

칼란코에의 줄기 切片 및 葯 培養으로부터 體細胞胚의 發生

李康燮, 蘇雄永, 蘇祥燮

全北大學校 自然科學大學 生物科學部

Development of Somatic Embryos from Stem Segments and Anthers in *Kalanchoe daigremontiana*

Kang Seop Lee, Woong Young Soh and Sang Sup So
Faculty of Biological Sciences, College of Natural Sciences,
Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea

ABSTRACT

In order to induce somatic embryogenesis from the stem explants and anther of *Kalanchoe daigremontiana*, the explants were cultured on MS medium supplemented with auxin (2,4-D, IAA, NAA) and/or cytokinin (BAP) for 8 weeks. Callus from both explants was induced most efficiently on MS medium containing 2.0mg/L NAA and 0.2mg/L BAP. Somatic embryogenesis in stem callus was formed by transferring embryogenic callus from induction media containing growth regulators to medium without growth regulators and then to the medium containing auxin and cytokinin (0.1mg/L IAA and 1.0mg/L BAP). Callus formation occurred actively in the anthers at early uninucleate stage, and by low temperature pretreatment at 4℃ for 3 days. Somatic embryogenesis from the anther callus was induced on MS medium containing 1.0mg/L NAA and 1.0mg/L BAP, 2.0mg/L NAA and 0.2mg/L BAP. The tetraploid of 5.4% was obtained among plants regenerated from anthers.

Key words : somatic embryogenesis, *Kalanchoe daigremontiana*, tetraploid

緒 論

一般的으로 植物生長 調節物質中 2,4-D 첨가배지에서 배양된 세포조직은 高濃度에서 低濃도로 2,4-D를 낮추거나, 아주 제거한 培地에 옮겨 배양하면 體細胞胚의 誘導가 잘 되는 것으로 알려져 있다(Raem 등, 1973; Liu 등, 1984; Choi 등, 1986). 그러나, 植物에 따라서는 2,4-D외의 다른 植物生長調節物質을 要求하는 境遇도 있어서(Steward 등, 1970; Radojevic, 1979), 식물에 따라 要求條件이 다른 것을 알 수 있다.

Kalanchoe속의 식물은 다육식물이며 CAM식물의

일종으로 주로 잎의 가장자리에서 出芽에 의한 무성생식을 하며, 개화에 의한 유성생식을 하므로 관상용으로 이용되고 있다. 2,4-D를 첨가한 배지에서 *Kalanchoe pinnata*의 잎 切片을 培養하여 體細胞胚의 誘導를 Wadhi와 Mohan Ram (1964)이 보고한 바 있으나, *K. daigremontiana*의 組織培養으로부터 體細胞胚의 誘導에 관한 연구는 없는 實情이다.

한편, 식물의 다른 器官에 비해 分化能力이 높은 葯은 半數性的의 花紛외에 二培性的의 組織을 가지고 있으므로, 半數性植物의 誘導뿐 아니라 二倍性 組織으로부터 體細胞胚를 유도하거나 器官分化를 유도할 수 있다(Watanabe 등, 1972). *Datura innoxia*의 어린

藥을 培養하여 小孢子 由來의 胚와 幼植物을 얻은 이후 여러 식물에서 半數體를 誘導할 수 있었다(Guha와 Maheshwari, 1964). 半數性 캘러스의 誘導는 식물에 따라 高溫 (Keller와 Armstrong, 1979; Klimaszewaska와 Keller, 1983) 또는 低溫 (Horner와 Street, 1978)의 前處理 후에 또는 培地에 charcoal을 添加할때 잘 되는 것으로 알려져 있다(Anagnostakis, 1974; Johansson과 Eriksson, 1977; Weatherhead 등, 1978). 그리고, 藥의 발생단계에 따라서도 캘러스 誘導에 영향이 있는 것으로 報告되어 있다(Kameya와 Hinata, 1970; Gresshoff와 Doy, 1972a, 1972b; Ouyang 등, 1973).

그러므로 본 연구에서는 줄기 切片과 分化能이 높은 花器中에서 藥을 培養하여 캘러스 및 體細胞胚의 발생에서 2,4-D의 影響을 밝히며 체세포배를 통한 식물체의 재생의 가능성을 밝히고자 시도되었다.

材料 및 方法

溫室에서 約9個月 정도 재배된 칼란코에 (*Kalanchoe daigremontiana* Hamet et Perr.)의 줄기切片을 移殖材 料로 使用하였다. 藥의 培養은 約9개월 정도 재배된 칼란코에를 約2500Lux의 조도하에서 16시간 암처 (15℃) 및 8시간 조명(23℃)의 條件으로 재배하여 約45 H 經過 後에 形成된 花芽로부터 채취하여 使用하였다(Zeevaart와 Lang, 1962).

줄기 切片과 어린 花芽를 70% ethanol에 1분간, 그리고 1% sodium hypochlorite 용액에 15분간 침적하여 표면 살균한 후, 滅菌水로 3 - 4回 水洗한 다음 약 2mm로 세절하여 各各 1回用 Petridish에 이식하였다. 低溫處理時에는 어린 花芽를 떼어 4℃의 冷藏庫에 aluminum foil로 싸서 보관하였다가 試料로 使用하였다. 培地는 Murashige and skoog 基本培地에 30g/L sucrose, 9g/L agar를 添加하였고, pH는 5.8로 調節하였다. 이 때 添加한 植物生長 調節物質은 IAA, NAA, 2,4-D, BAP을 使用하였다. 藥 由來 植物體의 染色體의 數 調查는 幼根 5mm를 취하여 使用하였으며, Baldwin(1938)의 方法에 따라 이루어졌다.

한편, 두 종류 的 조직을 2.0mg/L NAA와 0.2mg/L BAP가 첨가된 배지에 배양하여 각각 배발생 캘러스를 선발하고, 이를 식물생장조절물질 무첨가 배지 또는 2,4-D, IAA, NAA, BAP가 조합처리된 배지에 이식하여 체세포배의 유도를 조사하였다.

結果

줄기切片의 培養

칼란코에의 줄기절편을 2,4-D의 濃度を 各各 0.1, 0.5mg/L로 단독처리 하거나, 0.1, 0.5, 1.0mg/L 2,4-D에 各各 1.0mg/L BAP를 添加하여 약 8주간 培養하였을 境遇에 캘러스의 誘導가 低調하였으나, 2.0mg/L IAA

Table 1. Effect of growth regulators on callus formation from stem explants and somatic embryogenesis from stem-derived calli of *Kalanchoe daigremontiana*

	Growth regulators (mg/L)		Callus formation	Somatic embryogenesis
	Auxin	BAP		
2,4-D	-	-	-	+
	0.1	-	+	-
	0.5	-	+	-
	0.1	1.0	+	-
	0.5	1.0	+	-
	1.0	1.0	+	-
IAA	0.1	1.0	+	+
	2.0	0.2	+++	-
NAA	2.0	0.2	+++	-
	3.0	0.5	+++	-

-: none, +: poor, +++: good

와 0.2mg/L BAP 그리고 3.0mg/L NAA와 0.5mg/L BAP의 조합處理時에 캘러스의 誘導가 良好하였다 (표1).

2.0mg/L NAA와 0.2mg/L BAP 添加 培養에서 誘導된 胚發生캘러스를 選拔하여 0.1, 0.5, 1.0mg/L 2,4-D의 單獨處理 및 1.0mg/L 2,4-D와 0.2mg/L BAP를 組合 處理하거나 2.0mg/L NAA와 1.0mg/L IAA에 각각 0.2mg/L의 BAP를 添加하여 약 4주간 培養하였을 境遇에 體細胞胚는 誘導되지 않았으며, 0.1mg/L IAA와 1.0mg/L BAP의 組合處理區와 生長調節物質의 非添加時에 誘導되었다(표1, 그림1A, 1B).

藥의 培養

花芽를 約 0.74cm (4분자기), 0.82cm (초기1핵기), 그리고, 1.0cm (2핵기)의 크기별로 採取하여 各各 2.0mg/L NAA와 0.2mg/L BAP의 添加培地에 8주간 培養하여 캘러스의 誘導를 觀察하였는데(그림1C), 4분자기 이후인 초기1핵기의 藥의 境遇에 캘러스의 誘導가 잘 이루어졌다(표2).

또한, 2.0mg/L NAA와 0.2mg/L BAP處理區에서 9.6%의 캘러스 형성률을 나타냈고, 0.5% charcoal을 添加하거나 1.0mg/L의 BAP 單獨處理時엔 캘러스의 誘導가 전혀 일어나지 않았으며, 0.5mg/L NAA와 1.0mg/L 2,4-D에 各各 0.2mg/L의 BAP를 添加했을 境遇에는 各各 5.0 및 5.6%의 캘러스 誘導를 보였다. 0.5mg/L 2,4-D의 單獨處理時엔 0.9%의 낮은 캘러스 誘導率

Table 2. Effect of pollen stage on the callus formation from anthers of *Kalanchoe daigremontiana* after 8 weeks of culture

Stage of pollen	No. of anther cultured	No. of callus formed (%)
Tetrad	233	0 (0)
Early uninucleate	197	19 (9.64)
Binucleate	210	0 (0)

Table 3. Effect of growth regulators and charcoal on callus formation from anthers of *Kalanchoe daigremontiana*

Growth regulators (mg/L)	No. of anther cultured	No. of anther forming callus	Induction rate (%)
NAA(2.0)+BAP(0.2)	197	19	9.6
NAA(2.0)+BAP(0.2)+0.5% charcoal	254	0	0
NAA(0.5)+BAP(0.2)	140	7	5.0
2,4-D(1.0)+BAP(0.2)	177	10	5.6
2,4-D(0.5)+BAP(0.5)	145	10	6.9
2,4-D(0.5)	116	1	0.9
BAP(0.5)	120	0	0

Table 4. Effect of cold treatment (4℃) on callus formation from anther of *Kalanchoe daigremontiana* on MS medium supplemented with 2.0mg/L NAA and 0.2mg/L BAP

Period (Days)	No. of anther cultured	No. of anther forming callus	Induction rate (%)
0	197	19	9.6
3	223	29	13.0
7	180	12	6.7
14	204	12	5.9

Table 5. Effect of growth regulators on somatic embryo formation from anther-derived calli of *Kalanchoe daigremontiana*

Growth regulators (mg/L)	Somatic embryo
2,4-D(0.5)+BAP(0.5)	-
2,4-D(1.0)	-
NAA(2.0)+BAP(0.2)	+
NAA(1.0)+BAP(1.0)	+

-: none, +: poor

을 나타내었으며, 0.5mg/L 2,4-D에 0.5mg/L BAP 추가할 때 6.89%의 캘러스 유도율을 나타내었다(표3).

한편, 약의 배양에 있어 저온처리의 효과를 밝히기 위하여 4℃의 냉동실에서 花芽를 각각 3일, 7일, 14일간 보관하였다가 2.0mg/L NAA와 0.2mg/L BAP의 추가배지에 약 8주간 배양하였던 바, 저온처리 3일의 경우에 13.0%로서 캘러스의 유도가 잘 이루어짐을 알 수 있었다(표4). 2.0mg/L NAA와 0.2mg/L BAP 추가배지의 약으로부터 캘러스 및 체세포배가 직접 유도되었다(그림 1C, 1D), 이 조건에서 유도된 배발생캘러스를 0.5mg/L 2,4-D와 0.5mg/L BAP, 1.0mg/L의 2,4-D 처리구에 이식하여 약 6주간 배양한 경우에는 체세포배의 유도가 일어나지 않았으나, 2.0mg/L NAA와 0.2mg/L BAP, 1.0mg/L NAA와 1.0mg/L BAP의 처리구에 이식한 경우에 체세포배가 형성됨을 관찰할 수 있었다(표5, 그림 1E).

또한, 약의 식물체의 염색체 조사에서 대부분(94.6%)이 2n=34이었으며, 소수(5.4%)가 2n=68(4배체)이었다(그림 1F). 정상 및 4배체 식물체의 형태적 특성을 비교하였을 때, 식물 전체의 키와 잎의 크기에 있어서는 정상식물이 현저하게 컸으며, epiphyllous bud의 형성은 양쪽 모두에서 관찰되었다(그림 1H).

考 察

K. daigremontiana 줄기절편의 배양에서 캘러스의 유도는 IAA나 NAA를 추가한 경우에良好하였으며, 2,4-D의 추가시에는低調하였는데, 이러한 결과는 *K. pinnata*에서 캘러스의 유도는 5.0mg/L 2,4-D 추가시에 잘 되었다는 보고(Wadi 등, 1964)와는 상반되

로 같은屬에서도種에 따라植物生長調節物質에 대한反應이 다른 것으로解釋된다. 한편, 체세포배의 발생은 줄기의 경우에 녹색의 배발생캘러스를 IAA의 농도를 낮추거나植物生長調節物質이 제거된 배지에 이식한 경우에 일어나므로 많은 다른 식물체를 재료로한 연구에서와 같은傾向이었다(Steward 등, 1970; Huber 등, 1978). 그러나, 1.0mg/L의 IAA와 2.0mg/L의 NAA에 각각 0.2mg/L의 BAP를 추가한 경우 및 0.1, 0.5mg/L의 2,4-D單獨處理時에는體細胞胚의 유도가 이루어지지 않았다. 이러한 현상은 5.0mg/L의 2,4-D를 추가하여 농도를 낮추지 않고 계속 배양한 경우에體細胞胚가 유도된 *K. pinnata*의 경우와 다르며(Wadi와 Mohan Ram, 1964), *Tylophora indica*와 *Panax ginseng*의 경우에 2,4-D를 추가하면 배발생캘러스가形成되고, 이를低濃度の 2,4-D 추가배지에 移植하면體細胞胚가 유도된다는結果와 달랐다(Rao와 Narayanaswamy, 1972; Chang과 Hsing, 1980).

한편, 약 배양의 경우에, 4분자기以後인 초기1핵기에 캘러스의 유도가良好하였으며, 4분자기와 2핵기에는 캘러스의 유도가 일어나지 않았으므로 다른 여러 식물에서의 경우와 대체로 같은 경향이었다(Kameya와 Hinata, 1970; Gresshoff와 Doy, 1972b; Ouyang 등, 1973). 그리고, 2,4-D보다는 NAA 추가배양에서 캘러스의 유도가 잘 되었으며, 1.0mg/L BAP 단독처리에서는 캘러스의 유도가 전혀 일어나지 않았다.

또한, 0.5% charcoal을 추가했을 경우에는 캘러스 유도는 일어나지 않았는데, 다른 식물의 경우에는 잘 되는 경우도 있어서(Anagnostakis, 1974; Johansson과 Eriksson, 1977; Weatherhead 등, 1978), 재료의 특성차이로 思料된다. 花芽를 식물체로부터 떼어 4℃의 냉

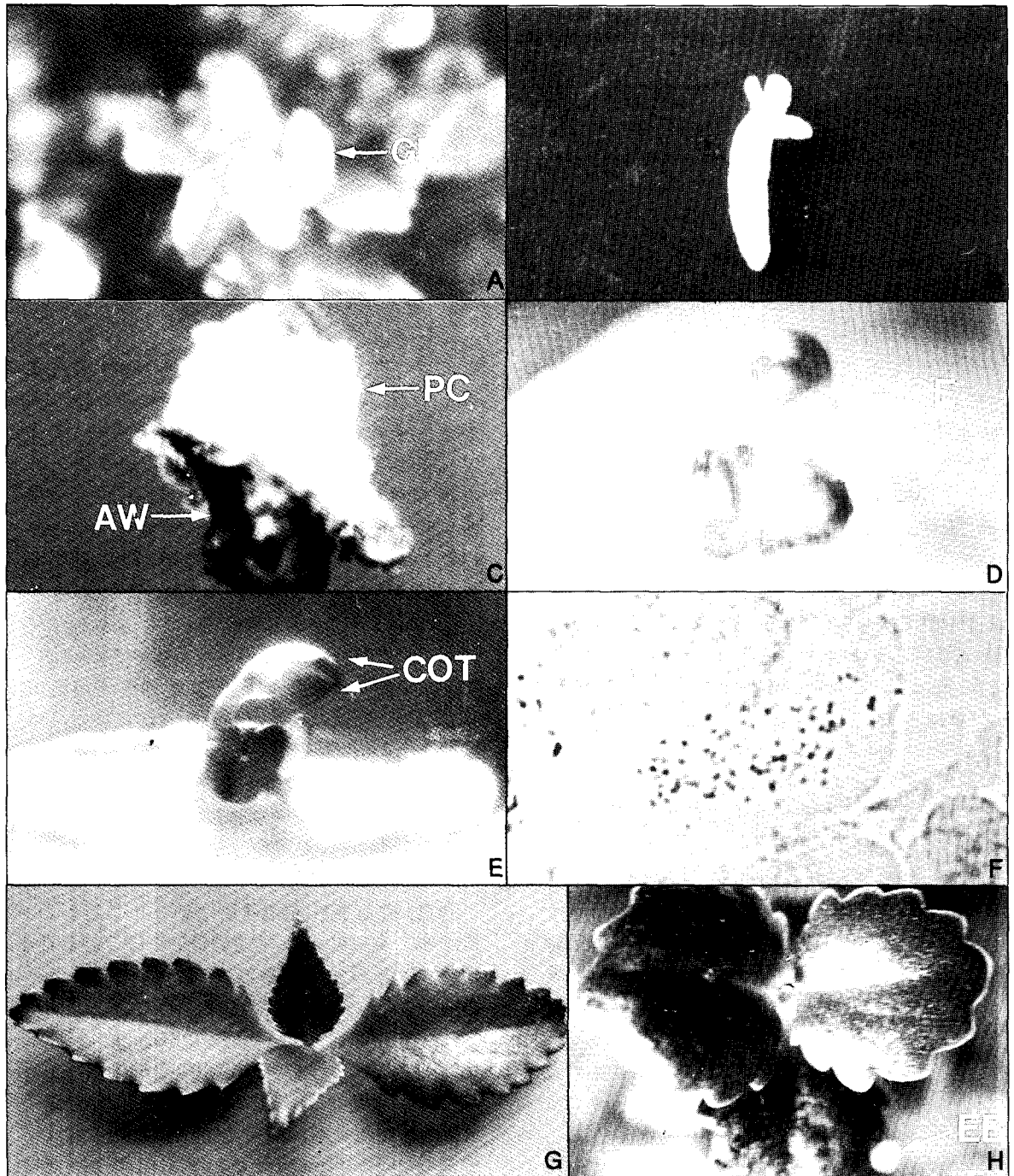


Figure 1. Somatic embryo formation from stem explants and anther in *Kalanchoe daigremontiana*. (A) globular embryo (GE) and (B) cotyledonary embryo formed from stem explant. (C) callus developed from pollens (PC). (D) cotyledonary embryo (CE) developed from anther, (E) a plantlet regenerated from anther-derived callus. COT: cotyledons, RT: roots. (F) a root tip cell ($2N=68$: tetraploid) of plant derived from anther culture (G) diploid plant regenerated from stem explants. (H) a tetraploid plant regenerated from anther-derived calli. EB: epiphyllous bud.

臍庫에 前處理하여 培養 8주 후에 觀察한 결과, 켈러스의 誘導는 3일 前處理한 境遇에 대조구보다 良好하였으며, 7일, 14일간 처리한 境遇에는 대조구보다 더 부진하였다. 이러한 低溫처리효과는 벼 등의 약배양에서도 유효하지만(Mercy와 Zapata, 1987; Kim과 Raghavan, 1988), 高溫의 前處理를 요하는 Brassica속의 식물과는 상반된다(Keller와 Armstrong, 1979; Klimaszewska와 Keller, 1983).

이와같은 온도변화는 化分을 embryogenic하게 해서 配遇體로의 分化能을 抑制하여 造胞體로 되게 하는 것으로 思料된다(Dale, 1975; Horner와 Street, 1978). 2.0mg/L NAA와 0.2mg/L BAP 處理區에서 배양된 약으로부터 유도된 배발생 켈러스를 0.5mg/L 2,4-D에 0.5mg/L BAP를 조합한 배지 및 1.0mg/L의 2,4-D 단독배지에 이식한 境遇에는 體細胞胚가 발생되지 않으므로 2,4-D의 효과에 있어서는 줄기切片의 境遇와 같은 경향이였다.

그러나, 2.0mg/L의 NAA에 0.2mg/L BAP를 添加한 境遇와 1.0mg/L의 NAA에 1.0mg/L BAP 添加時에 體細胞胚가 誘導되어서, 줄기切片에서 2.0mg/L NAA와 0.2mg/L BAP 添加의 境遇와 1.0mg/L IAA와 0.2mg/L BAP添加의 境遇에 體細胞胚의 誘導가 되지 않았던 境遇와는 相異함을 알 수 있었다. 이러한 原因은 줄기와 花器(藥)의 生理的 狀態가 다르기 때문일 것으로 思料된다.

본 實驗에서 藥由來 植物體중 소수(5.4%)가 4배체 이었으며 대부분이 정상 2배체이어서, 半數體의 誘導는 이루어지지 않았는데, 이러한 原因은 켈러스가 약벽 또는 connective region에서 유도되었거나, 化分에서 유도되었더라도 켈러스의 核型이 spontaneous하게 doubling된 것에 기인한다고 解析된다.

이러한 예는 딸기 및 *Solanum melongena*에서 약배양으로부터 유도된 식물체는 모두가 2배체(Raina와 Iyer, 1973) 또는 8배체이었으며(Rosati 등, 1975), hybrid grapevines의 경우 藥由來 켈러스는 반수체와 2배체세포를 가지고 있지만 植物體는 이배체만 誘導되는 경우에서 볼 수 있다(Kajasekaran 등, 1979). *Petunia axillaris*에서는 2핵기의 小胞子를 갖는 약에서만 식물체가 誘導되는데, 한 식물체내에 2배체 경엽부와 3배체 뿌리가 혼합되거나 3배체 및 4배체가 유도되기도 한다(Engvild, 1973). 이와같이 소포자유래 켈러스는

배양도중에 염색체의 變異가 발생하여 半數體의에 2배체 또는 그 이상의 다배체가 형성됨을 알 수 있다.

Ryu등(1992)은 참깨의 약배양시 약의 불합선이 터지고 약의 안쪽에서 형성되는 켈러스를 소포자유래 半數性 켈러스로 간주하였다.

本 연구에서도 약으로부터 켈러스의 유도는 약의 안쪽에서 유도되었는데, 그로부터 재분화된 식물체에는 半數體가 없었다.

따라서 켈러스가 化分에서 유래되었다면 켈러스는 염색체의 변이가 일어난 것으로 추정되며, 만일 染色體의 변이에 의한 것이 아니라면 약벽안쪽의 체세포조직인 tapetum tissue에서 유래되었을 가능성이 있다. 그러므로 켈러스의 起源이 化分 또는 약벽의 어느 쪽에서 되었는지를 究明해야 될 것이다.

摘 要

본 實驗은 칼란코에 (*Kalanchoe daigremontiana* Hamet et Perr.)의 줄기切片과 藥을 培養하여 體細胞胚를 誘導함에 있어서 여러 植物生長調節物質 특히, 2,4-D의 效果를 比較하고자 실시하였던 바, 두 종류의 절편체에 있어서 켈러스 및 체세포배의 유도에 있어 2,4-D는 효과가 없었다. 줄기切片으로부터 켈러스의 誘導는 2,4-D에 비해 IAA와 NAA 添加의 境遇에 양호하였으며, 體細胞胚의 誘導는 胚發生켈러스를 0.1mg/L IAA와 1.0mg/L BAP 處理區인 低濃度의 auxin 處理區와 植物生長調節物質이 添加되지 않은 배지에 移植하여 培養한 境遇에 良好하였으나, 2,4-D의 處理區(0.1- 1.0mg/L)에 移植하여 배양한 경우에는 일어나지 않았다.

또한, 藥으로부터 켈러스의 誘導는, 發達段階別로는 초기 1핵기에서 그리고, 低溫 처리는 4℃에서 3일간 前處理한 境遇에 良好하였고, 2,4-D에 비해 NAA 處理時에 良好하였으며, 그리고 charcoal 處理時엔 전혀 일어나지 않았다.

한편, 體細胞胚의 誘導는 줄기절편에서와같이 2,4-D처리시에는 일어나지 않았으나, 줄기절편의 경우와는 달리 1.0mg/L NAA와 1.0mg/L BAP 처리구와 2.0mg/L NAA와 0.2mg/L BAP 處理區인 高濃度의 auxin 處理區에서 良好하여, 줄기 절편과 약에 있어서 生長調節物質에 대한 반응에 差異가 다소 있음을 알 수 있었

다. 약유래 식물체의 染色體조사결과 대부분이 $2n=34$ 이었으며, 小數 (5.4%)가 4배체이었다.

參考文獻

- Anagnostakis, S.L. 1974. Haploid plants from anthers of tobacco enhancement with charcoal. *Planta* 115: 281-283.
- Baldwin, J.T. 1938. *Kalanchoe*: the genus and its chromosomes. *Am. J. Bot.* 25: 572-579.
- Chang, W.C and Hsing Y.I. 1980. Plant regeneration through somatic embryo genesis in root-derived callus of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Theor. Appl. Genet.* 57: 133-136.
- Choi, Y. E., Yeo, U.D and Soh, W.Y. 1986. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from stem callus of *Cedrela sinensis* Juss. *Korean J. Plant Tissue Culture* 13: 61-70.
- Dale, P. J. 1975. Pollen dimorphism and anther culture in barley. *Planta* 127: 213-220.
- Engvild, K. C. 1973. Triploid petunias from anther cultures. *Hereditas* 74: 144-147.
- Gresshoff, P. M. and Doy, C. H. 1972a. Haploid *Arabidopsis thaliana* callus and plants from anther culture. *Aust. J. Biol. Sci.* 25: 259-264.
- Gresshoff, P. M. and Doy, C. H. 1972b. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta* 107: 161-170.
- Guha, S. and Maheshwari, S. C. 1964. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*.. *Nature* 204: 497.
- Horner, M. and Street, H. E. 1978. Pollen dimorphism-origin and significance in pollen plant formation by anther culture.. *Ann. Bot.* 42: 763-771.
- Huber, J, Constabel, F. and Gamborg, O. L. 1978. A cell counting procedure applied to embryogenesis in cell suspensions of anise(*Pimpinella anisum* L.). *Plant Sci Lett* 12: 209-315.
- Johansson, L. and Eriksson, T. 1977. Induced embryo formation in anther cultures of several *Anemone* species. *Physiol Plant* 40: 172-174.
- Kajasekaran, K. anf Mullins, M. G. 1979. Embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines. *J. Exp. Botany* 10: 399-407.
- Kameya, T. and Hinata, K. 1970. Induction of haploid plants from pollen grains of *Brassica*.. *Jpn. J. Breed.* 20: 82-87.
- Keller, W. A. and Armstrong, K. C. 1979. Stimulation of embryogenesis and haploid production in *Brassica campestris* anther cultures by elevated temperature treatments. *Theor. Appl. Genet.* 55: 65-67.
- Kim, M. Z. and Raghavan, V. 1988. Induction of pollen plantlets in rice by spikelet culture. *Plant Cell Reports* 7:560-563.
- Klimaszewska, K. and Keller, W. A. 1983. The production of haploids from *Brassica hirta* Moench (*Sinapis alba* L.) anther cultures. *Z. Pflanzenphysiol.* 109: 235-241.
- Liu, J. R. and Cantiliffc, D. J. 1984. Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of sweet potato(*Ipomea batata* Poir.). *Plant Cell Reports* 3: 112-115.
- Medaniel, J. K., Conger, B. V. and Graham, E. T. 1982. A histological study of tissue proliferation, embryogenesis and organogenesis from tissue cultures of *Dactylis glomerata*. *Protoplasma* 110: 121-128.
- Mercy, S. T. and Zapata, F. J. 1987. Position of anthers of plating and its influence on anther callusing in rice. *Plant Cell Reports* 6:318-319.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Ouyang, T. W., Hu, H., Chuang, C. C. and Tseng, C. C. 1973. Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured in vitro. *Sci. Sin.* 16: 79-95.
- Radojevic, L. 1979. Somatic ambryos and plantlets from callus cultures of *Paulownia tomentosa* Steud. *Z. Pflanzenphysiol.* 91: 57-62.
- Raina, S. K. and Iyer, R. D. 1973. Differentiation of diploid plants from pollen callus in anther cultures of *Solanum melongena* L. *Z. Pflanzenzuht.* 70: 275-280.
- Rao, P. S. and Narayanaswamy, S. 1972. Morphogentic investigation in callus cultures of *Tylophora indica*.. *Physiol Plant* 27: 271-276.
- Rao, P. S., Handro, W. and Harada, H. 1973. Hormonal control of differentiation of shoots, roots and embryos

- in leaf and stem cultures of *Petunia inflata* and *Petunia hybrida*. *Physiol Plant* 28: 458-463.
- Rosati, P., Devreux, M. and Laneri, U. 1975. Anther culture of strawberry. *HortScience* 10: 119-120.
- Ryu, J. H., Doo, H. S. and Kwon, T. H. 1992. Induction of haploid plants by anther culture in Sesame (*Sesamum indicum* L.) 1. Effects of growth regulators and difference between genotypes on callus induction. *Korean J. Plant Tissue Culture* 19: 171-177.
- Steward, F. C., Mapes, M. O. and Mears, K. 1958. Growth and organized development of cultured cells. *Am. J. Bot.* 45: 705-708.
- Steward, F. C., Ammirato, P. V. and Mapes, M. O. 1970. Growth and development of totipotent cells: Some problems, procedures and perspectives. *Ann. Bot.* 34: 761-787.
- Wadhi, M. and Mohan, Ram. H. Y. 1964. Morphogenesis in the leaf callus of *Kalanchoe pinnata* Pers. *Pyton* 21: 143-147.
- Watanabe, K., Nishii, Y. and Tanaka, R. 1972. Anatomical observatuon on the high frequency callus formation from anther culture of *Chrysanthemum*. *Japan J. Genetics* 47: 249-255.
- Weatherhead, M. A., Burdon, J. and Genshaw, G. G. 1978. Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. *Z. Pflanzenphysiol.* 89: 141-147.
- Zeevaart, JAD. and Lang, A. 1962. The relationship between gibberellin and floral stimulus in *Bryophyllum daigremontianum*. *Planta* 58: 531-542.
- (접수일: 1996년 11월 25일)