

유자(*Citrus junos* SIEB.)의 접합배로부터 캘러스 유도 및 식물체 재분화

박민희 · 정휘현 · 이숙영¹ · 김홍섭*

조선대학교 자연과학대학 생물학과, 유전공학과¹

Plant Regeneration from Zygotic Embryo-Derived Callus in *Citrus junos* SIEB.

Min Hee PARK, Hye Hyun CHUNG, Sook Young LEE¹, and Hong Sub KIM*

Department of Biology; and ¹Department of Genetic Engineering, Chosun University, Kwang-ju, 501-759. Corresponding author.

Calli were successfully induced from immature embryos of *Citrus junos* SIEB. cultured on 1/2 MS medium supplemented with 44.4 μ M BA. Plant were regenerated from immature embryo derived callus on MS medium with 5 μ M BA. The calli were morphologically characterized by two types: one was whitish and the other was yellowish. After 16 weeks of culture, shoots and roots were formed on calli. Plantlets were transplanted to soil and successfully grown to a whole plant. Also, the arrangement of the cells showed many differences according to developmental stages of callus and organogenesis. The small cells were compact in callus cultured for 6 weeks and the extended cells which divided actively appeared in it after 8 weeks of culture. The globular protrusion of compacted cells occurred in callus after 10 weeks of culture, and the neighboring cells were liquefied. Oil sac surrounded by the liquefied cell was observed in the leaf and was formed by rupture of liquefied cells.

Key words: oil sac, organogenesis

식물의 세포 및 조직을 기내배양하여 유기된 재분화 식물체로부터 농업적으로 유용한 변이체의 생산이 가능하여짐에 따라 조직배양기술은 세포수준에서 변이체를 선발할 수 있는 육종학적 수단으로 사용되고 있다. 본 실험에 사용한 유자(*Citrus junos* SIEB.)의 재배는 다습하고 연평균 기온이 12 ~ 15°C 가량되는 지방이 적절하며 비교적 세포액의 삼투압이 높고 조직의 동사점이 -9°C 정도로서 활엽 상록수로는 내한성이 강한 식물이며(Kim, 1989), 현재 남해안 섬 지방 일대에서 경제성 작물로 재배가 급격히 증가하고 있는 수종이다.

조직배양은 유용식물의 germplasm의 보존이나 무병주의 증식 및 우수품종의 대량증식을 가능케 하였다(Rech and Pires, 1986). 최근 조직배양을 통한 목본류의 재분화 연구가 몇몇 수종에서 이루어지고 있는데 김 등(1992)의 기내배양에 의한 황벽나무의 대량증식 및 도양활착에 관한 연구에서 황벽나무의 측아로부터 식물체 재분화를 시도하여 shoot의 대량증식과 발근 및 줄기의 생장에 적합한 배지와 생장 조절제의 조성 등을 보고하였고, 왕벚나무의 영양아를 이용

한 김 등(1993)의 연구에서도 식물체 대량증식에 미치는 배지, 식물생장조절물질 및 압처리 효과 등을 조사하여 4.0 mg/L GA₃와 0.4 mg/L BAP가 첨가된 GD배지에서 신초의 형성이 가장 양호했음을 관찰한 바 있다.

목본식물의 증식은 접목, 삽목 등의 전통적인 방법에 의존해 왔으나 이러한 방법으로는 증식시키기 어려운 수종이 많으며(Yadav et al., 1990), 조직배양을 통하여 생성되는 식물체들이 형태적, 유전적인 변이가 많이 생기며(Baruah and Bordloi, 1989) 세포의 세대가 거듭될수록 재분화능이 감소하는 등의 문제점이 있어 초본류에 비해 연구가 미흡한 실정이다(Smith and Street, 1974). 따라서 본 연구에서는 목본류의 조직배양을 통한 재분화 과정을 확립하기 위하여 유자의 미성숙 배로부터 캘러스를 유도하고 여기에서 직접 식물체로 재분화 되기까지의 과정과 배지 조성 및 배양조건을 제시하고 그에 따른 조직의 변화양상을 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 배배양

본 실험에 사용한 유자(*Citrus junos* SIEB.)는 전남 완도군 고금면 상정리에 분포되어 있는 것으로 봄가지(3월)에 착생하여 개화일로부터 30일된 미숙열매와 10월 하순의 성숙열매를 사용하였으며 봄가지와 여름가지의 잎중 조직이 유연한 어린 잎만을 육안으로 식별하여 채취하고 실험재료로 이용하였다.

감귤의 종자는 종류에 따라 단배(單胚)와 다배(多胚)가 있는데 유자는 언제나 단배이다(Ham et al., 1978). 유자의 성숙 종자는 1~1.5 cm 정도의 크기이며 미숙종자로부터 종피를 벗기면 쉽게 배를 분리할 수 있다. 실험에 사용할 미숙 열매와 성숙열매를 무균대에서 살균수를 이용하여 세척한 후 멸균된 해부용칼과 핀셋을 이용하여 4등분한 다음 종자를 분리하였다. 분리한 종자는 곧바로 종자의 종피를 제거하고 70%(V/V)에탄올에 10분, 5% sodium hypochloride 용액에 15분간 표면 살균한 후 이것을 멸균수로 3회 수세한 다음, 멸균된 종자로부터 배를 분리해 무균적으로 해부용칼을 이용하여 2-3 mm 크기로 자른 후 절단면이 캘러스유기 배지에 접하도록 치상하여 배양하였다.

캘러스 유도에 미치는 Sucrose, BA 및 배양재료의 부위에 따른 효과

캘러스 유도배지로서 1/2 MS(Murashige and Skoog, 1962)에 sucrose의 농도를 각각 1%, 3%, 6%, 9%로 첨가한 배지를 함유한 배양접시를 각각 10개씩을 만들어 배절편 3개씩 치상한 것을 처리구로 하여 sucrose농도의 변화가 캘러스에 미치는 효과를 조사하였고, BA(6-benzylaminopurin)의 효과는 동일한 1/2 MS배지에 1 μ M, 20 μ M, 44 μ M의 BA를 첨가하여 각각의 캘러스의 유도 상태를 동일한 방법으로 조사하였다. 실험재료로 택한 유자의 미숙 열매와 성숙 열매로부터 캘러스유도를 위해 각각 과피, 배, 배유와 잎을 절취하여 캘러스유도 배지에 치상함으로써 각 배양재료 부위별 캘러스의 유기정도를 확인하였다. 모든 배지는 121°C, 1.5기압하에서 15분간 고압증기 멸균한 후 사용하였다.

광주기와 온도변화에 따른 캘러스의 유도

광주기에 따른 캘러스의 유도정도를 알아보기 위해 형광등을 광원으로하여 2,000 lx로 각각의 처리구에 1일당 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h, 24 h 동안 광조사 하였으며 이와함께 24°C에서 28°C까지 온도를 달리 배양하여 1°C상승함에 따른 캘러스 유도정도를 관찰하였다.

식물체의 재분화유도

기내배양으로부터 기관형성을 위해 캘러스유도 배지에서 형성된 캘러스를 3% sucrose와 44.4 μ M BA가 첨가된 MS배지에 치상하였다. 유도된 캘러스의 표면에 형성된 크고 작은 구형의 돌기들이 포함되도록 캘러스를 절단하여 2주 간격으로 계대배양 하였다. 재분화의 유도는 26°C, 습도 50%, 조도 2,000 lx의 형광하에서 16h의 광주기와 8h의 암주기로 배양하였으며 지속적인 계대배양을 통해 30주 후에는 5 cm 정도로 성장한 소식물체를 관찰하였고 이를 배지에서 분리하여 화분에 이식하였다.

형태학적 관찰

실험재료로 미숙 열매와 성숙 열매로부터 채취한 종자를 사용하였고, 캘러스의 재분화 과정을 형태학적으로 관찰하기 위하여 분화가 이루어지는 캘러스 부위와 비분화 캘러스 부위를 따로 분리하여 4% FAA, 0.5% glutaraldehyde 용액에 고정된 후, 알코올로 탈수한다음 epon 용액에 포매하였다. 포매된 시료는 rotary microtome (LKB)으로 8~15 μ m의 연속절편을 제작하여 toluene blue로 염색한 후 광학 현미경(Olympus \times 400)으로 각 단계별 조직의 변화를 관찰하였다.

결과 및 고찰

캘러스유도에 미치는 Sucrose, BA 및 배양재료에 따른 효과

배양 6주 후부터 캘러스가 유도되기 시작하였는데 배지에 접한 절단면에서부터 연한 노란색의 캘러스가 발생하였다(Fig. 1B, C). 이것은 절단면이 넓을수록 더 빠르고 양호하게 유도되었다.

Sucrose 농도를 1%, 3%, 6%, 9%로 각각 10개씩 처리를 하여 캘러스 유도를 조사한 결과 3% sucrose에서 캘러스 형성 속도나 양에 있어 다른 처리구에 비해 2주 정도가 빨랐는데 10개의 처리구에서 거의 비슷하게, 가장 양호한 결과를 보였다. 6%에서도 캘러스 형성속도가 2~3일 정도 약간 늦었을 뿐 큰 차이는 없었으나 1%와 9%에서는 캘러스 유도를 거의 관찰할 수 없었다.

Kochba(1977)은 감귤류에서, May와 Trigiano(1990)는 *Dendranthema grandiflora*의 체세포배 발생에 있어서 15%까지의 sucrose첨가는 농도가 높을수록 효과적이라고 하였으며 John(1987)이 행한 실험에서도 12%의 고농도 sucrose에서 체세포배를 유기한 후 3% 저농도 sucrose로 계대배양하여 실험한 바 있다. 본 실험에서는 광조사시 3%의 sucrose

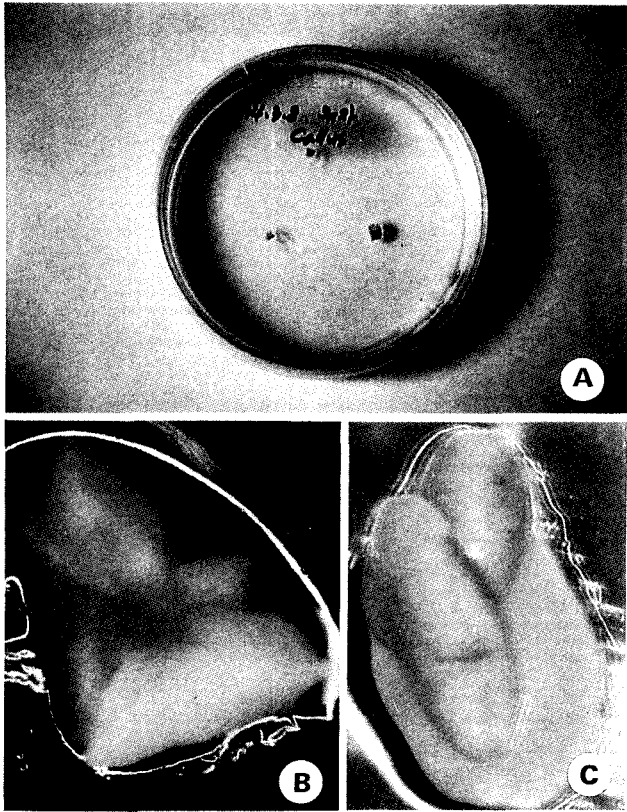


Figure 1. *C. junos* embryo culture on 1/2 MS medium supplemented with 44.4 μ M BA (x 100). A: Embryos excised from seeds, B: Embryo after 2 weeks of culture, C: Proliferating callus after 8 weeks of culture.

Table 1. Effects of BA on callus induction.^a

Explant	BA (μ M)			
	1	20	44.4	
Immature	Leaf	+	++	+++
	Pericarp	-	-	+
	Embryo	++	+++	++++
	Endosperm	+	+	++
Mature	Leaf	-	+	++
	Pericarp	-	-	-
	Embryo	+	++	+++
	Endosperm	-	-	+

^aDegree of callus induction: - : none, + : rare, ++ : moderate, +++ : good, ++++ : excellent.

가 캘러스 유도과 기내 재분화에 더 효과적이었다.

각 배양재료 및 부위에 따른 캘러스유도 정도는 44.4 μ M BA가 첨가된 캘러스유도 배지에서 미숙 종자의 배로부터 가장 많은 캘러스가 유도되었으며 미숙 앞에서의 유도도 양호하였다. 그러나 성숙한 조직의 경우는 배라 할지라도 미숙 종자의 배와는 다소 차이가 있었으며 성숙열매의 과

피조직에서는 캘러스유도가 거의 이루어지지 않았다. 본 실험을 통하여 같은 조직의 절편이라도 성숙도에 따라 상당한 차이가 있음을 관찰할 수 있었다(Table 1). 이러한 결과는 성숙도가 다른 여러 종류의 절편으로부터 배발생 캘러스 및 체세포배를 유도할 경우에는 재료식물의 성숙도가 어릴수록 체세포배의 유도가 잘 이루어 진다고 보고한 Troliner와 Goodin(1988)의 결과와도 일치하였다.

본 실험에서 생장조절제로 사용한 BA는 44.4 μ M일때 캘러스 유도가 가장 잘 이루어 졌으며 이러한 BA의 농도는 다른 수종에 비해 높은 것으로 볼 수 있는데 Kobayashi 등(1990)의 navel orange (*C. sinensis* Osb.)를 사용한 식물체 재분화실험에서 캘러스유도시 10 mg/L(44 μ M) BA를 사용하여 좋은 결과를 얻었고 또한 김 등(1992)이 행한 황벽나무의 대량증식 실험에서도 BA의 최적농도가 44 μ M로 알려졌는데 이는 목본식물의 조직이 초본류에 비해 치밀하여 생리적 반응이 용이하지 않기 때문이라는 견해를 밝힌 바 있다.

광주기와 온도변화에 따른 캘러스의 유도

일반적으로 식물에서의 캘러스유도는 암상태에서 행해진다. 오 등(1993)은 체세포배 발생을 통한 대추(*Zizyphus jujuba* Miller)의 재분화과정에서 배발생 캘러스 유도시에 1일 16 h의 광주기로 1,700~2,000 lx의 빛을 조사하였고 Kobayashi 등(1990)이 navel orange (*C. sinensis* OSBECK.)로 행한 실험에서도 25°C, 1일 16 h 광조사시 캘러스 유도가 양호했음을 보고하여 조도 2,000 lx를 16 h 조사했을 때 캘러스가 가장 왕성하게 유도되는 것을 확인한 본 실험과 일치하며 특히 Citrus속의 경우에는 광조사시에 더 양호하게 유기된다고 밝힌 한 등(1993)의 견해와도 일치한다(Table 2).

본 실험에서는 유도된 초기의 캘러스는 담황색을 나타냈는데 매끄러운 표면에 많은 크고 작은 돌기들을 형성하였으며, 이것은 점점 백색의 단단한 구형의 돌기들로 발달하

Table 2. Effects of illumination time in 1/2 MS medium supplemented with 44.4 μ M BA on callus induction.^a

Time (h/day)	Temperature (°C)				
	24	25	26	27	28
4h	-	-	+	+	-
8h	+	+	++	+	+
12h	+	++	+++	+++	+++
16h	++	+++	++++	++++	++++
20h	+	++	+++	+++	+
24h	+	+	++	+	+

^aDegree of callus induction: - : none, + : rare, ++ : moderate, +++ : good, ++++ : excellent.

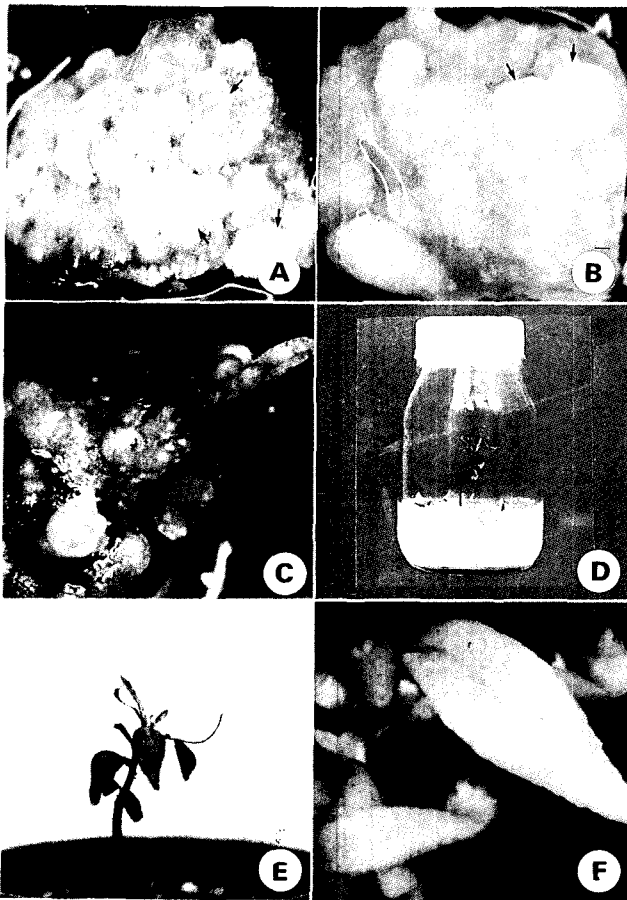


Figure 2. Plant regeneration from immature embryo-derived callus of *C. junos*. A: After 12 weeks; B: After 16 weeks (Arrows indicate callus to be differentiated.); C: After 20 weeks (Arrow indicate leaf primordia.); D: Root formation after 22 weeks; E: A whole plant transplanted to pot for acclimatization; F: Mature leaves of a regenerated plant.

였으며 이와는 달리 매끄러운 담황색에서 균열화된 암갈색 캘러스로 변하는 작은 돌기들로 관찰되어졌다(Fig. 2A, B).

이 돌기들은, 구기자나무의 엽육으로부터 기관형성을 유도하는 과정 중 소수의 체세포배가 형성되었다고 한 박 등 (1993)의 보고에서 처럼 배발생 캘러스로 사료된다. 식물조직으로부터 유도된 캘러스는 전형적으로 염색체 수가 증가하거나 감소하는 등 불안정한 상태에 있으며, 일반적으로 급속히 증식하는 캘러스일수록 변이의 발생빈도도 많은 것으로 알려져 있다. 동일한 조건에서 배발생 캘러스의 발생 빈도는 20%로 아주 저조했다. 그러나 캘러스유도 후 재분화에 있어서는 표면에 많은 크고 작은 돌기를 가지고 있는 캘러스가 83%의 재분화율을 나타냈고 캘러스중 8.3%는 잎과 줄기가 분화되면서 동시에 뿌리가 형성되는 재분화되는 것을 보여주었다. 분화가 이루어지는 캘러스 부위와 비분화 부위의 조직에서는 작은 세포들로 이루어져 조밀하게 분열하고 있는 세포들이 관찰되었으며 각 세포에서는 뚜렷



Figure 3. Optical microscopy of induced primordium from callus and leaf($\times 400$). A: Callus cultured for 6 weeks. (Arrows indicated embryogenic clumps.) B: The callus after 8 weeks. C: Callus after 10 weeks. D: Developed oil sac in leaf after 20 weeks. E: Oil sac of mature leaf. (Arrows indicate epidermis of leaf.)

한 핵과 풍부한 세포질 등이 액포화된 비분화 캘러스의 세포들과는 대조적인 특징을 보였다.

Figure 3A는 캘러스 유도 초기단계로서 배양 8주째의 캘러스이며 분화가 이루어지는 캘러스 부위에서 표면의 크고 작은 돌기들이 진하게 염색되는 것을 관찰하였다.

식물체 재분화 및 형태학적 관찰

캘러스 표면이 잘 발달된 배양 12주된 캘러스에서 색이 가장 밝게 변한 부위가 포함하도록 절단하여 5 μ M BA가 첨가된 재분화 유도 MS 배지에 치상하였다. 배양 16주후 지름이 5 mm 정도로 가장 밝고 잘 발달된 구형의 캘러스로부터 shoot가 형성 되었고, 20주후부터는 육안으로 확인 가능한 묘조가 출현하였다(Fig. 2C). 또한 22주째부터는 shoot 밑 부위에서 근단 분열조직이 활발하게 발달되는 것을 관찰하였다(Fig. 2D).

배양 20주부터 육안으로 확인 가능한 잎과 줄기가 분화되기 시작한 묘조가 출현하였다(Fig. 2C). 뿌리는 세근의 발생

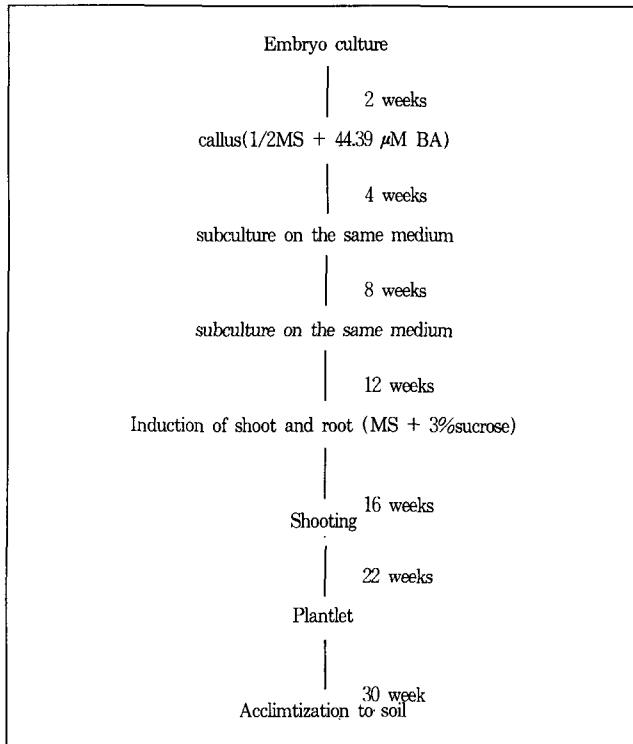


Figure 4. Protocol for organogenesis from embryo-derived callus in *C. junos* SIEB.

이 거의 없었고 지속적인 배양에서도 새근의 발달없이 주근만 계속하여 발달하였다. 배양 26주에 묘조로부터 제1엽이 발달하였고 1주일후에 곧 제2엽이 출현 하였다. 2주 간격으로 두번 계대배양한 후 약배양 30주경에 5 cm 정도 자란 식물체를 화분에 이식하였다(Fig. 2E). 이식 초기에는 간접광 하에 식물체를 방치한 다음, 1주일후에는 낮은 광(약 1,000 lx)에 3~4 h동안 노출 시켰고 2주일후에는 6~8 h 노출 시켰으며 3주일 후부터는 26°C, 습도 50%, 그리고 조도 2,000 lx하에서 배양하였다. 줄기의 발달은 화분에 이식한 후 계속적인 성장을 보였지만 측지의 발달은 저조하였다. 캘러스 발생단계에 따른 광학현미경적 구조에서 배양 6주된 캘러스의 경우에는 세포가 아주 작고 치밀하며 세포내 전자 밀도가 가득차 염색이 진하게 되었으며 배양 8주된 캘러스에서는 분열이 시작되었는데 이들 세포들이 나중에 원시목부와 원시 사부로서 유조직으로 발달하게 된다(Fig. 3A, B).

배양 10주경에는 캘러스 표면에 많은 크고 작은 돌기들이 해부현미경 관찰시와 같이 나타났으며 이들 중 가장 밝은 부분에서부터 shoot가 일어나기 시작했다(Fig. 3D). 배양 20주경부터는 잎과 줄기가 분화되기 시작하는 묘조를 관찰할 수 있었는데 이 묘조의 치밀한 표피세포 하층에 크고 작은 유낭이 발달되어 있었다(Fig. 3D). 유낭의 이를 둘러 싸고 있는 액포화된 액상세포들이 최내층부터 탈락되어지는 파생적 방법에 의해서 발달됨을 알 수 있었다(Fig. 3E). 유낭

은 하나의 세포가 변형된 것이 아니고 주로 표피세포 부근의 일부 세포군의 세포에서 액포가 구형으로 변하면서 액포화된 세포들이 길게 변형되고 그로인해 세포군의 중앙의 세포간극이 계속적으로 신장된다. 따라서 세포간극이 구형으로 신장되면서 강(腔)을 형성하게 되고 이 강에서 내부에 접해있는 세포들은 세포벽이 희미해지면서 서서히 탈락하여 유낭이 발달한다. 이 유낭은 유조직의 분비선과 연결되어 유즙이 모이게 되고 또 분비되며, 탈락된 세포의 내용물과 세포벽 잔유물들까지 포함하게 된다. 이러한 유낭의 형성과정을 파생적 형성이라고 한다(Lim et al, 1991). 목본식물의 경우 재분화와 탈분화가 어려울 뿐만 아니라 기내배양 방법이 1년생 초본류에 비하여 많이 연구되어 있지 않다(Lee and Park, 1989). 또한 대부분의 배조직의 절편에서 유래된 캘러스가 높은 재생력을 나타내지만 성장한 식물체의 분화된 세포는 재생력이 없는 것으로 알려져 있다(Reilly and Washer, 1977). 따라서 차후의 연구는 고등식물에서의 효과적인 캘러스 유도 및 재분화 방법과 재분화된 식물체를 대상으로 형태·생리 및 유전적인 연구가 수행되어야 할 것이며 보다 형질이 우수한 변이체를 선별하는 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

적 요

유자의 배양에 의한 캘러스의 유도는 미숙열매의 배로부터 가장 양호하게 유지되었다. 이들 캘러스는 3% sucrose와 44.4 μM BA가 첨가된 1/2 MS배지에 치상하였을 때 가장 잘 유도되었으며 배양조건은 26°C에서 2,000 lx로 16 h의 광주기와 8 h의 암주기로 배양하였다. 이들 캘러스는 담황색으로 표면에 크고 작은 많은 돌기들을 가지고 있는 캘러스와 암갈색의 캘러스가 관찰되었다. 또한 캘러스 발달 단계와 기관분화의 정도에 따라서 세포배열 양상에 많은 차이가 있었는데, 배양 6주된 캘러스는 작은 세포들이 조밀하게 나타났으며 8주경부터 신장된 세포들이 분열하는 양상을 보여 주었으며 주된 캘러스 표면의 돌기들은 기관 발생의 초기에 구형의 세포돌기가 융기된 반면 주변의 세포들은 액포화된 것으로 나타났다. 배양 16주 후에, 재분화된 shoot는 MS 배지에 이식하였을 때 발근이 되어 정상적으로 성장하였다. Shoot에서는 유관속 형성층과 정유를 함유하고 있는 유낭의 초기 발생과정이 광학현미경으로 관찰되었다. 형성된 shoot를 화분에 이식하였을 때 정상적으로 생장이 계속되는 것을 관찰하였다.

사시 - 본 연구는 1993년도 조선대학교 교내 학술연구비 지원(CRF-93-050)에 의하여 이루어진 것이며 이에 감사 드립니다.

인용문헌

- Baruah A, Bordoli DN** (1989) High frequency plant regeneration of *Cymbopogon martinii*(Roxb) wats by somatic embryogenesis and organogenesis. *Plant Cell Reports* 8: 483-485
- John JF** (1987) Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.) on a high sucrose containing medium. *Plant Cell Rep* 6: 372-374
- Kim CS, Koh JG, Cho RM** (1993) Effects of media, growth regulators and dark treatment in *in vitro* Citrus junospropagation using vegetative buds of *Prunus yedoensis* Matsumura. *Korean J Plant Tissue Culture* 20: 213-219
- Kim HS** (1989) A study on the ultrastructure of leaf and the chloroplastic and the mitochondrial DNA. Ph D. thesis, Graduate school, Tae Ku Univ.
- Kim JH, Goo GH, Choi MS, Park YG** (1992) Micropropagation and soil adjustment of cork tree (*Phellodendron asurens* Rupr.) through in Vitro culture. *Korean J Plant Tissue Culture* 19: 37-42
- Kim YS, Jeon JS, Lee KW** (1993) Plant regeneration from rice microspore cultures *Korean J Bot* 36: 183-192
- Kobayashi S, Sakai A, Oiyama I** (1990) Cryopreservation in liquid nitrogen of cultured navel orange (*Citrus sinensis* OSBECK) nucellar cells and subsequent plant regeneration. *Plant Cell* 23: 15-20
- Kochba J, Spiegel-Roy P** (1977) Embryogenesis in gamma-irradiated ovular callus of the "shamouti" orange as affected by auxin and tissue age. *Environ. Exp. Bot.* 17: 151-159
- Lee SG, Park YG** (1989) Plant regeneration from cambium callus of *Ailant-lus altissima* Swingle. *J Kor Soc* 78: 412-418
- Lim DO, Soh WY** (1991) Comparative anatomy of secondary xylem in normal and dwarf individuals of some wood plants. *Korean J Bot* 34: 9-18
- May RA, Trigiano RN** (1991) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*. *J Amer Soc Hort Sci* 116: 366-371
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. *Physiol Plant* 5: 473-479
- Oh SD, Song WS** (1993) Plant regeneration of Chinese Jujube (*Zizyphus jujuba* Miller) through somatic embryogenesis. *Korean J Plant Tissue Culture* 20: 205-211
- Park YG, Kim BW, Choi MS, Roh KS** (1993) *In Vitro* Organogenesis from leaf callus of *Lycium chinense* Mill. *Korean J Plant Tissue Culture* 20: 85-89
- Rech EL, Pires MJ** (1986) Tissue culture propagation of *Mentha* spp. by the use of axillary buds. *Plant Cell Rep* 5: 17-18
- Reilly K, Washer J** (1977) Vegetative propagation of radiata pine by tissue culture : Plantlet formation from embryogenic tissue. *NZJ for Sci* 7: 199-206
- Smith SM, Street HE** (1974) The dedine of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured. *Ann Bot* 38: 223-241
- Troliner NL, Goodin JR** (1988) Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*.) 1. Effects of source of explant and hormone regime. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 12: 31-42
- Vardi A, Spiegel-Roy P, Galum E** (1982) Plant regeneration from *Citrus* protoplasts: Variability in methodological requirements among cultivars and species. *Theor Appl Genet* 62: 171-176
- Yadav U, Lai M, Jaiswas VS** (1990) *In vitro* micropropagation of the tropical fruit tree *Sygium cumini* L. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 21: 87-92
- 한해룡과 권오균 (1993) 감귤원예신서. 선진문화사

(1995년 4월 2일 접수)