 獲得頻度を 높이기 위해서는 再分化力이 높은 callus의 獲得과 이에 따른 效果의인 植物體 再分化 方法의 開發이 무엇보다 重要하다^{17,18,20}.

벼의 callus를 30日間隔으로 2~3回 繼代培養하게 되면 再分化力이 크게 低下하는 것으로 報告⁹된 바 있으며, Kavi Kishor와 Reddy¹⁰는 繼代培養된 callus의 再分化力에는 培地內의 osmotic strength가 매우 重要的인 影響을 미친다고 하고 sucrose單用 培地에서 誘起된 callus는 25日間隔으로 4回 繼代培養 했을 때 再分化力을 喪失하지만, sucrose를 sorbitol이나 mannitol과 混用하면 callus의 再分化力이 長期間維持된다고 하였다. Nabors等¹²은 벼, 밀, 귀리 등의 禾本科 作物의 callus培養에서 두가지 形態의 callus가 形成됨을 確認하고 embryogenic callus(E-callus)의 再分化力은 non-embryogenic callus(NE-callus)에서 보다 33배나 높았으나, embryogenic callus도 繼代培養을 계속하면 再分化率이 낮아진다고 하였다. 一般的으로 禾本科 作物의 callus를 繼代培養할 경우 培養되는 母植物의 genotype, 繼代培養 期間, 培地組成 및 callus의 狀態等이 植物體 再分化力에 크게 影響을 미치는 것으로 알려져 있다^{1,2,11,17,18,20}.

本 研究은 벼 callus로부터 再分化되는 植物體의 獲得頻度を 높이기 위하여 完熟胚로부터 誘起된 callus의 繼代培養 回數, 期間 및 培地內에 添加되는 生長調整劑의 組成等과 같은 몇가지 要因에 대한 實驗을 遂行하여 얻어진 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

本 實驗에는 1989년 慶北大學校 農科大學

實習圃場에서 標準栽培法에 따라 栽培된 “盈德벼”, “密陽 23호”, “Koshihikari”, “秋晴벼”의 成熟種子를 利用하였다. 이들 品種의 成熟種子를 肉眼으로 選別하여 玄米外部에 傷處가 나지 않도록 內·外穎을 除去한 다음 機械的 傷處나 病蟲害가 없는 健全한 玄米를 選別하여 70% ethanol溶液에 30秒, 1% sodium hypochlorite溶液에 40分間 浸漬시킨 後 滅菌水로 4~5回 洗滌한 다음 培養材料로 利用하였다.

Callus 誘起 및 植物體 再分化는 sucrose (30 g/l), Gelrite(2 g/l) 및 生長調整劑 등이 添加된 N₆培地⁵를 使用 하였으며, 培地殺菌전에 0.1N의 NaOH와 HCl로 培地의 pH를 5.8로 調整한 後 120°C에서 15分동안 高壓滅菌하였다. Callus誘起를 위해서는 직경 9cm 샐레에 培地를 20ml씩 分注한 後 滅菌된 種子의 胚盤이 培地속에 묻히지 않게 10粒씩 置床하여 26±1°C의 恒溫器에서 暗狀態로 培養하였다. 植物體 再分化에는 培地가 10ml씩 分注된 試驗管(21×200mm)에 callus를 移植한 後 26±1°C의 恒溫器에서 12時間 明상태(2,500 Lux)로 培養하였으며, callus移植 30日 後에 再分化된 植物體數와 移植 callus數로서 植物體 再分化率을 求하였다.

繼代培養 期間 및 回數와 植物體 再分化率과의 關係를 調査하고자 2,4-D(1mg/l)가 添加된 N₆培地에 “盈德벼”外 2品種의 玄米를 置床하여 誘起된 callus를 1~5mm크기로 2週 間隔으로 5回(S₀~S₆), 4週 間隔으로 2回(S₀~S₂) 繼代培養하면서 形成된 callus를 NAA(1 mg/l)와 kinetin(5mg/l)이 添加된 N₆ 培地에 移植하여 30日 後에 品種別, 繼代培養期間 및 回數別 植物體 再分化率을 求하였다.

Callus 誘起培地の 組成이 callus形成 및 植物體 再分化에 미치는 影響을 調査하고자 myo-inositol(MI), thiamine-HCl(TH), casein hydrolysate(CH) 및 2,4-D(1~2mg/l) 등이 單用 또는 混用된 N₆培地에 “Koshihikari”의 玄米를 培養하여 30日 後에 培地組成別로 형성된 callus의 生體重을 조사하는 한편, 이들 callus를 繼代培養에서와 같은 再分化培地에 移植하여 30日 後에 植物體 再分化率을 調査하였다.

再分化 培地の 生長調整劑 組成과 植物體 再分化率과의 關係를 調査하고자 2,4-D(1mg/1)가 添加된 N₆培地에서 誘起된 “盈德벼”의 callus를 kinetin(2~5mg/1), NAA(1.0mg/1)가 單用 및 混用된 N₆再分化培地에 移植하여 15日 後에 綠色點發生數와 40日 後에 植物體 再分化率을 調査하였다. 그리고 “盈德벼” 및 “Koshihikari”의 玄米를 2,4-D(1mg/1), MI(200mg/1), TH(1mg/1), CH(2 g/1) 등이 添加된 N₆培地에 置床하여 2週 間隔으로 繼代培養하여 每 繼代培養 回數別 E-callus 發生率과 植物體 再分化率을 調査하였다.

結果 및 考察

“盈德벼”, “密陽 23號”, “秋晴벼”의 玄米를 培養하여 各 品種別로 callus를 2週間隔으로 새로운 培地에 繼代培養 하면서 再分化 培地로 移植한 結果 그림 1과 같이 品種別 callus의 再分化率은 繼代培養 回數에 따라 相當한 差異를 보였는데, “盈德벼”의 경우는 繼代培養의 回數가 4~5回로 增加됨에 따라 70% 以上の 매우 높은 再分化率을 나타내었다.

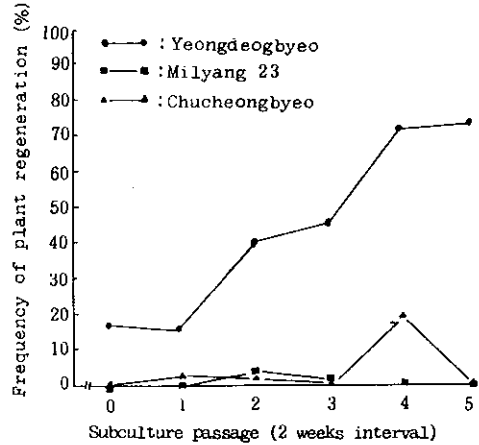


Fig. 1. Effect of subculture passages on plant regeneration in the callus culture of three rice cultivars.

Table 1. Frequency of plant regeneration from callus subcultured every four weeks

| Subculture ^{a)} passage(4weeks) | Cultivar | No. of calli ^{b)} transferred | No. of plants regenerated(%) | No. of total plants |
|--|---------------|--|------------------------------|---------------------|
| S ₀ | Yeongdeogbyeo | 24 | 4(16.7) | 5 |
| | Chucheongbyeo | 35 | 2(5.7) | 2 |
| | Milyang 23 | 28 | 2(7.1) | 2 |
| S ₁ | Yeongdeogbyeo | 34 | 9(26.5) | 15 |
| | Chucheongbyeo | 40 | 0(0.0) | 0 |
| | Milyang 23 | 35 | 1(2.9) | 1 |
| S ₂ | Yeongdeogbyeo | 24 | 14(58.3) | 30 |
| | Chucheongbyeo | 20 | 0(0.0) | 0 |
| | Milyang 23 | 22 | 0(0.0) | 0 |

a). Subculture medium: N₆+2, 4-D(1mg/1)+sucrose(30 g/1)+Gelrite(2 g/1)

b). Medium for regeneration: N₆+NAA(1mg/1)+kinetin(5mg/1)+sucrose(30 g/1)+Gelrite(2 g/1)

“秋晴벼”의 경우는 1~3回 繼代培養된 callus에서 1~3%의 매우 낮은 再分化率을 보였

으나 4回에서는 20%로 크게 向上 되었고 5回 繼代培養된 callus에서는 植物體 再分化率

이 급격히 低下 하였고, 統一型 品種인 “密陽 23號”의 경우는 3回 以上 繼代培養된 callus 에서는 거의 植物體가 再分化 되지 않았다. 4週 間隔으로 繼代培養 하였을 때 “盈德벼”는 2回 繼代培養에서도 58.3%의 높은 再分化 率을 보였으나 “秋晴벼”와 “密陽 23號”의 callus 에서는 거의 植物體가 再分化 되지 않았다(表 1). 以上の 實驗結果에서 벼 callus의 繼代培養에 따른 植物體再分化能力은 培養되는 벼의 genotype 및 繼代培養 回數와 期間에 따라 크게 相異하며, “盈德벼”의 경우는 2週 및 4週間隔 繼代培養에서도 再分化 能力이 높게 維持되는 것으로 나타났다.

Chandler와 Vasil⁹⁾은 禾本科 植物인 Napier grass(*Pennisetum purpureum*)의 葉組織에서 由來된 callus를 繼代培養한 結果, 繼代培養 期間과 回數에 따라 E-callus의 發生樣相이 相異 하였다고 하면서, 2週間隔으로 繼代培養된 것은 比較的 長期間 높은 再分化力이 維持 되었으나, 3~4週 또는 그 以上の 間隔으로 繼代培養된 callus는 植物體 再分化力이 크게 減少 되었다고 하였다. Inoue와 Maeda⁹⁾는 벼의 callus를 30日 間隔으로 3回 以上 繼

代培養된 것은 거의 植物體가 分化되지 않았다고 했으며, Abe와 Futsuhara¹⁾는 60品種의 벼 뿌리 組織에서 誘起된 callus를 繼代培養하여 品種別 植物體再分化 能力을 調査한 바 genotype間에 再分化 能力은 크게 相異하였으며, 자포니카 品種들이 印度型 보다 再分化率 이 높았으며 再分化 過程에서 embryogenesis 에 의해 植物體가 形成되는 品種도 있었다고 하였다. Heyser 等⁷⁾과 Nabors等¹²⁾은 E-callus를 繼代培養하면 再分化力이 比較的 長期間 維持된다고 하였고, Abe와 Futsuhara²⁾는 E-callus의 繼代培養에서도 品種間 植物體 再分化率의 差異는 컸다고 하였다. 本 實驗에서도 繼代培養된 callus의 植物體 再分化 能力은 品種에 따라 相異하게 나타났고 4週間隔의 繼代培養 보다는 2週間隔으로 培養하는 것이 再分化力 維持에 效果의인 것으로 나타났으며, 供試品種中 “盈德벼”는 2週 및 4週間隔으로 繼代培養하여도 callus의 再分化力이 比較的 높게 維持되었는데 이러한 品種은 今後 벼 細胞培養 材料로 매우 有用하게 利用되어 질 수 있을 것으로 思料된다.

Table 2. Effect of medium composition for callus induction on plant regeneration of a rice cultivar “Koshihikari”

| Medium ^{a)} | Fresh weight of callus/seed(mg) ^{b)} | No. of calli transferred ^{c)} | No. of calli with | |
|----------------------|---|--|-------------------|----------------|
| | | | green spot(%) | green plant(%) |
| 1 | 108.7 | 49 | 3(6.1) | 1(2.0) |
| 2 | 93.9 | 50 | 1(2.0) | 0(0.0) |
| 3 | 90.4 | 48 | 5(10.4) | 1(2.1) |
| 4 | 148.4 | 50 | 5(10.0) | 5(10.0) |
| 5 | 106.3 | 50 | 5(10.0) | 0(0.0) |

a). Medium for callus induction.

1. N₆+2,4-D(1mg/1)+sucrose(30 g /1)+Gelrite(2 g /1).

2. N₆+2,4-D(1mg/1)+MI(200mg/1)+sucrose(30 g /1)+Gelrite(2 g /1).

3. N₆+2,4-D(1mg/1)+MI(200mg/1)+TH(2mg/1)+sucrose(30 g /1)+Gelrite(2 g /1).

4. N₆+2,4-D(1mg/1)+MI(200mg/1)+TH(2mg/1)+CH(2 g /1)+sucrose(30 g /1)+Gelrite(2 g /1).

5. N₆+2,4-D(2mg/1)+sucrose(30 g /1)+Gelrite(2 g /1).

b). Callus weight were calculated at 30 days after seed inoculation.

c). Medium for plant regeneration: N₆+kinetin(5.0mg/1)+NAA(1.0mg/1)+sucrose(30 g /1)+Gelrite(2 g /1).

Callus 誘起培地の組成이 植物體 再分化에 미치는 影響을 調査한 바(表 2), 2,4-D(1mg/1) 單用培地에서도 callus의 生體重은 108.7mg으로 比較的 높게 나타났으나 植物體 再分化率은 2.0%로 낮았고 2,4-D(1mg/1), MI(200mg/1), CH(2g/1) 등이 添加된 培地에서 callus의 生體重이 148.4mg으로 가장 무거웠고 植物體 再分化率도 10.0%로 가장 높게 나타났다.

再分化培地內에 添加되는 生長調整劑의 種類와 濃度가 植物體 再分化에 미치는 影響을 調査한 바(表 3), callus 移植 15日 後에 調査된 綠色點 發生率은 NAA 1mg/1와 kinetin 5mg/1가 添加된 培地에서 85%로 가장 높았으나 植物體 再分化率은 1.0mg/1의 NAA와 2.0mg/1의 kinetin이 添加된 培地에서 20%로 가장 높게 나타났다.

Table 3. Effect of growth regulators on plant regeneration in callus culture of a rice cultivar "Yeongdeogbyeo"

| Growth regulator in regeneration medium(mg/1) ^{a)} | | No. of calli transferred ^{a)} | No. of calli with | |
|---|-----|--|-------------------|----------------|
| Kinetin | NAA | | green spot(%) | green plant(%) |
| 2.0 | — | 40 | 29(72.5) | 2(5.0) |
| 2.0 | 1.0 | 40 | 30(75.0) | 8(20.0) |
| 5.0 | — | 40 | 26(65.0) | 5(12.5) |
| 5.0 | 1.0 | 40 | 34(85.0) | 5(12.5) |

a) Basic medium for regeneration: N₆+sucrose(30 g/1)+Gelrite(2 g/1).

Inoue와 Maeda⁸⁾는 thiamine이 添加된 培地에서 生長한 callus는 器官分化力이 높다고 하였고, 坂와 前田¹⁵⁾는 벼의 callus培養에서 CH는 器官分化를 助長한다고 하였으며, 成과 孫¹⁶⁾은 callus 誘起 및 植物體 再分化 培地에 CH를 添加하면 綠色點 發生率과 植物體 再分化率이 增加되며 2g/1 添加하는 것이 가장 效果的이었다고 하였다. Vasil과 Vasil¹⁷⁾은 禾本科 作物의 callus培養에 알맞는 2,4-D濃度는 1.0~2.5mg/1이라고 하면서 可及的 2,4-D濃度를 낮추는 것이 效果的이라고 하였다. Inoue와 Maeda⁹⁾는 벼의 callus를 NAA가 含有된 培地에 培養한 後 kinetin이 添加된 培地로 移植하면 綠色點의 發生이 增加된다고 하였고, Chen等⁴⁾은 벼의 花粉小孢子에서 由來된 callus를 NAA와 kinetin이 混用된 培地에 移植하면 再分化率이 높아진다고 하였다. 本 實驗에서도 callus誘起培地の 組成에 따라 callus形成量과 植物體 再分化率은 다르게 나타났는데 2,4-D 1mg/1, MI 200mg/1, TH 2mg/1 및 CH 2g/1를 添加한 N₆培地에서 callus의

生長重도 가장 무거웠고 植物體 再分化率도 높게 나타났으며, 植物體 再分化率은 NAA 1.0mg/1와 kinetin 2.0mg/1가 添加된 培地에서 가장 높게 나타났다. 表 2에서 callus의 生長量도 많고 再分化力이 높았던 培地(N₆+2,4-D 1mg/1+MI 200mg/1+TH 2mg/1+CH 2g/1+sucrose 30g/1+Gelrite 2g/1)에 "盈德벼"와 "Koshihikari"의 完熟玄米를 培養하여 2週 間隔으로 1.0~1.5mm크기의 callus를 繼代培養하면서 E-callus의 發生率과 植物體再分化率을 調査한 바, "盈德벼"의 경우는 2~3回 繼代培養되었을 때 callus의 表面이 희고 compact하면서, nodular한 E-callus(그림 2)의 發生이 크게 增加하여 4回 繼代培養된 callus에서는 E-callus의 發生率이 72%나 되었고 5~6回 繼代培養되어도 거의 비슷한 水準으로 維持되는 傾向이었다. 그러나 "Koshihikari"의 경우는 3回 繼代培養에서는 33%의 E-callus 發生率을 보였으나 그 이후는 서서히 減少하는 傾向이었다(그림 3). 그리고 繼代培養 回數別 植物體再分化率(표 4)에서도 "盈德벼"

는 2回 繼代培養에서 45.8%의 높은 再分化率을 보였으나 “Koshihikari”는 6.1%로 매우 低調하였다.

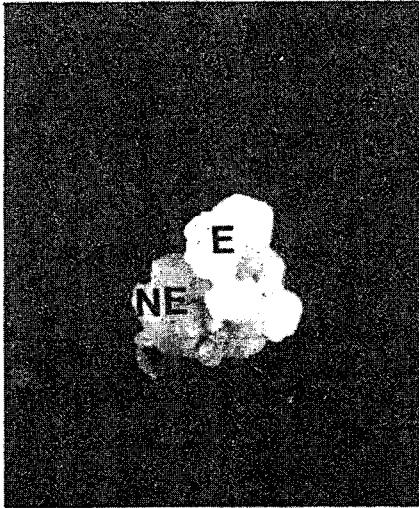


Fig. 2. Embryogenic(E) and nonembryogenic (NE) regions of rice callus.

Nabors等¹²⁾은 벼의 callus培養에서 E-callus는 NE-callus에 비해 植物體 再分化率이 顯著히 높았다고 하였고, Abe와 Futsuhara²⁾는 벼의 뿌리組織에서 由來된 callus를 繼代培養하면서 不定胚 發生量과 再分化率을 調査한 바,

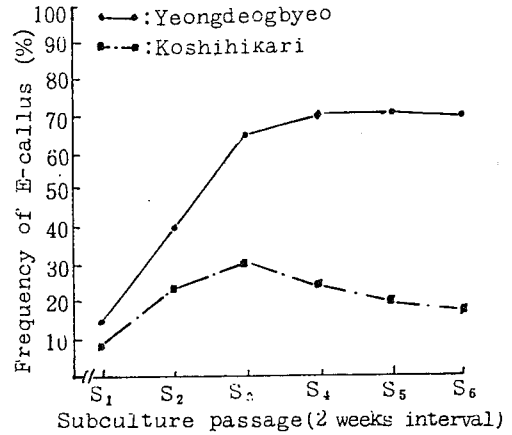


Fig. 3. Effect of subculture passages on frequency of embryogenic callus formation.

品種에 따라 差異는 있었으나, kinetin(1~10 mg/1)과 CH(2 g/1)가 添加된 培地에서 植物體 再分化率이 가장 높았으며 “Chyokoto”와 같은 品種은 繼代培養이 거듭되면 再分化力이 크게 低下된다고 하였다.

Table 4. Relationship between subculture passage and plant regeneration

| Cultivar | S ₁ ^{a)} | | S ₂ ^{a)} | |
|---------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | No. of calli transferred | No. of plants regenerated(%) | No. of calli transferred | No. of plants regenerated(%) |
| Yeongdeogbyeo | 40 | 5(12.5) | 48 | 22(45.8) |
| Koshihikari | 50 | 5(10.0) | 49 | 3(6.1) |

a) S₁ and S₂ mean subculture passages with two-week intervals.

一般적으로 벼의 callus를 繼代培養하면 植物體 再分化力이 크게 低下하는 것으로 알려져 있으나, 以上の 研究結果에서와 같이 品種에 따라서는 4週間隔으로 繼代培養하여도 再分化力이 比較的 높게 維持되는 品種도 있었으나 대체로 2週間隔으로 繼代培養하는 것이

보다 效果的인 것으로 나타났다. 그리고 callus形成 및 繼代培養培地에 CH, TH, MI等を 添加하면 E-callus의 發生과 植物體 再分化率이 多少 增加되는 傾向이었고, 植物體 再分化에는 NAA와 kinetin을 混用하는 것이 效果的인 것으로 나타났다.

摘 要

벼 完熟玄米의 胚로부터 誘起된 callus의 繼代培養에 影響을 미치는 繼代培養 回數, 期間 및 培地內에 添加되는 生長調整劑의 組成等과 같은 몇가지 要因에 대한 實驗을 遂行하여 얻어진 結果는 다음과 같다.

벼 callus의 繼代培養은 4週間隔보다는 2週間隔으로 培養하는 것이 效果的이었고 植物體 再分化率은 品種과 繼代培養 期間에 따라 크게 相異한 것으로 나타났다. “允德벼”의 경우는 2週間隔으로 4回 繼代培養된 callus에서 72.5%의 가장 높은 再分化率을 보였으며, 4

週間隔 2回 繼代培養된 callus에서도 58.3%의 再分化率을 보였다.

Callus誘起 培地에 CH(2g/1), MI(200mg/1), TH(2mg/1)等を 添加하면 callus生長量도 많았고 植物體 再分化率도 向上되었으며, 植物體 再分化에는 kinetin單用보다는 kinetin과 NAA를 混用하는 것이 效果的인 것으로 나타났다.

Callus 繼代培養에 CH, MI, TH 等を 添加한 培地를 利用하면 embryogenic callus의 發生量이 增加하는 경향이었고 品種에 따라서는 植物體 再分化率도 높게 維持되는 것으로 나타났다.

引 用 文 獻

1. Abe, T. and Y. Futsuhara: 1984, Varietal difference of plant regeneration from root callus tissue in rice, Japan J. Breed., 34: 147-155.
2. Abe, T. and Y. Futsuhara: 1985, Efficient plant regeneration by somatic embryogenesis from root callus tissue of rice, J. Plant Physiol., 121: 111-118.
3. Chandler, S.F. and I.K. Vasil: 1984, Optimization of plant regeneration from long term embryogenic callus culture of *Pennisetum purpureum*, J. Plant Physiol., 117:147-156.
4. Chen, C.C., H.S. Tsay and C.R. Huang: 1986, Rice: Factors affecting androgenesis, In: Y.P.S. Bajaj(ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry 2, Springer-Verlag, Berlin, pp.123-138.
5. Chu, C.C., C.C. Wang, C.S. Sun, C. Hsu, K. C. Yin, C.Y. Chu and F.Y. Bi: 1975, Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources, Sci. Sin., 18:659-668.
6. Constabel, F.: 1984, Callus culture: Induction and maintenance, In: I.K. Vasil(ed.), Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 1. Academic Press, Orlando, Florida, pp.27-35.
7. Heyser, J.W., T.A. Dykes, K.J. De Mott and M.W. Nabors: 1983, High frequency, long term regeneration of rice from callus culture, Plant Science Letters, 29:175-182.
8. Inoue, M. and E. Maeda: 1980, Thiamine as a factor of organ formation in rice callus cultures, Japan Jour. Crop Sci., 49(1): 1-7.
9. Inoue, M. and E. Maeda: 1980, Effects of auxins and cytokinins on the occurrence of green regions in rice callus cultures, Japan Jour. Crop Sci., 49(2):167-174.
10. Kavi Kishor, P.B. and G.M. Reddy: 1986, Regeneration of plants from long-term cultures of *Oryza sativa* L., Plant Cell Reports, 5: 391-393.
11. Kavi Kishor, P.B. and G.M. Reddy: 1986, Retention and revival regenerating ability by osmotic adjustment in long-term cultures of four varieties of rice, J. Plant Physiol., 126:49-54.
12. Nabors, M.W., J.W. Heyser, T.A. Dykes and K.J. De Mott: 1983, Long-duration, high-frequency plant regeneration from ce-

- real tissue cultures, *Planta*, 157:385–391.
13. Narayanaswamy, S.: 1977, Regeneration of plants from tissue cultures, In: J. Reinert and Y.P.S. Bajaj, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Springer-Verlag, Berlin, pp.179–206.
 14. Pierik, R.L.M.: 1987, *In Vitro Culture of Higher Plants*, Martinus Nijhoff Pub., Dordrecht, Netherlands, pp.95–100.
 15. 坂齊, 前田英三: 1969, イネ胚起源カルスからの器官形成に對するカイネチンの効果, 日本作物學紀事, 第38卷:668–674.
 16. 成康洙, 孫再根: 1990, 벼 種子由來 callus의 生長과 植物體分化에 關여하는 要因, 韓植組誌, 17(1):23–32.
 17. Vasil, V. and I.K. Vasil: 1984, Induction and maintenance of embryogenic callus cultures of *Gramineae*, In: I.K. Vasil(ed.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 1. Academic Press, Orlando, Florida, pp.36–42.
 18. Wang, W.C. and H.T. Nguyen: 1990, A novel approach for efficient plant regeneration from long-term suspension culture of wheat, *Plant Cell Reports*, 8:639–642.
 19. Yeoman, M.M. and A.J. Macleod: 1977, Tissue(callus) cultures techniques, In: H. E.Street(ed.), *Plant Tissue and Cell Culture*, Univ. of California Press, Berkeley and Los Angeles, pp.31–60.
 20. Ziauddin, A. and K. J. Kasha: 1990, Long-term callus cultures of diploid barley (*Hordeum vulgare*), I. Auxin effects on culture initiation and maintenance, *Euphytica*, 48:171–176.