

백합 'Gelia' 캘러스로부터 자구 재분화에 미치는 제요인

박소영 · 김시동 · 신세균 · 이철희 · 백기업^{1,*}

충북농촌진흥원, 충북대학교 농과대학^{1,*}

Several Factors on Bulblets Regeneration from Callus Culture in *Lilium longiflorum* 'Gelia'

PARK, So Young · KIM, Si Dong · SIN, Se Kyun · LEE, Chul Hee · PAEK, Kee Yoeup^{1,*}

Chung Buk Provincial RDA, Cheongju, 360-270, Korea; and ¹Department of Horticulture

Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea. *Corresponding author

Callus from scale segments of *Lilium longiflorum* 'Gelia' was effectively induced and maintained from unorganized tissue on the semi-solid medium by 0.42% Bacto agar with MS basal salts and vitamins of SH medium supplemented with 0.5 mg/L 2,4-D, 1.0 mg/L NAA, 0.3 mg/L BA, and 3% sucrose.

More than 5% of high sucrose level had inhibiting effect on regeneration capacity of formed callus and decreased callus growth. Various combinations of nitrogen did not effective to proliferate the ELC (Embryogenic-like callus), but friability of callus was increased in the medium containing only nitrate as nitrogen source. 5 mL conditioned medium into 30 mL fresh medium was good for cell growth. However friable cell aggregates during suspension culture had to form hard callus which hindered to establish suspension culture system. Addition of 2 g/L casein hydrolysate increased callus growth and friability of the hard callus. As a result of anatomical observation of callus, organogenesis such as shoots, roots and bulblets was independently induced from callus tissue. Somatic embryogenesis from callus tissue could be observed with low frequency.

Key words: *Lilium*, callus, liquid culture, embryogenesis

백합(百合)은 국외뿐 아니라 국내에서도 수요가 급증하고 있는 작목으로 '95년 국내 재배면적 172.5ha로 국화, 장미, 안개초 등에 이어 중요한 작목중 하나이다. 백합의 종구생산에 관한 연구는 오래전부터 이루어져 왔으나 조직배양기술의 발달로 더욱 급진전하게 되었다(Paek and Chun, 1982 : Robb, 1957 : Sheridan, 1968). 백합의 인편은 1 mm 두께의 절편에서도 기관분화능이 있어 인편을 이용한 대량증식이 가능하다(Stimart and Aseher, 1978). 이 방식은 유전적으로 안정적이고 조작이 간편하여 널리 이용되어 왔다. 그러나 인편배양이 편리하고 안정적이라는 이유로 캘러스를 경유한 간접적인 종구생산 방식은 국내외적으로 연구가 미진한 실정이다. 종구생산을 위해 캘러스를 배양할 경우 이론적으로 1년에 캘러스 1 g당 6×10^{12} 개 이상의 종구생산이 가능하여 인편배양보다 증식효율이 높으나(Stimart and Jagorski, 1980) 배양조건을 구명하기까지 기간이 오래 걸리

고, 종에 따라서는 배양기간이 길어지면 재분화력이 상실되며 유전적으로 불안정할 수 있다는 등의 문제로 인해 실용화되지 못하고 있다. 그러나 구근류의 캘러스배양은 다른 작목에 비해 유전적 안정성이 비교적 오랜기간 지속되어 (Sheridan, 1974 : Takayama et al., 1991) 신품종의 보급연한을 단축시키기 위해 종종 사용되었다(Kim et al., 1988 : Meyer, 1976).

본 연구는 백합 'Gelia'에 이러한 간접적 생산방식을 적용하고자 인편에서 유도된 캘러스를 유지·증식시키며, 액체배양에 적합한 캘러스를 선발·증식하여 캘러스의 액체진탕배양 단계를 확립코자 실시하였다.

재료 및 방법

캘러스 유지 및 증식

'Gelia' 인편을 0.5×0.5 cm 크기로 조제한 후 NAA 0.5 mg/L, BA 0.5 mg/L가 첨가된 MS배지에서 8주간 암배양하여 캘러스를 얻었다. 유기된 캘러스는 재분화경향이 매우 강하여 MS배지에 당 3%를 첨가한 기본배지에 생장조절제를 2,4-D 0.5~1.0 mg/L, NAA 0.0~1.0 mg/L, BA 0.1~0.7 mg/L 수준으로 첨가하여 재분화를 억제시키면서 캘러스 생육을 증진시키고자 하였다. MS배지의 무기염류에 SH (Schenk & Hilderbrandt)배지의 유기물을 첨가한 MSH배지에 한천 0.42, 0.8%, 젤라이트 0.12, 0.2%를 첨가하여 배지의 견고도가 캘러스 생장에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 당 농도를 10~70 g/L로 달리하였고 질소원의 효과를 구명하기 위해 NO_3^- -N급원으로 KNO_3 를, NH_4^+ -N급원으로 NH_4Cl 을 이용하여 MS배지의 총 질소함량을 기준으로 $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ 비율을 7처리로 조정, 처리하였다. 고형배지 배양시 배지는 고압 멸균전 pH를 5.7~5.75로 조정하여 사용하였고, 배양은 조도 1,500lx, 온도 24 ± 1°C의 배양실에서 실시하였다. 모든 처리의 생육조사는 배양 8주 후 캘러스의 생체중, 생육정도, 조직특성, 색 등을 조사하였다.

액체 진탕배양

캘러스의 안정적인 생육을 위해 conditioned배지를 액체배지에 0, 5, 10 mL씩 첨가하여 최종 배지량이 30 mL가 되도록 하였고 생육조사는 1주 간격으로 배지첨가 없이 6주간 실시하였다. 이때 conditioned배지는 NAA 1.0 mg/L, BA 0.3 mg/L, 당 3%가 첨가된 MSH배지에서 2주 이상 'Gelia' 캘러스의 진탕배양이 진행된 혼탁액을 0.22 μm 필터로 여과하여 이용하였다. 또한 증식된 캘러스가 단단하게 뭉쳐지는 현상을 해결하기 위해 casein hydrolysate를 0.0~4.0 g/L 수준에서 농도별로 첨가하였고 적정 캘러스 접종량을 구명하기 위해 30 mL의 액체배지에 각각 0, 1.5, 3, 6, 9g의 캘러스를 배양하였다. 배양시 캘러스는 고형배지에서 6회 정도 계대배양된 것을 이용하였고, MSH배지에 NAA 1.0 mg/L, BA 0.3 mg/L, 당 3%를 첨가하여 기본배지로 사용하였다. 진탕배양은 130 rpm으로 진행되었고 대부분의 처리는 배양 4주 후 캘러스의 생체중과 부피를 조사하였다.

캘러스의 조직학적 관찰을 위해 1년 이상 계대배양된 캘러스를 FAA액에 고정한 후 탈수과정을 거쳐 paraplast로 포매한 다음 7 μm의 절편을 만들고, TBO (Toluidin-Blue O)로 염색하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

결과 및 고찰

캘러스 유지 및 증식

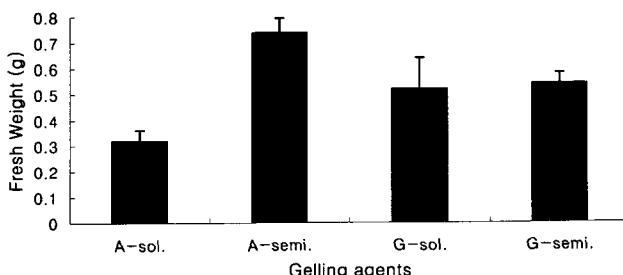
Table 1. Effect of 2,4-D, NAA and BA on callus growth of induced callus from scale segment of 'Gelia' after 8 weeks.

Growth regulators (mg/L)			Fresh wt. (g)	Friability	No. of bulblets/roots (no./explant)	Callus color
2,4-D	NAA	BA				
0.5	—	0.3	1.61c ^a	B ^b	1.5/0.7	G ^c
0.5	1.0	0.3	2.03a	BA	0.3/-	G-Y
0.5	0.5	0.3	1.80b	BA	1.2/0.2	G
0.5	0.3	0.3	1.38c	B	0.2/0.8	Y-G
0.5	—	0.1	1.10e	C	1.7/2.3	Y-G
1.0	—	0.5	1.37d	BA	0.2/0.3	Y-G
1.0	—	0.7	1.65c	A	0.2/-	G-Y

^aMean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level

^bA to C : high friable to hard

^cG : green, Y : yellow



A (Bacto-agar) : solid - 0.8%, semi-solid - 0.42%
G (Gelrite) : solid - 0.2%, semi-solid - 0.12%

Figure 1. Effect of gelling agents on callus growth in 'Gelia' after 8 weeks.

유기된 백합 캘러스는 재분화 경향이 매우 강하여 NAA와 BA가 첨가된 캘러스 유기 배지에서 캘러스의 유지가 어려웠고 Simmond 등(1976)도 백합 캘러스의 유지가 어려움을 보고한 바 있다. Table 1과 같이 2,4-D 0.5 mg/L, NAA 1.0 mg/L, BA 0.3 mg/L가 첨가된 처리구에서 캘러스의 생체중이 가장 높았고 재분화도 억제되었다. 2,4-D와 BA농도가 고정된 상태에서 NAA 함량이 증가될수록 캘러스의 생체중이 증가하였고 2,4-D와 NAA의 농도가 증가함에 따라 캘러스의 유연성도 증가하였다. Meyer(1976)는 *Hemerocallis* 배양시 NAA 10.0 mg/L와 kinetin 0.1 mg/L이 첨가된 배지에서 캘러스 유기가 좋았으나 NAA 25.0 mg/L 이상의 고농도에서는 캘러스 발생이 이루어지지 않았다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 NAA 첨가만으로 신초형성을 억제하기가 어려워(결과생략) 2,4-D 첨가가 필수적이었다.

캘러스 증식에 미치는 배지 고형물의 종류와 농도를 구명하기 위해 배지 고형물을 달리한 결과 젤라이트 0.2%의 고형과 0.12%의 반고형 배지간 캘러스 생육에 큰 차이가 없었다. 그러나 0.42%의 한천을 첨가한 반고형 배지는 0.8% 고형배지에 비해 큰 생육차이를 보였고 젤라이트 0.12%가 첨

Table 2. Effect of sucrose on the callus growth and organogenesis from callus culture of 'Gelia' after 8 weeks.

Sucrose con. (g/L)	Fresh wt. (mg)	Friability ^b	No. of callus ^c		
			Nodular callus ^c	bulblets/roots (no./explant)	Callus color ^d
10	514.8 ^a	C	++	-	G - B
30	1,401.8 ^a	BC	++	1.8/1.0	G
50	1,145.1 ^b	CB	+	0.9/0.8	G - Y
70	987.8 ^b	A	-	-	Y - G

^aMean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level

^bA to C : high friable to hard

^c- normal callus, + ~ ++ : few nodular callus ~ abundant nodular callus

^dG : green, Y : yellow, B : brown

가된 배지보다 캘러스 생육이 양호하였다(Figure 1). Krikorian과 Kann(1981)은 액체현탁배양을 위한 캘러스배양 시 반고형배지에서 유지하여 액체배양으로 진행하는 것이 좋다고 하였는데 본 연구결과도 이와 유사한 경향이었다.

당은 식물의 종이나 상태에 따라 신초 유기 및 억제, 캘러스의 증식 등 다양한 식물기관형성에 관여한다. Takayama와 Misawa(1980)는 *L. speciosum*의 인편배양시 고농도 당 처리시 캘러스 생육이 증가하였다고 보고한 바 있어 캘러스의 생육을 증진시키기 위해 당 농도를 10~70 g/L 까지 달리하여 처리하였다. Table 2와 같이 당 30 g/L가 첨가된 배지에서 캘러스는 녹색을 띠며 활발한 증식을 하였다. 그러나 배지내 당 함량이 증가할수록 캘러스 생육은 저조하여 50~70 g/L의 고농도 처리구의 캘러스는 유연성은 좋으나 생육이 저조했다.

백합의 캘러스로부터 체세포 배 발생에 관한 연구는 거의 수행된 바 없고, 그 가능성 또한 정확히 알려진 바가 없다. 이에 따라 'Gelia'의 캘러스로부터 체세포배 유도 실험을 수행한 결과 배양 초기단계에서는 체세포배를 유도할 수 없었다. 그러나 4~5회 계대배양 후 불균일한 캘러스에서 일시에 노랗고 둥근 형태의 ELC (embryogenic-like callus)가 다수 형성되었다(Figure 2). ELC만을 분리하여 증식을 시도하였으나 여전히 불균일한 캘러스로 발달되거나 갈변, 고사하였고 2,4-D 첨가는 효과적이지 못했다(결과생략). Been 등(1996)이 신나팔나리의 자엽으로부터 체세포배를 얻은 결과로 보아 품종에 따라 체세포배 분화력에 차이가 있거나, 자엽이나 배축과 같은 어린 식물체를 재료로 이용하는 것이 좋은 것으로 사료된다.

액체배양을 위해 유연한 캘러스를 얻고자 MS배지내 총 질소함량중 NO_3^- 와 NH_4^+ 함량을 달리한 결과는 Table 3과 같다. NO_3^- 만이 첨가된 경우는 NH_4^+ 단독 처리구에 비해 캘러스 생육이 4.2배 증가되었고 NO_3^- 와 NH_4^+ 비율이 2 : 1 정도인 MS배지 처리구와 5 : 1로 첨가된 처리구에서 각각

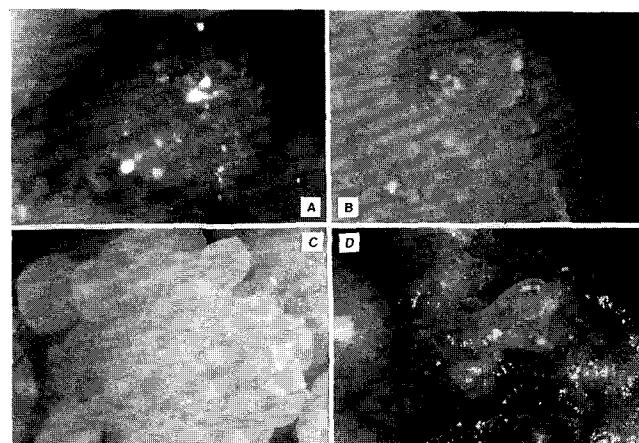


Figure 2. Growth stages of induced embryogenic-like callus of 'Gelia': A. Yellowish callus ($\times 40$) ; B. Embryogenic-like callus ($\times 30$) ; C. Embryogenesis developed from embryogenic callus ($\times 30$) ; D. Plantlets from somatic embryo genesis ($\times 18$).

Table 3. Effect of ratio of $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ on callus friability and embryogenic callus formation from callus culture of 'Gelia' after 8 weeks.

$\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ratio	Fresh wt. (mg)	Friability ^b	Nodular callus	Callus color ^d
MS media	766.7 ^a	AB	+	G
only NO_3^-	1,256.5 ^a	A	-	G - Y
5 : 1	1,051.1 ^b	A	-	G - Y
1 : 1	503.8 ^d	B	+	G - Y
1 : 2	263.4 ^g	C	++	Y - G
1 : 5	410.0 ^e	C	+	Y - B
only NH_4^+	379.7 ^f	C	-	Y - B

^aMean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level

^bA to C : high friable to hard

^c- normal callus, + ~ ++ : few nodular callus ~ abundant nodular callus

^dG : green, Y : yellow, B : brown

2.6, 3.5배 증가되어 NO_3^- 의 함량을 높인 처리구에서 캘러스 증식효율이 높았다. NO_3^- 비율이 NH_4^+ 에 비해 5:1 이상 첨가된 처리에서 부서지기 쉬운 형태의 연두색 캘러스가 형성되어 캘러스의 유연성을 증가시키는데도 NO_3^- 함량을 높이는 것이 효과적이었다.

액체 진탕배양

백합 캘러스는 원형질체로부터 세포벽이 재생되는데 3일, 세포분화가 일어나는데 21일 정도가 소요된다(Simmond et al., 1979). 그런 이유로 캘러스 배양시 계대배양기간이 8주 이상 소요되므로 캘러스 증식기간을 단축시키기 위해 액체 진탕 배양을 실시하였다. 캘러스를 200 mesh 채로 걸러 액체 배지에서 재배양할 경우 캘러스 생육속도가 느려

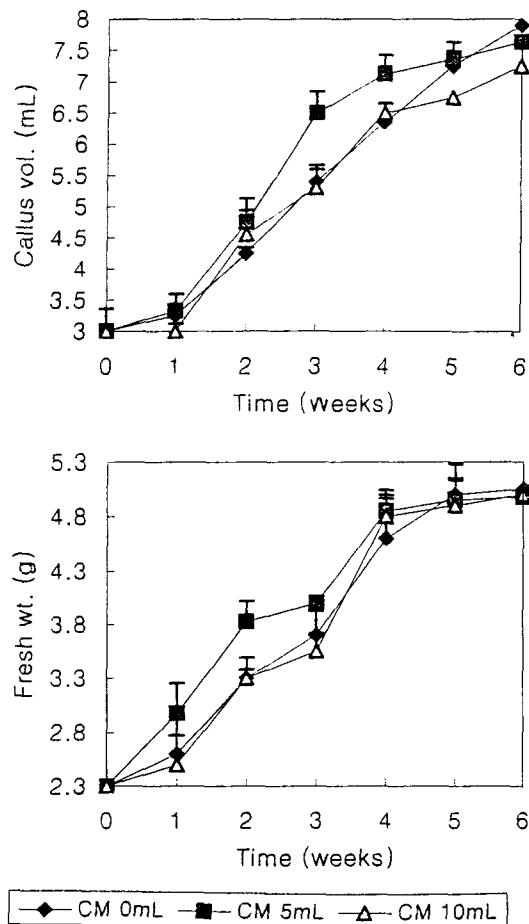


Figure 3. Effect of conditioned medium on callus growth by liquid suspension culture of 'Gelia' after 6 weeks.

conditioned 배지를 첨가하여 배양한 결과 5 mL의 conditioned 배지를 첨가한 처리에서 캘러스의 생육은 1~3 주 사이에 빠른 증식을 보여 4주 정도에 최대가 되었다. 4 주 이후 생체중의 증가는 캘러스 생육이 느려지면서 형성되기 시작한 신초에 의한 것으로 생각된다. 반면, conditioned 배지가 첨가되지 않은 경우 캘러스는 느린 생육을 보이나 꾸준히 생육이 증가하여 6주까지 증식을 계속하였고 10 mL의 conditioned 배지를 첨가한 처리에서 캘러스는 초기 생육도 느리고 4주 이후의 생육도 저조하였다 (Figure 3). 4주까지 증식되던 캘러스는 4주 이후 신초가 형성되기 시작하여 액체배양시 계대배양기간은 4주 간격이 적당할 것으로 본다.

'Gelia'의 캘러스 액체배양시 문제가 되는 점은 유연성이 강한 캘러스를 초기 액체배양시 이용해도 진탕배양을 계속 하면 단단하게 뭉쳐진 상태로 증식된다는 것이다. 이를 위해 배지내에 casein hydrolysate를 첨가하여 액체배양되는 캘러스의 유연성을 높여 주고자 하였다. 배양 4주 후 casein hydrolysate 1.0 g/L가 첨가된 처리에서 캘러스의 유연성이

Table 4. Effect of casein hydrolysate on callus growth by liquid suspension culture of 'Gelia' after 4 weeks in culture.

Casein hydrolysate (g/L)	Fresh wt. (g)	Callus vol. (mL)	Friability ^b	Color ^c	Growth index (%)	
					Wt	Vol.
0.0	5.35 ^a	10.50	B	G-Y	100.0	100.0
0.5	7.20b	11.63	B	G-Y	134.6	110.8
1.0	7.70b	12.00	BA	G-Y	143.9	114.3
2.0	8.78a	13.25	A	Y-G	164.1	126.2
4.0	8.45a	13.50	A	Y-G	157.9	128.6

^aMean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level

^bA to C : high friability to hardness

^cG : green, Y : yellow

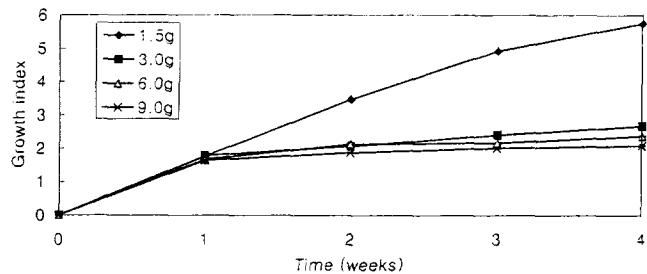


Figure 4. Growth index as affected by the initial quantity of callus after 4 weeks.

증가하여 2.0~4.0 g/L 첨가구에서는 유연성과 함께 캘러스의 생육도 증가되었다(Table 4).

액체배양시 적정 캘러스 치상량을 알아보기위해 30 mL의 액체증식용 배지에 각각 0.0, 1.5, 3, 6, 9g의 캘러스를 배양하였다. 1.5g 배양시 2주 후 생체중이 5.2g으로 3.47배 증가가 된데 비해 3, 6g 배양시는 2주 후 각각 2.07, 2.13배 증가되었다. 1.5g 배양구에서 3주 후 캘러스 생체중은 7.4g으로 조사되었고 이는 배양 초기 생체중의 4.93배였다(Figure 4).

캘러스의 유형별 조직학적 관찰

'Gelia'의 캘러스는 1~2회 배양시 재분화 경향이 강하여 대부분 단단하고 재분화가 진행되고 있는 캘러스였고, 3~5 회 정도 계대배양된 캘러스는 재분화 경향은 적으나 여러 유형의 캘러스가 섞여 증식이 진행되었다. 4~5회 정도 계대배양된 캘러스에서 특이하게 배발생 캘러스와 유사한 조직이 관찰되었고, 이 유사 배발생 캘러스는 신초나 뿌리발생의 초기 단계와는 다른 조직을 보여 주고 있다(Figure 5). 이는 Kim과 Soh(1993)가 보고한 *Allium fistulosum* L의 초기 구상형 배의 조직학적 구조와 유사하여 세포 크기가 작고 조밀하며 다수의 전분립이 축적되어 있었다. 백합은 기관분화 초기단계에 이미 캘러스 내에서부터 뚜렷한 기관형

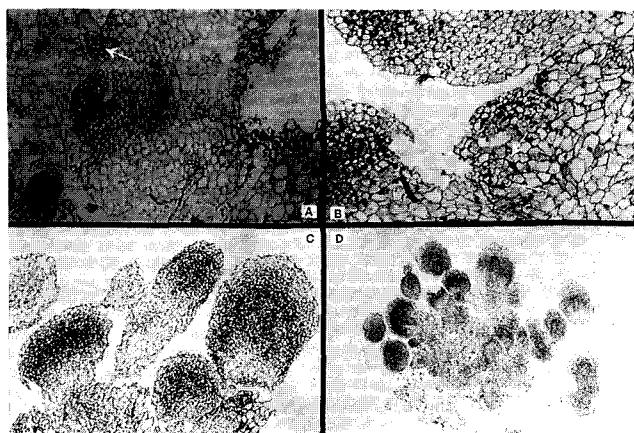


Figure 5. Light micrograph in stages of somatic embryogenesis of 'Gelia' after 5 times subculture : A and B. Initiation of cell division for somatic embryogenesis : C and D. Meristematic zone and globular somatic embryo formation from the cultured embryogenic callus.

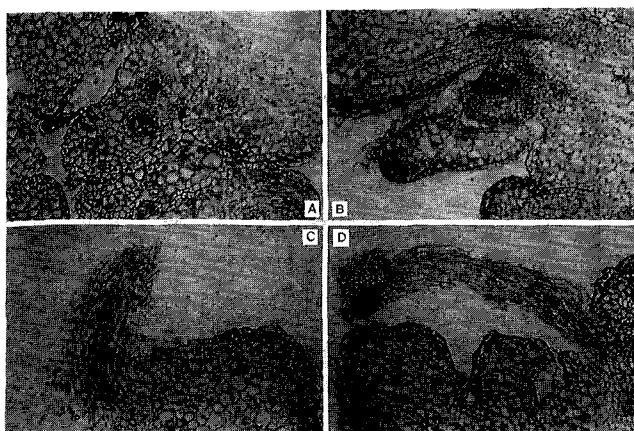


Figure 6. Light micrographs in stages of organogenesis of 'Gelia' after 8 times subculture : A and B. Cell division for the adventitious bulblets : C and D. Development of shoot(C) and root(D) from the callus tissue.

태를 갖추고 있으나 구상형 단계의 체세포 배와 흡사한 모습을 보이는 유사 배발생 캘러스는 조직의 끝부분에서 활발한 세포분열을 보이고 있다(Figure 5). 8회 정도 계대배양된 캘러스는 기관분화능을 유지하고 있어 다양한 형태의 재분화 관찰이 가능하였다. 자구형성 조직은 둥근형태의 세포가 치밀하게 모여 활발히 증식되었고, 신초와 뿌리형성 조직의 경우 이미 분열된 세포는 신장된 형태로 기관을 이루고 있었다(Figure 6).

Oogaki(1982)는 *L. maculatum*의 캘러스로부터 재분화를 조직학적으로 관찰하면서 기관분화의 유형을 자구형과 자구결여형으로 구분한 바 있는데 본 연구도 이와 일치하였다(Figure 6-B, C).

적 요

본 시험은 *L. longiflorum* 'Gelia'의 캘러스 유지 및 증식, 캘러스 선발, 액체현탁배양 등의 단계로 수행하였다. 재분화를 억제시키면서 캘러스를 유지 증식시키기 위하여 MSH배지에 2,4-D 0.5 mg/L, NAA 1.0 mg/L, BA 0.3 mg/L를 첨가한 배지가 가장 효과적이었으며 재분화를 억제시키기 위해 2,4-D의 첨가는 필수적이었다. 당은 30 g/L첨가가 캘러스 생육에 가장 적합하였고 50 g/L 이상 고농도는 캘러스 생육에 억제적이었다. 또한 0.42%의 한천을 첨가한 반고형배지에서 캘러스의 생육이 증진되었다. 4~5회 계대배양된 캘러스에서 유사배발생 캘러스(ELC)가 관찰되었다. ELC의 증식과 캘러스의 유연성을 증진시키기 위해 NO_3^- 와 NH_4^+ 의 비율을 달리하여 배양한 결과, 전반적으로 NO_3^- 의 함량이 높은 배지에서 배양된 캘러스는 생육과 유연성이 양호하였다. 그러나 체세포배발생 가능성 있는 캘러스의 증식에는 효과적이지 못했다.

액체배양은 MSH배지에 NAA 1.0 mg/L, BA 0.3 mg/L, 16.7% conditioned배지(30 mL당 5 mL), casein hydrolysate 2.0 g/L를 첨가한 액체배지에 배지 30 mL당 1.5 g의 캘러스를 배양했을 때 가장 캘러스 증식효율이 높았다. 광학현미경으로 조직을 관찰한 결과 1년 이상 장기배양된 캘러스에서 기관분화가 가능했고 배발생 초기단계의 세포도 관찰되어 백합 'Gelia' 캘러스로부터 체세포배 형성이 가능함을 알 수 있었다

사사 - 본 논문은 농림수산부에서 시행한 '96첨단농업기술개발사업'의 연구결과중 일부분으로 연구비 지원에 감사드립니다.

인용 문헌

- Been CG, Goo DH, Kim YJ, Go JY (1996) Plant regeneration via somatic embryogenesis in lily (*Lilium × formoligi*). Korean J Plant Tissue Culture 23: 249~252
- Famelaer IL, Ennik JV, Tuyl B, Meijer Creemers-Molen T (1994) The establishment of suspension and meristem cultures for the development of a protoplast regeneration system in lily. International symposium on the genus *Lilium*. ISHS. p 18
- Kim JW, Soh WY (1993) Somatic embryogenesis in floral organ cultures of *Allium fistulosum* L. Korean J Plant Tissue Culture 20: 227~232
- Kim KW, Choi JB, Kwon KY (1988) Rapid multiplication of gladiolus plants through callus culture. J Kor Soc Hort Sci 29: 312~318
- Krikorian AD, Kann RP (1981) Plantlet production from morphogenetically competent cell suspensions of Daylily. Amer Bot 47: 679~686
- Meyer MM Jr. (1976) Propagation of daylilies by tissue culture.

- HortScience 11: 485~487
- Mohmand AS, MW Nabors** (1990) Somaclonal variant plants of wheat derived from mature embryo explants of three genotypes. Plant Cell Rep 8: 558~560
- Oogaki K** (1982) Redifferentiation of callus in *Lilium maculatum* var.*bukosanense* (Honda) Hara. J Japan Soc Hort Sci 50: 497~502
- Paek KY, Chun CK** (1982) In vitro propagation of bulb scale section of *Lilium longiflorum* Thunb. J Kor Soc Hort Sci 23: 230~239
- Robb SM** (1957) The culture of excised tissue from bulb scales of *Lilium speciosum* Thunb J Exp Bot 8: 348~352
- Sheridan WF** (1968) Tissue culture of the monocot *Lilium*. Planta 82: 189 ~192
- Sheridan WF** (1974) Plant regeneration and chromosome stability in tissue cultures. In : Genetic Manipulations with Plant Material (L. Le doux, ed.). 263~259
- Simmond JA, Cumming BG** (1976) Propagation of *Lilium* hybrids. II. Production of plantlets from bulb-scale callus cultures for increased propagation rates. Scientia Hort. 5: 161~170
- Simmonds JA, Simmonds H, Cumming BG** (1979) Isolation and cultivation of protoplasts from morphogenetic callus cultures of *Lilium*. Can J Bot 57: 512~516.
- Stimart DP, Aseher PD** (1978) Tissue culture of bulb scale sections for asexual propagation of *Lilium longiflorum* Thunb. J Amer Soc Hort Sci 103: 182~184
- Stimart DP, Jagorsk JS** (1980) Plants from callus of the interspecific hybrid *Lilium 'Black Beauty'*. HortScience 15: 313~315
- Takayama S, Misawa M** (1980) Differentiation in *Lilium* bulbscales grown in vitro Effects of activated charcoal, physiological age of bulbs and sucrose concentration on differentiation and scale leaf formation in vitro. Physiol Plant 48: 121~125
- Takayama S, Misawa M** (1982) Regulation of organ formation by cytokinin and auxin in *Lilium* bulb scale growth In Vitro. Plant Cell Physiol. 23: 67~74
- Takayama S, Swedlund B, Miwa Y** (1991) Automate propagation of microbulbs of lilies. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants 8: 111~126

(1997년 5월 15일 접수)