

## 방사선을 이용한 내염성 계통의 기내선발 및 특징

이인석 · 김동섭 · 현도윤 · 임용표<sup>1</sup> · 이영일\*

한국원자력연구소 육종연구실, <sup>1</sup>충남대학교 농과대학 원예학과

### *In Vitro* Selection and Characterizations of Gamma Radiation-Induced Salt Tolerant Lines in Rice

LEE, In Sok · KIM, Dong Sub · HYUN, Do Yoon · LIM, Yong Pyo<sup>1</sup> · LEE, Young Il\*

Korea Atomic Energy Research Institute, Yusong, Daejeon 305-303, Korea

<sup>1</sup>Chungnam National Univ., Department of Horticulture, Yusong, Daejeon 305-764, Korea

**ABSTRACT** The combination of radiation technique with an *in vitro* culture system was initiated to develop salt tolerant rice. We established an *in vitro* culture system to select tolerant lines against salt stress. NaCl tolerant cell lines were selected from the callus irradiated with gamma ray on N<sub>6</sub> medium with 1.5% NaCl and 2 mg/L 2,4-D. Regenerants (M<sub>1</sub>) were obtained from the tolerant callus which was cultured for 30 days auxin-free medium. The M<sub>2</sub> seeds were harvested from M<sub>1</sub> plants on an individual plant basis. Thirty seedlings from each 450 M<sub>2</sub> lines were transplanted in a field and total 5,000 M<sub>3</sub> lines were harvested with an average 90 percent of fertile grain. M<sub>3</sub> lines were utilized for selection of salt tolerance. Salinity-tolerant lines (225) were selected among 5,000 M<sub>3</sub> lines. Of the 225 lines tested, the morphological traits of two lines (120-10 and -11) were far superior to control (Dongjinbyeon) in agronomic traits such as plant height, root length and no. of roots. Control and tolerant lines were analyzed by RAPD markers. Three polymorphic bands were presented in only tolerant lines, demonstrating a genetic difference between control and the tolerant lines. Such tolerant lines could be used as genetic resources to improve salt tolerance.

**Key words:** Callus, irradiation, rice, salt tolerance

## 서 론

벼는 세계인구의 2/3가 주식으로 이용하는 중요한 식량 자원이다. 그러나 건조, 저온, 토양의 산성화 및 염류와 같은 환경 스트레스 요인에 의해 벼의 생산성이 감소하고 재배 가능 면적도 감소하고 있다. 국내에서 활발한 간척사업으로 염류 집적 토지가 개발예정 면적까지 합하여 16만 ha로 이러한 지역에서 작물을 재배하기 위해서는 biomass 및 수량이 상대적으로 증가하는 내염성 계통을 육성하는 것이 필요하다 (Steponkus et al. 1980).

조직배양에 의해 재생된 식물은 표현형 변이를 보이는데

이러한 것을 somaclonal variation이라 한다 (Larkin and Scoweroft 1981). 이러한 방법에 의해 표현형 변이가 발생한 계통을 선발하였지만 (Karp 1995), 분자수준에서 이상적인 변이를 유도하지 못하여 대부분 다음 세대까지 유전되지 않는 후생적 변이를 나타내는 단점이 있다 (Chopra et al. 1989). 그러나 이런 조직배양 기술에 방사선 기술을 접목하면 육종계획, 변이 발생률 및 새로운 genotypes의 발생빈도를 촉진할 수 있다 (Novak 1991; Maluszynski et al. 1995). 이런 접목된 기술을 이용하면 여러 유전자에 영향을 미치므로 조직배양 단독에 의한 것보다 변이율이 높아 유용한 변이체를 선발하거나, 양적 형질로 유전하는 환경 저항성 계통을 선발하는데 효과적임을 제시하였다 (Ahloowalia 1990; Mandal et al. 2000; Das et al. 2000).

RAPD 기술은 품종간 유연관계 분석 (Schell et al. 1995), 유

\*Corresponding author Tel 868-8077 Fax 868-8061

E-mail yilee@kaeri.re.kr

용형질을 탐지할 수 있는 표지인자개발 및 genetic marker로 이용할 수 있는데 (Bai et al. 1995), 벼 (Xie et al. 2000) 및 옥수수 (Zacchini et al. 1997)에서 RAPD을 이용하여 내염성 품종과 내염성 캘러스에서 만 공유된 밴드를 확인하여 내염성과 감수성을 구분 할 수 있었는데, 이러한 결과는 장기간에 걸쳐 표현형적으로 내염성과 감수성을 구분한 결과와 일치하여 내염성 육종 초기단계에서부터 적용 될 수 있는 방법임을 암시하였다.

본 연구는 내염성 캘러스 선발 및 재분화에 미치는 최적 방사선 선량을 결정하고, 내염성 캘러스로부터 유도된 변이체 중에서 발아기부터 유묘기에 걸쳐 내염성을 검정하며, RAPD을 통하여 모품종과 내염성 계통의 분류 및 유전적 다양성을 조사하기 위하여 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 캘러스 유도 및 재분화

동진벼 종자를 5% sodium hypochlorite 용액에서 15분 살균하고 멸균수로 4회 세척한 후, 종자를 2 mg/L 2, 4-D가 첨가된 N<sub>6</sub> 고체 배지에 40일 동안 배양하여 캘러스를 유도하였다. 유도된 캘러스에 방사선을 30, 50, 70 및 90 Gy로 처리하여 1.5% NaCl이 함유된 N<sub>6</sub> (Chu et al. 1975) 고체 배지 (2 mg/L 2, 4-D)에 치상하여 40일 간격으로 3회 계대 배양하여 120일 후에 내염성 캘러스를 선발하였다.

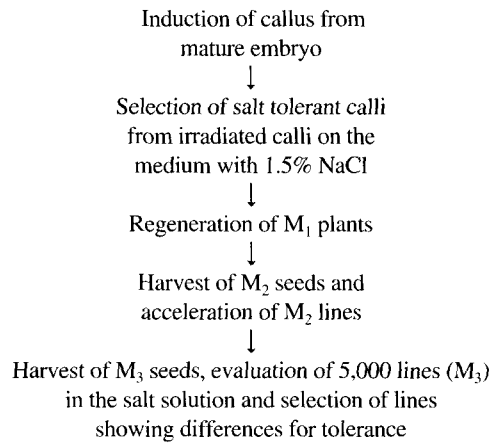
내염성 캘러스를 식물체로 재분화시키기 위해 MS (Murashige and Skoog 1962)배지에서 (BA 2 mg/L + NAA 0.5 mg/L) 30일 동안 배양하여 싹초와 뿌리를 유도하였다. 재분화체 (M<sub>1</sub>)는 순화과정을 거쳐 염이 없는 포장에 정식하고 140일 후에 M<sub>2</sub> 종자를 채종하였다.

### M<sub>2</sub> 식물체의 작물학적 특성조사 및 내염성 선발 재료 육성

M<sub>2</sub> 식물체를 계통별로 30개의 유묘를 30×15 cm 간격으로 1본씩 정식하여 유묘기 때부터 황숙기까지 형태적 변이를 조사하고, M<sub>3</sub> 세대 5,000계통을 채종하였다. Figure 1은 캘러스에서 저항성 계통 선발까지의 선발 모식도를 나타내고 있다.

### M<sub>3</sub> 세대에서 내염성 계통 선발

일차적으로 M<sub>3</sub>세대 5,000계통의 종자를 24시간 소독한 후에 건실한 종자 25개씩을 선정하여 계통별로 16 pot tray (30×50×20 mm per pot)에 치상한 후 1% NaCl 수용액을 10 mm 높이로 하여 발아기부터 유묘기까지 30일 동안 육성하여 모품종인 동진벼와 비교하여 초장, 근장 및 근수의 생육이 우수한 계통을 선발하였다. 일차에서 내염성으로 확인된 것은



**Figure 1.** Flow chart of procedures for the selection of salt tolerant lines.

계통당 25개 종자를 3반복으로 선정하여 1차와 같은 조건에서 내염성을 재평가하였다.

### DAN 분리 및 RAPD

DNA는 모품종을 포함하여 계통당 3개체를 가지고 Saghai-Marouf et al. (1984)의 방법으로 추출하였고, operon primer 15개 (OPH-01 ~OPH-15)를 이용하여 다음과 같이 RAPD 분석을 수행하였다. DNA 증폭반응을 위하여 PCR 반응용액을 총 25 μL을 기준으로 했을 때 DNA 15 ng, 10 X PCR buffer 2.5 μL, dNTP 200 μL, Taq DNA polymerase 1 unit, primer 0.2 μL, MgCl<sub>2</sub> 2 mM를 가하여 혼합물을 만들었다. Thermocycler는 Perkin Elmer 480을 사용하였으며, 증폭조건을 초기에 94°C에서 5분 동안 denaturation을 시킨 후 94°C (denaturation time) 5초, 36°C (annealing time) 30초, 72°C에서 5분 동안 반응시켰다. 반응 후 반응물 중 20 μL를 취한 다음 0.5×TBE buffer가 첨가된 1.5% agarose gel에서 전개하고 ethidium bromide (EtBr)로 염색 후 UV transilluminator에서 증폭된 DNA polymorphism을 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 내염성 캘러스의 선발 및 재분화

내염성 캘러스 선발시 피라미드 선발 체계처럼 낮은 염에서 일차 선발하고 재차 높은 염에서 선발할 경우 캘러스가 염분에 생리적으로 적응하여 생존할 가능성이 있으므로, 캘러스나 재분화체의 후대에서 생리적인 적응에 의한 후생적 변이를 제거하기 위하여 높은 염 농도에서 single step으로 내염성 캘러스를 선발하는 방법을 이용하였다.

동진벼 성숙배에서 유도된 캘러스를 1.5% NaCl이 함유된 배지에 치상한 후 방사선을 처리하여 120일 후에 내염성 캘

러스의 선발률을 조사한 결과 무처리구에 비해 모든 방사선 처리구 초기에는 생육이 부진하였지만 약 20일쯤에서는 일부 캘러스의 생육이 우수하였고, 최종 평가 시기인 40일에는 30 및 50 Gy 처리구에서 생존율이 각각 33% 및 20% 증가하였으며 70 및 90 Gy 처리구에서는 감소하였다. 또한 재분화율에 있어서도 30, 50 및 70 Gy 처리구는 증가하였고 90 Gy 처리구에서는 감소하였다 (Table 1). 본 실험에서 나타난 것처럼 일부 방사선 처리구에서 생존율이 증가한 것은 방사선의 영향으로 후생적 변이보다는 돌연변이가 발생하여 내염성 캘러스 선발에 도움을 줄 수 있다는 것을 보여준 것으로 유사한 연구 결과가 Khan et al. (2001)에 의해서도 보고되었는데 이러한 돌연변이의 원인으로 mitotic crossing over, 염색체 재배열, transposon, 유전자의 copy 수의 변화 및 점 돌연변이 등을 제시하고 있다 (Evans 1989). 또한 특정한 방사선 영역에서 처리 초기에는 생육이 감소하지만 세포 life cycle이 회복한 시기에는 mitotic index의 증가가 활발히 이루어져 캘러스의 형성과 재분화율이 증가한다고 하였다 (Adamska and Maluszynski 1983; Castillo et al. 2001). 90 Gy 처리구에서는 캘러스 생존율 및 재분화율이 모두 감소하였는데 이러한 원인으로 염분의 독성 효과와 방사선 처리에 의한 효소의 불활성의 복합적인 요인에 의한 것으로 생각할 수 있는데, Casarett (1968)는 100 Gy 범위에서는 식물세포의 효소불활성이 초래됨을 보고하였다.

### M<sub>2</sub> 식물체의 작물학적 특성 조사 및 세대축진

M<sub>1</sub> 식물체에서 얻은 대부분의 M<sub>2</sub> 종자는 종자의 충실도가 낮는데 이런 종자를 대상으로 모품종과 비교하여 발아 단계에서부터 내염성을 선발할 경우 발아력이 낮아 내염성 계통의 손실이 우려되고, 유용 변이체의 선발 효과를 높이기 위해

서는 계통수를 최대한 늘리는 게 유리하며 (Yosida 1959), 내염성처럼 양적 형질로 유전하는 것은 세대가 축진된 계통일수록 양적 형질의 평균치가 증가되므로 (Scossiroli et al. 1966) M<sub>2</sub>세대에서는 내염성 검정을 실시하지 않고 계통수 증대 및 세대축진에 역점을 두었다.

유묘기부터 황숙기까지 관찰하여 형태적 특성을 Table 2와 같이 구분할 수 있었는데 본 결과는 Table 3에서 내염성을 나타낸 120번 계통을 기준으로 하여 돌연변이율을 조사하였다. Albino체를 포함한 전체 변이율은 10%로 조사되었고, 포장에서의 변이율은 왜성 2개체, 조숙성 1개체 및 잎 폭이 좁은 1개체를 포함하여 13.3%로 조사되어 형태적 특징으로 돌연변이가 발생하였음을 알 수 있었는데 Predieri와 Zimmerman (2001)도 비슷한 결과를 보고하였다.

### M<sub>3</sub> 세대에서 내염성 계통 선발

벼는 유묘시기가 염분에 가장 민감한 시기로 이 때에 내염성을 선발할 경우 선발효과가 있음을 보고하였다 (Pearson and Ayers 1960; Xie et al. 2000). 앞 연구자들과 다르게 본 실험에서는 발아시기부터 유묘 3~4매 시기까지 염분 용액에서 생육한 결과 10일쯤에서 내염성을 확실히 구분할 수 있었지만, 최종 내염성 판결은 30일에 실시하였다. 내염성 정도는 계

**Table 3.** Performance of salt tolerant M<sub>3</sub> isolines cultured in the 1% NaCl solution for 30 days.

Entries	Plant height	Root length	No. of roots
Dongjinbyeo Cont.	3.9 ± 0.2	4.1 ± 0.3	6.6 ± 0.8
120-10	8.1 ± 0.3***	5.6 ± 0.5*	9.0 ± 0.7*
120-11	8.0 ± 0.4***	5.3 ± 0.3*	8.2 ± 0.7*

\*, \*\*\*, Significant at 5 and 0.1% level

**Table 1.** Selection of NaCl tolerant calli and plantlets from the irradiated calli with various radiation doses on medium containing 1.5% NaCl.

Radiation dose (Gy)	No. of inoculated calli	No. of survived calli in 4 months	No. of regenerants <sup>a</sup>
0	1080	64 (6.0)	11 (17.2)
30	1200	95 (8.0)	18 (18.9)
50	1050	76 (7.2)	14 (18.4)
70	1020	47 (4.8)	9 (19.1)
90	1200	36 (3.0)	3 ( 8.3)

( ): Percentages of survived calli and regenerated plants from the survived calli.

<sup>a</sup>: Regeneration of plantlets was carried out on medium without NaCl.

**Table 2.** Morphological variants of rice observed in M<sub>2</sub> lines derived from gamma-rayed calli.

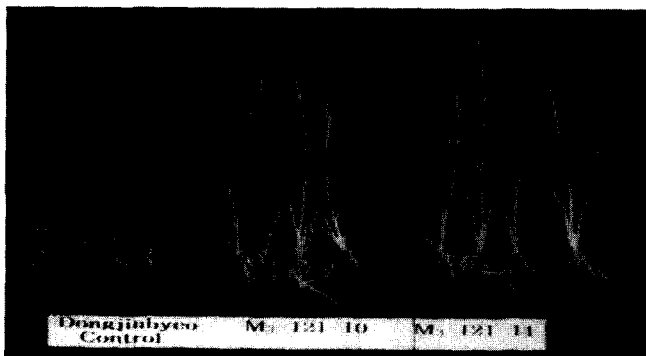
Entries	No. of seed germinated	No. of seedling transplanted	Total no. of variants				
			Plant type	Dwarf	Early heading	Narrow leaf	%
DongjinbyeoCont.	50	30	0	0	0	0	0
M <sub>2</sub> -120	50 (2) <sup>a</sup>	30	0	2	1	1	13.3

(<sup>a</sup>): No. of albino plant

통에 따라 다양하여 발아를 전혀 못한 계통부터 생육이 우수한 계통까지 다양하게 분포하였으며, 내염성을 나타낸 계통은 5,000계통 중 225 (4.5%)계통으로 조사되었다. 그 중 121-10 및 121-11계통을 모품종과 비교할 경우 모품종은 이들 계통보다 백화현상이 빨리 진행되었는데 백화현상을 양적으로 측정하기가 어려워서 초장, 근장 및 근수로 내염성을 평가하였다. 초장의 생육은 2배 이상 증가하여 높은 유의성 ( $p < 0.001$ )을 보였으며, 근장은 각각 29% 및 23% 증가하여 5% 신뢰구간에서 유의성이 인정되었고, 또한 근수도 증가하여 유의성 ( $p < 0.05$ )이 인정되었다 (Table 3, Figure 2). 이로서 기내배양과 방사선기술의 접목에 의해 캘러스 수준에서 나타난 내염성 형질이 식물체로 유전되어 내염성 계통의 선발이 가능함을 보여 주고있으며, 또한 이러한 형질은 자가 수정에 의해 다음세대로 유전된다는 것을 보여주고 있으나 내염성의 정확한 유전양상을 분석하기 위해서는 모품종과 교배가 이루어져야 할 것으로 생각하며, 내염성 캘러스로부터 유도된 재분화체 후대에서 돌연변이의 발생은 캘러스 단계에서 제시한 원인에 의한 것으로 생각할 수 있다. 본 연구에서 내염성을 선발하기 위하여 표현형 특성을 대조구와 변이체를 비교하였는데, 이런 표현형 특성조사를 통하여 벼 (Zhang et al. 1995) 및 담배 (Summaryati et al. 1992) 등에서 내염성 계통이 선발되었다. 본 실험에서와 같이 방사선기술과 기내배양 기술을 접목하여 밀에서 aluminum 저항성 (Tulmann Neto et al. 2001) 및 내건성 (Khan et al. 2001) 계통이 선발되었고, 감자에서는 내고온성 계통이 선발되었다 (Das et al. 2000). 또한 Carlos et al. (2000)는 밀의 aluminum 저항성 계통을 교배모본으로 이용하여 aluminum 저항성은 단일 우성 유전자에 의해 조절된다고 하였다.

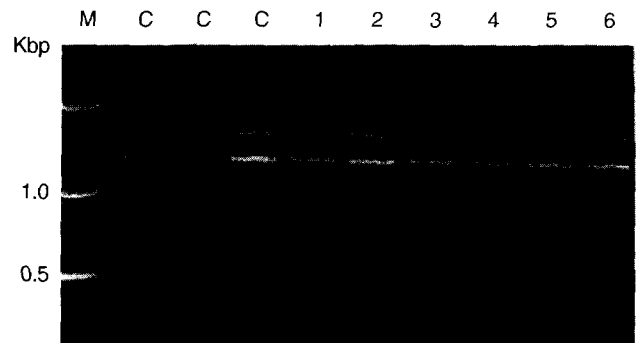
**돌연변이 확인을 위한 RAPD 분석**

환경의 영향을 배제한 상태에서 돌연변이를 확인하고, 모품종과 변이체간의 genotype을 분류하기 위해 15개의 primers를 가지고 모품종과 변이체 식물에서 추출한 DNA를 사용하여 RAPD을 수행한 결과 15개의 primers 중 9개는 polymor-

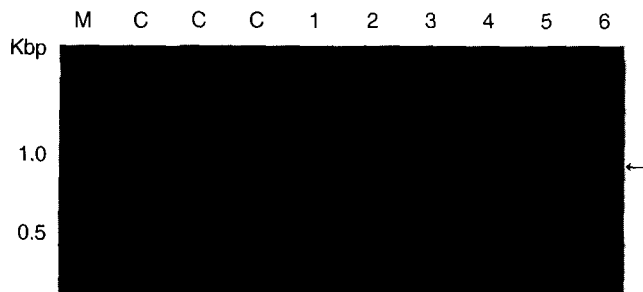


**Figure 2.** Seedlings of salt tolerant lines grown in the solution containing 1% NaCl for 30 days.

phism이 모품종과 변이체 및 변이체와 변이체 사이에서 나타났다, 5개는 polymorphism이 나타나지 않았으며, 한 개의 primer에서는 밴드 intensity의 차이를 나타내었다. 밴드의 수는 primer에 따라 최저 4개에서 최고 14개까지 나타났으며 밴드의 크기는 0.2에서 2 kb까지 다양하였다. 전체 133밴드 중에서 모품종과 계통 및 계통과 계통 사이에서 polymorphic 밴드는 22개 (16.5%)로 조사되었다. 22개 밴드 중 내염성 계통에서 나타난 밴드는 3개로 조사되었는데, OPH-05 primer에서는 120-10-1, -2, -3계통에서만 새로운 밴드가 나타났고, 120-11-1, -2, -3 경우에는 OPH-10 및 -12 primer에서 각각 한 개씩 새로운 밴드가 나타났으며 (Figure 3), 120-11-1, -2, -3 계통에서 밴드 intensity가 높은 1개의 밴드를 OPH-07 primer에서 관찰할 수 있었는데 (Figure 4), 내염성 계통 모두에서 일률적으로 나타난 밴드는 없었다. 본 결과를 통하여 변이 계통에서 내염성을 나타낸 형태적 특징은 비슷하였지만, RAPD 분석에서 계통마다 다른 밴드 양상이 나타나는 것으로 보아 계통에 따라 돌연변이의 발생 부위 및 정도가 다르다는 것을 알 수 있었는데, Pluhar 등 (2001)도 식물 종 및 조직에 따라 돌연



**Figure 3.** RAPD analysis of control and salt tolerant lines using OPH-05 primer. M: Size marker, C: Dongjinbyeo; 1, 2 and 3: Salt tolerant lines 120-10-1, -2 and -3; 4, 5 and 6: Salt tolerant lines 120-11-1, -2 and -3, respectively. A rectangular indicates specific band shown in salt tolerant line (120-10-1, -2 and -3). RAPD analysis was carried out by using 3 plants of each variety and line.



**Figure 4.** RAPD analysis of control and salt tolerant lines using OPH-07 primer. M: Size marker, C: Dongjinbyeo; 1, 2 and 3: Salt tolerant lines 120-10-1, -2 and -3; 4, 5 and 6: Salt tolerant lines 120-11-1, -2 and -3, respectively. Arrow indicates intensive band shown in salt tolerant line (120-11-1, -2 and -3). RAPD analysis was carried out by using 3 plants of each variety and line.

변이 발생 빈도가 다르다고 하였다.

본 결과에서 모품종에 비해 변이계통에서 내염성이 증가한 원인과 RAPD의 polymorphic 밴드와의 직접적인 관련성을 확인하지 못하였다. 그러나 방사선 처리에 의해 역위, 전좌, 전위, 점 돌연변이, DNA 증폭, 핵형 변이, retrotransposon, transposon, somatic crossing over 및 methylation과 같은 원인에 의해 돌연변이가 발생하여 직·간접적으로 유전자가 영향을 받아 가지적으로 내염성을 포함한 변이 형질이 표현화 되는 것으로 생각할 수 있는데 (Karp 1995), 벼의 캘러스에서 내염성 형질이 나타나고 재분화체에서 이런 형질이 없어진 것은 retrotransposon enhancer-promoter의 발현이 억제되었음을 발표하였다 (Hirochika 1997). 또한 내염성은 양적 형질이므로 앞에서 언급한 원인에 의해 돌연변이된 여러 유전자들의 누적적 및 보족적 효과에 의한 초월분리에 의해 내염성이 나타난다고 하였는데 (Toenniessen and Khush 1991), 본 결과도 이러한 이론에 의해 내염성이 나타난 것으로 생각한다. 그러나 이런 돌연변이의 발생과 관련된 메커니즘에 대해서는 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각한다 (Jain and De Klerk 1998).

RAPD를 통하여 모품종을 포함한 계통간의 공유밴드와 비공유밴드 사이의 관계는 내염성과 감수성을 분석하는데 중요한 자료가 되므로 Figure 3 및 4와 같이 확실한 차이가 나는 밴드의 염기서열분석을 통하여 인위적으로 SCAR 및 STS와 같은 primer 제작이 가능해진다면 생육 초기에 내염성을 선발하는데 유용한 마커로 이용이 될 것으로 생각되어 이러한 연구를 계속 진행하고 있다.

결론적으로 본 실험을 통하여 내염성 캘러스의 선발이 가능하고 이런 캘러스에서 유도된 재분화체의 후대에서 내염성 형질이 나타난 것으로 보아 방사선을 이용한 *in vitro* mutagenesis의 방법은 내염성 육종에 효과적인 방법임을 알 수 있었고, RAPD 분석은 내염성 캘러스로부터 재분화된 계통과 모품종을 분류하는 데 이용될 수 있음을 확인하였다. 앞으로는 실험자가 원하는 특정한 돌연변이만을 유도하기 위해서는 방사선으로 인해 손상된 DNA의 회복과 관련된 세포의 메커니즘에 대해서 연구가 이루어져야 할 것으로 생각한다.

## 적 요

1.5% NaCl이 함유된 배지에 캘러스를 치상하여 방사선을 처리한 결과 무처리구보다 처리구 (30, 50 Gy)에서 캘러스 생존율 및 재분화율이 증가하여 내염성 캘러스를 선발하는데 방사선의 적용이 효과적임을 알 수 있었고, 내염성 캘러스에서 재분화된 M<sub>3</sub>세대 종자에서 내염성 계통들은 모품종보다 초장, 근장 및 근수의 생육이 우수하여 이러한 계통은 내염성 연구를 위한 유용한 유전자원으로 이용할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 RAPD 기술은 대조구와 내염성 캘러스에서 재분

화된 계통을 구분하는데 유용한 기술임을 알 수 있었다.

사사 - 본 연구는 과학기술부의 원자력 연구개발 사업의 일환으로 수행되었으며 적극적인 연구지원에 감사의 뜻을 표합니다.

## 인용문헌

- Adamska E, Maluszynski M (1983) The stimulation of growth in shoots of *Nicotiana rustica* and *Nicotiana tabacum* after N-nitroso-N-methyl urea treatment. *Acta Biol* 11:175-185
- Ahloowalia BS (1990) *In vitro* radiation induced mutagenesis in potato. *In: Sangwan RS, Sangwan Noreel BS, (Eds), The impact of Biotechnology in Agriculture*. Klumer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, pp 39-46
- Bai D, Reeleder R, Brandle JE (1995) Identification of two RAPD markers tightly linked with the *Nicotiana debenji* gene for resistance to black root rot of tobacco. *Theor Appl Genet* 91: 1184-1189
- Carlos E, de Oliveria Camargo CE, Tulmann Neto A, Antonio WP, Filho F, Felicio JC (2000) Genetic Control of aluminum tolerance in mutant lines of the wheat cultivar Anahuac. *Euphytica* 114: 47-53
- Casarett AP (1968) Effects of radiation on the cell. *In: Casarett AP, (Eds), Radiation Biology*. Prentice-Hall, New Jersey, USA. pp 91-117
- Castillo AM, Cistue L, Valles MP, Sanz JM, Romagosa I, Molina-Cano JL (2001) Efficient production of androgenic doubled-haploid mutants in barley by the application of sodium azide to anther and microspore cultures. *Plant Cell Rep* 20:105-111
- Chopra VL, Narashimulu SB, Kirti PB, Prakash S, Anuradha G (1989) Studies on somaclonal variation in *Brassica* SP. and its relevance to improvement to stress tolerance and yield, *In: Mujeeb-Kazi, Sitch, LA, (Eds), Review of Advances in Plant Biotechnology 1985-1988*, CIMMYT, Mexico and IRRI, The Philippines, pp 220-238
- Chu CC, Wang CC, Dun CS, Hsu C, Yin KC, Chu Y, Bi FI (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sinica* 18:659-668
- Das A, Gosal SS, Sidhu JS, Dhaliwal HS (2000) Induced of mutations for heat tolerance in potato by using *in vitro* culture and radiation. *Euphytica* 114:205-209
- Evans D A. (1989) Somaclonal variation-genetic basis and breeding applications. *Trend in Genet* 5:46-50
- Hirochika H. (1997) Retrotransposon of rice: their regulation and use for genome analysis. *Plant Mol Biol* 35:231-240
- Jain SM, De Klerk GJ (1998) Somaclonal variation in breeding and propagation of ornamental crops. *Plant Tissue Cult Biotech* 4:63-

- Karp A** (1995) Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica* **85**:295-302
- Khan AJ, Hassan S, Tariq M, Khan T** (2001) Haploidy breeding and mutagenesis for drought tolerance in wheat. *Euphytica* **120**:409-414
- Larkin PJI, Scowcroft WR** (1981) Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet* **60**:197-214
- Maluszynski M, Ahloowalia BS, Sigubjornsson B** (1995) Application of *in vivo* and *in vitro* mutation techniques for crop improvement. *Euphytica* **85**:303-315
- Mandal AKA, Chakrabarty D, Datta SK** (2000) *In vitro* isolation of solid novel flower colour mutants from induced chimeric ray florets of chrysanthemum. *Euphytica* **114**:9-12
- Murashige T, Skoog F** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* **15**:473-479
- Novak FJ** (1991) *In vitro* mutation system for crop improvement. In: Plant Mutation Breeding for Crop Improvement. Vol 2. IAEA, Vienna, Austrelia pp 327-342
- Pearson GA, Ayers AD** (1960) Rice as a crop for salt for salt-affected soil in process of reclamation. *Prod Res Rep* **43**
- Pluhar SA, Erickson L, Pauls KP** (2001) Effects of tissue culture on a highly repetitive DNA sequence (E 180) satellite in *Medicago sativa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **67**:195-199
- Predieri S, Zimmerman RH** (2001) Pear mutagenesis: *in vitro* treatment with gamma-rays and field selection for productivity and fruit traits. *Euphytica* **3**:217-227
- Saghai-Maroo MA, Soliman KM, Jorgenson RA, Allard RW** (1984) Ribosomal DNA spaer-length polymorphism in barely: Mendrian inheritance, chromosomal location, and populational dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**:8014-8018
- Schell RJ, Ronning CM, Knight RJ** (1995). Identification of cultivars and validation of genetic relationships in *Mangifera indica* L. using RAPD markers. *Theor Appl Genet* **90**:269-274
- Scossrioli RE, Palenzona DL, Scossrioli PS** (1966) Studies on the induction of new genetic variability for quantitative traits by seed irradiation and its use for wheat improvement. *Mutations in Plant Breeding*, IAEA, Vienna, pp 197-229
- Steponkus PL, Cutler JM, Toole JC** (1980) Adaptation to water stress in rice. In: N.C Turner and P.J Kramer (Eds.), *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress*, Wiley-Interscience, New York, pp 231-254.
- Summaryati S, Negrutiu I, Jacobs M** (1992) Characterization and regeneration of salt and water stress mutants from protoplast culture of *Nicotiana viviani*. *Theor Appl Genet* **83**:613-619
- Toenniessen GH, Khush GS** (1991) Prospects for the future. In: *Biotechnology in Agriculture*, Vol 6. Rice Biotechnology. CAB International/IRRI, Wallingford, UK/Manlia, Philippines, pp 309-313
- Tulmann Neto A, de Oliveria Camargo CE, Lopes de Castro J, Ferreira Filho WP** (2001) Evaluation of Anahuc wheat mutant line for aluminum tolerance. *Euphytica* **120**:339-343
- Xie JH, Zapata-Arias FJ, Shen M, Afza R** (2000) Salinity tolerant performance and genetic diversity of four rice varieties. *Euphytica* **116**:105-110
- Yosida Y** (1959) Theoretical studies on the procedures of radiation breeding. (1) Criticism of the conventional ear-to-ear method and advocacy of a new mehtod in cereals. *Jap J Breed* **9**:271 (Abstract)
- Zacchini M, Marotta A, de Agazio M** (1997) Tolerance to salt stress in maize callus lines with different poiynamine content. *Plant Cell Rep* **17**:119-122
- Zhang GY, Guo Y, Chen SL, Chen SY** (1995) RFLP tagging of a salt tolerance gene in rice. *Plant Sci* **110**:227-234

(접수일자 2002년 9월 10일)