

L. longiflorum × *L. elegans*의 잡종 배로부터 캘러스의 증식 및 식물체 재분화

윤의수^{1*}, 권혜경¹, 조이연²

¹공주대학교 생명과학과, ²공주대학교 생물교육학과

Callus growth and plant regeneration from hybrid embryo of *L. longiflorum* × *L. elegans*

Eui-Soo Yoon^{1*}, Hye-Kyoung Kwon¹ and Yi-Yun Cho²

¹Department of Biology, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea

²Department of Biology Education, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea

ABSTRACT This study was performed to investigate regeneration of plants differentiated from hybrid embryos between *L. longiflorum* Georgia and *L. elegans* Kakutanohikari. In addition, proliferation of callus and process of differentiation were investigated by histological observation. The germination of hybrid embryos was observed in 86 individuals from 48 slice cultures. Plant regeneration was effective on a medium supplemented with 1 mg/L NAA, and only callus proliferation was the highest in combination of 0.1 mg/L NAA and 1 mg/L BA. Also, plant regeneration was the most effective on a medium supplemented with 50 mg/L pyridoxine. We concluded that somatic embryos were formed from procambium of callus and proliferation of embryonic or proembryonic cells were stimulated with NAA from procambial cells.

Key words: hybrid embryos, plant regeneration, *Lilium longiflorum*

서 론

*Lilium*은 보통 인편번식법을 이용하여 증식시킨다. *Lilium*의 종류, 재배방법, 구근의 크기 등에 따라 다르기는 하지만 보통 인편 하나로부터 3-5개의 구근밖에는 얻어지지 않는다. 또한 인편 증식은 무균의 묘를 얻기도 어려우며 짧은 시간에 잡종을 얻는 것도 곤란하다. 또한 종자번식법으로는 개화까지 보통 4-5년을 필요로 한다. *Lilium speciosm*의 구근의 여러 부분을 이용하여(Robb 1977) 조직배양을 하였고, *L. longiflorum*의 줄기와 구근(Haekett 1969), *L. rubellum*의 잎과 줄기를 이용한 조직배양(Niimi and Onozawa 1979)에 대한 보고도 있다. 또한 약(Sharp et al. 1971), 화사(Montezuma-de-Carvalho and Guimaraes 1974), 자방의 캘러스(Kato and Yasytaka 1977)를 이용한 재분화에 대한 연구도

보고 되고 있다. 국내 연구에서는 잎의 절편을 이용하여 증식한 보고(Kim et al. 2005)도 있지만 주로 인편을 이용한 기내증식에 대한 연구가 보고되었으며(Nam and Kim-Lee 2003; Park et al. 1998) 자생나리에 대한 연구에 있어서도 대부분 인편을 이용한 기내 증식에 목적을 두고 있다(Joung et al. 1995; Park et al. 1998; Kim et al. 2005). 최근에는 바이오리액터를 이용한 대량증식에 관한 연구가 보고되었다(Lian and Pack 2002; Han et al. 2004). 이러한 증식 방법에 있어서도 먼저 인편 절편체를 이용하여 고체배지에서 자구를 대량증식하거나 바이오리액터에서 자구를 증식하고, 증식된 자구를 다시 비대용 배지를 이용하여 바이오리액터에서 배양하여 자구 비대를 실시하고 있다. 그러나 새로 만들어진 잡종의 증식에 있어서는 잡종 배를 이용하는 것이 가장 좋은 증식능력을 가질 것으로 생각된다.

종간 교잡에 의한 배 배양에 대한 연구는 Asano 와 Aki-mich (1977)에 의해, 자방 배양에 대한 연구는 Yoon (1991)에

*Corresponding author Tel 041-850-8502 Fax 041-850-8479

E-mail: yes@kongju.ac.kr

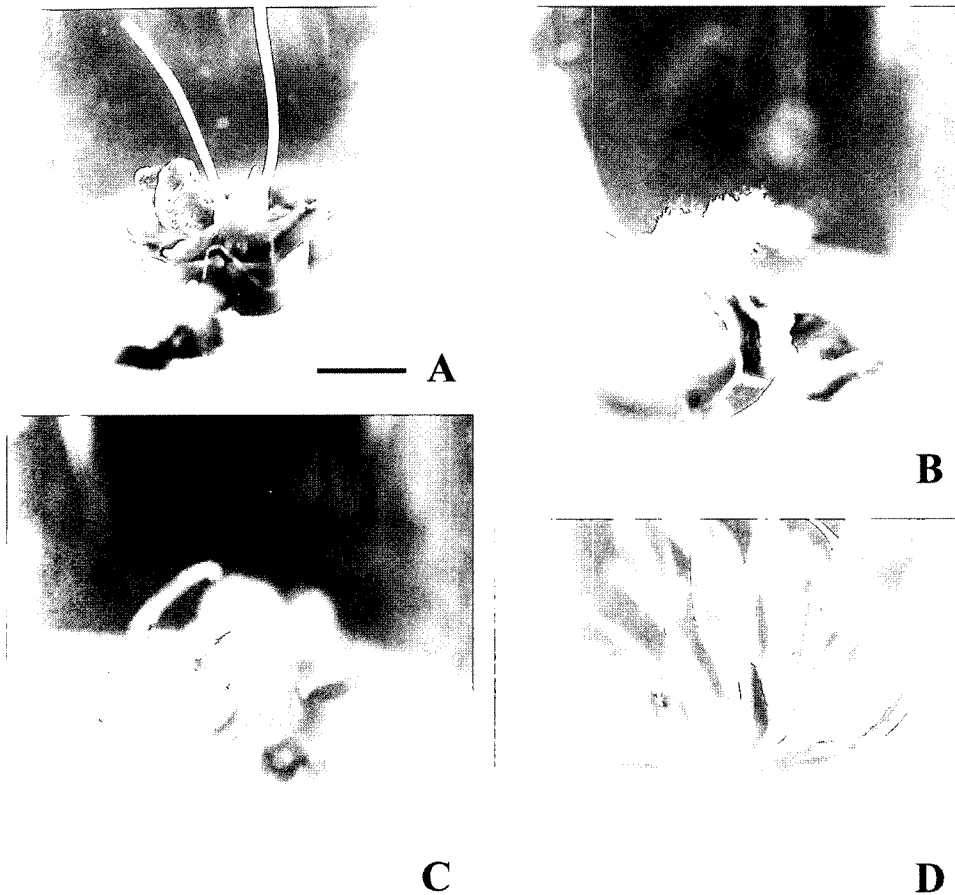


Figure 1. Behavior of monocotylated embryos in obtained through ovary slice culture of interspecific hybrid (*L. longiflorum* Georgia × *L. elegans* Kakutanohikari). A, Normal seed germination; B, Abnormal growth of embryo; C, Callus formation from embryos; D, Plant regeneration from callus.

의하여 보고된 바 있지만 아직 배로부터 특히 원연잡종의 배로부터 발생한 캘러스를 이용한 재분화에 대한 연구 보고는 없다. 본 연구에서는 중간교잡에 의하여 얻어진 잡종배의 재분화 상태와 잡종배로부터 캘러스를 유도하여 원연 잡종을 대량으로 얻고자 모의 요질의 위험 분산의 의미로 캘러스의 증식과 유식물체 분화의 유도에 대한 배지의 검토 그리고 유식물체로의 재분화의 과정을 조직학적으로 관찰하였다.

재료 및 방법

잡종 배의 획득과 배의 발아 모양

잡종 배는 *L. longiflorum*을 모계로 하고 *L. elegans* (품종 : Kakutanohikari)을 화분 부계로 하여 화주절단수분법 (Asano and Myodo 1977)에 의하여 얻어졌다. 수분 후 30일째의 자방을 취하여 양 끝을 절제하여 버리고 원상으로 2.5 mm 크기로 자른 후, MS 무기염과 비타민 (Murashige and Skoong 1962)에 설탕 8%를 넣고 pH 6.3으로 조정된 배지에 60개의

절편을 배양하였으며 생장조절 물질은 첨가하지 않았다. 한천 0.8%를 첨가하여 28 mL의 시험관에 대하여 10 mL 씩 배지를 분주하였다. 알미늄 호일로 봉한 후 1 kg/cm 조건에서 10분간 고압멸균을 행하였다. 배양은 25±1°C에서 연속 조명 하에 실시하고 치상 후 170일째에 결과를 검토하였다.

캘러스의 증식과 재분화를 위한 배지의 검토

L. longiflorum × *L. elegans*의 잡종 배로부터 얻어진 캘러스 (Figure 1C)를 이용하여 MS (Murashige and Skoong 1962) 무기염과 비타민에 1 mg/L α-naphthalene acetic acid (NAA)와 설탕 4%를 첨가한 배지에서 배양하였다. 이 캘러스를 같은 성분의 새로운 배지에 계대배양하였으며 3회 계대배양한 캘러스를 이용하여 본 실험에 사용하였다. 캘러스의 증식과 재분화의 실험은 MS 무기염과 비타민의 기본 배지에 설탕 4%, 한천 0.8%를 첨가하고 pH 6.3으로 조정된 배지에 NAA 및 6-benzyladenine (BA)를 첨가하였다. NAA는 0, 0.1, 1 mg/L의 3단계, BA는 0, 0.1, 1, 5 mg/L의 4단계로 하고, 단독 또는 상호조합에 의해 12 실험구를 설정하고, 3회 반복 실험하였

Table 1. Number of germinated ovule on ovary segment culture of 30 days after pollination.

Cross	No. of tested segments of ovary	No. of germinated segments	No. of germinated ovule
<i>L. longiflorum</i> Georgia × <i>L. elegans</i> Kakutanohikari	60	48	86(28)*

* Number of abnormal germination are shown in the parenthesis.

Table 2. Effect of NAA and BA on callus growth and plant regeneration of *Lilium* cultivar *L. longiflorum* Georgia × *L. elegans* Kakutanohikari callus.

BA \ NAA	Callus			Plant regeneration		
	0 mg/L	0.1 mg/L	1 mg/L	0 mg/L	0.1 mg/L	1 mg/L
0 mg/L	7*	13	17	1**	14	21
	6	10	15	0	12	18
	7	7	18	2	9	14
(average)	(6.7)	(10.0)	(16.7)	(1)	(11.67)	(17.67)
0.1 mg/L	6	12	16	1	10	6
	5	13	13	4	8	5
	6	11	14	0	7	5
(average)	(5.7)	(12.0)	(14.3)	(1.67)	(8.33)	(5.33)
1 mg/L	6	18	14	5	3	4
	3	13	12	4	4	3
	6	17	13	6	3	2
(average)	(5.0)	(16.0)	(13.0)	(5.67)	(3.33)	(3.0)
5 mg/L	11	1	3	0	1	0
	7	2	2	0	0	0
	6	2	3	1	1	0
(average)	(8.0)	(1.7)	(2.7)	(0.33)	(0.67)	(0)

* Size(diameter) of callus = mm

** Number of plant regeneration

다. 각 실험은 3개의 시험관을 준비하고 각각 약 0.5 g의 캘러스를 치상하였다. 배양은 약 1500 Lux 연속 인공조명아래에서 60일간 행하였다.

또한 일부의 캘러스를 이용하여 MS 무기염과 비타민에 1 mg/L NAA를 첨가한 배지에 Pyridoxin-HCl을 0, 10, 50mg/L의 3단계로 하여 3개의 실험 구를 설정하여 Pyridoxin-HCl의 효과를 4회 반복 실험하였다.

재분화하고 있는 캘러스의 조직학적 관찰

NAA 1mg/L에 Pyridoxin-Hcl 50 mg/L를 넣은 구로부터 캘러스를 취하여 카르노이액에 고정하고 파라핀절편에 의해 15 μm의 연속절편을 만들어 삼중염색을 행하여 프레파라트를 제작하고 검정하였다.

결과 및 고찰

잡종 배로부터 발아의 상태

수분 30일째의 자방절편을 성장호르몬 free 배지에서 배양

하여 발아의 상태를 배양 120일째에 관찰하였다. 배양한 60개의 절편 중 48개의 절편에서 86개체의 배주가 발아되었다 (Table 1). 발아의 상태를 구분하면 1) 자엽이 성장하고 자엽의 정단에서 뿌리가 분화하거나 또는 그 부분이 팽대하여 인경이 형성되면서 제1엽이 분화하는 것, 2) 자엽이 성장하지 않고 종자로부터 뿌리와 인경이 분화하는 것, 3) 자엽이 성장하고 그 정단에서 뿌리와 인경이 분화하거나 그 아래쪽의 자엽이 캘러스화 하는 것, 4) 발아한 자엽이 두껍게 비대화하고 그 정단에서 뿌리와 인경이 분화하는 것, 5) 배가 캘러스로 탈분화하고 캘러스가 성장하면서 유식물체가 재분화하는 것, 6) 자엽이 발달하고 자엽이 불규칙적으로 부정배를 형성하는 것들이 관찰되었다 (Figure 1).

캘러스의 증식과 재분화를 위한 배지의 검토

캘러스 배양 60일 후의 성장호르몬의 영향에 대한 결과를 Table 2에 나타내었다. 캘러스 생장이 가장 양호한 구는 1 mg/L NAA를 단독으로 첨가한 구였으며 0.1 ppm NAA + 1 mg/L BA를 첨가한 구에서도 양호하였다. NAA의 농도를 1 mg/L로 고정하면 BA의 농도가 높을수록 캘러스의 생장은 좋지 않았으며, BA를 0.1 mg/L로 고정하면 NAA의 농도를 높게

Table 3. Effect of pyridoxin-Hcl on plant regeneration of *Lilium* cultivar *L. longiflorum* Georgia × *L. elegans* Kakutanohikari callus.

Pyridoxin-Hcl	Data				Total number of plant regeneration	Average
	1	0	1	1		
0 mg/L	1	0	1	1	3	0.8
10 mg/L	7	13	18	12	50	12.5
50 mg/L	38	13	28	32	111	27.8

할수록 캘러스의 생장은 좋아졌다. 또한 NAA의 농도를 0.1 mg/L로 고정하면 BA 농도 1 mg/L에서는 캘러스의 생장이 좋았지만 BA 5 mg/L에서는 아주 좋지 않았으며, BA 농도를 1 mg/L로 고정하면 NAA의 농도가 0.1 mg/L 까지는 캘러스의 생장이 양호하였지만 1 mg/mL NAA에서는 좋지 않았다.

배양 60일 후에 식물체의 재분화가 가장 양호한 것은 1 mg/L NAA를 단독으로 첨가한 구로, 재분화한 식물체의 개체 수는 평균 18개 이었다. 혼합배지에서 NAA를 1 mg/L로 고정하면 BA의 농도가 높아질수록 재분화는 낮아지고 특히 BA가 5 mg/L의 경우에는 재분화가 거의 이루어지지 않았다. 그러나 BA 1 mg/L 단독배지에서는 적기는 하지만 식물체가 재분화되어졌다. 따라서 NAA가 존재하면 BA는 식물체의 재분화에 장애물로 작용하는 것으로 보여 진다.

결과적으로 캘러스의 생장은 NAA를 첨가하지 않을 경우에는 BA를 0.1~1 mg/L, 1 mg/L NAA를 첨가할 경우에는 BA를 첨가하지 않거나 0.1 mg/L 정도 첨가하는 것이 효과적이었다. 또한, 식물체의 재분화에 있어서는 NAA가 0.1 mg/L의 경우에는 BA를 첨가하지 않거나 0.1 mg/L 정도 첨가하고, NAA가 1 mg/L의 경우에는 BA는 첨가하지 않는 것이 가장 좋은 효과를 나타내었다. 이들 결과를 종합해 보면 캘러스로부터 식물체를 재분화시키기 위해서는 1 mg/L NAA가 가장 효과적이었고, 재분화를 억제한 캘러스만을 증식시키기 위해서는 0.1 mg/L NAA + 1 mg/L BA가 가장 양호하였다.

또한 1 mg/L NAA를 첨가한 배지에서 Pyridoxin-HCl의 효과를 조사한 결과, Pyridoxin-HCl을 첨가하지 않은 경우에는 유식물체의 재분화가 거의 관찰되지 않았으나 50 mg/L의 Pyridoxin-HCl을 첨가한 배지에서 유식물체의 재분화가 가장 효과적이었다 (Table 3).

재분화하고 있는 캘러스의 조직학적 관찰

NAA 1 mg/L와 Pyridoxin-HCl을 50 mg/L 첨가하여 60일간 배양한 캘러스를 사용하여 재분화의 상태를 형태학적으로 관찰하였다.

캘러스 속의 세포는 매우 크고 세포질은 거의 없었다. 그러나 캘러스 표면의 세포는 크기가 작고 밀집되어 있으며, 분열조직임이 관찰되었다 (Figure 2A). 이것은 캘러스의 생장이 캘러스의 주변세포 분열에 의해 성장하는 주변분열형임을 시

사한다. 또한 캘러스의 표면 가까운 부분에 가도관이 많이 형성되어 있으며 이곳으로부터 핵이 현저하게 밀집된 세포질을 갖는 비교적 큰 서양배와 같은 세포가 관찰되었다 (Figure 2B). 이들은 일반적으로 전배와 같은 세포였다. 일차분열은 일반적으로 횡단분열을 하고, 같은 크기의 딸세포로 된다. 분열이 계속되어 원통과 같은 구형으로 변형하면서 정단분열조직을 갖는 경정으로 발달 (Figure 2C)하였다. 부정근 (Figure 2E)은 캘러스의 내부에서 분화하고 신장함에 따라 캘러스의 조직으로부터 외부로 성장하였다.

지금까지 조직배양에 의한 *Lilium*의 번식은 앞 절편 (Park et al. 2005), 화피 (Takayama and Misawa et al. 1979), 암술 (Montezuma-de-Carvalho et al. 1974)을 이용하였으며 가장 많이 이용한 것은 인편을 이용한 자구의 재생이다. 또한 캘러스 배양에 의한 재분화 연구도 많이 보고되어 왔다 (Kato and Yasutaka 1977; Novack and Petru 1981). 어떤 경우이든 캘러스의 생장 또는 줄기나 뿌리의 형성에는 auxin과 cytokinin의 균형이 중요하다. *Lilium* 잡종의 캘러스 배양에 있어서 (Simmonds and cumming 1976; Novak and Petru 1981) 5 μ M의 BA와 1 μ M의 NAA가 가장 효과적임이 보고되었다. *L. longiflorum* Georgia × *L. elegans* Kakutanohikari의 잡종 배로부터 얻어진 캘러스의 증식은 1 mg/L NAA 단독배지에서 가장 양호하였지만 NAA가 0.1 mg/L인 배지에서는 BA의 농도가 1 mg/L일때 가장 양호하였다.

*Lilium auratum*에 있어서 (Takayama and Misawa 1982) 구근의 형성에는 0.54 μ M NAA와 14 μ M BA가, *L. speciosum*에 있어서는 0.54 μ M NAA와 4.5 μ M BA가 효과적임을 보고하였다. 또한 *L. callosum*의 경우 (Park et al, 2005)는 0.5 mg/L NAA와 0.2 mg/L BA가 효과적이며, *L. concolor* var. parthenon의 경우에는 2.0 mg/L NAA과 0.2 mg/L BA가 효과적임을 보고하였다. *L. longiflorum* Georgia × *L. elegans* Kakutanohikari 잡종 배로부터 유도된 캘러스 유래 유식물체를 재분화시킨 본 연구에서는 1.0 mg/L NAA 단독 배지에서 유식물체의 재분화가 가장 잘 되었으며 BA를 첨가하는 경우에는 농도가 높을수록 재분화에 좋지 않은 결과를 보였다.

본 연구에서는 Pyridoxin-HCl을 50 mg/L 첨가한 경우 다량으로 유식물체를 얻을 수가 있었다. 보통의 MS 배지에는 Pyridoxin-HCl이 0.5 mg/L 들어있지만 본 연구에서는 50 mg/L 즉 보통보다 100배 정도의 농도에서 재분화가 현저히

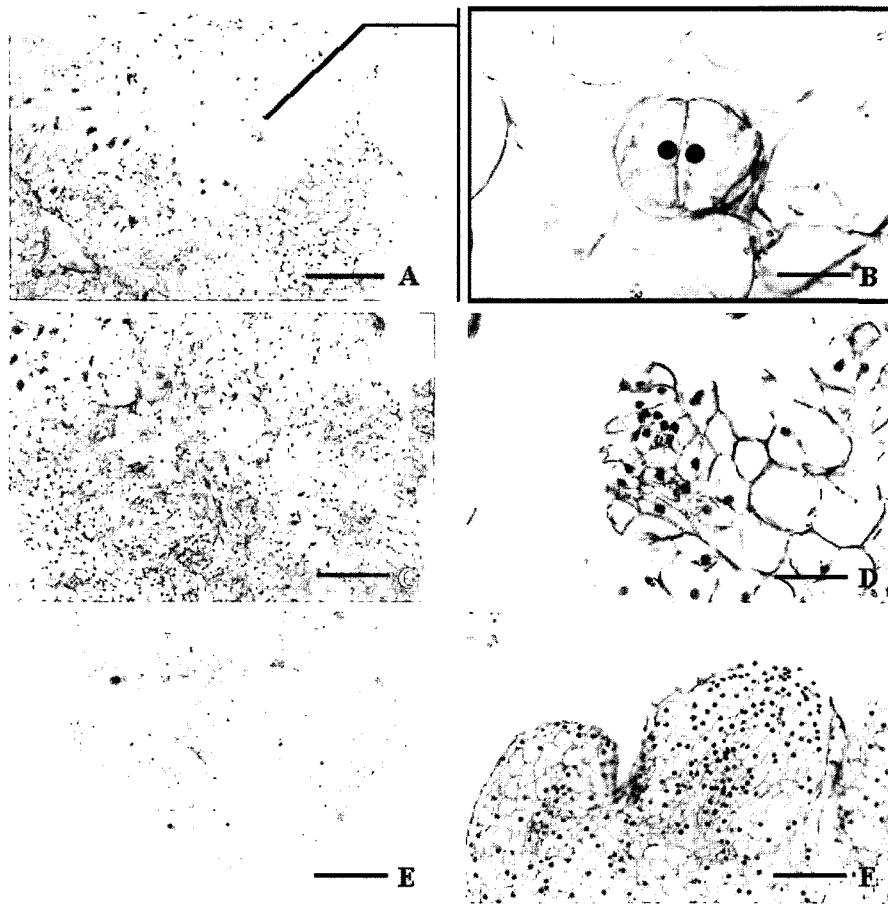


Figure 2. Section of callus induced from ovary slice culture of interspecific hybrid (*L. longiflorum* Georgia × *L. elegans* Kakutanohikari). A, Meristematic tissues induced from callus culture; B, Enlarged of A portion; C, Tracheid tissues induced from callus culture; D, Abnormal embryo formed at cell adjacent to tracheid; E, Root formation in callus tissue; F, Shoot formation from callus. bar = A, C, E, F_70 μm, B=7 μm.

양호한 결과를 나타내었다. Pyridoxin-HCl은 보통 비타민 B₆라고 부르는 것으로 단백질이나 아미노산의 신진대사나 핵산의 합성에 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서 다량의 Pyridoxin-HCl은 식물체의 재분화에 있어서 새로운 세포를 만드는데 관여하였을 것으로 추정된다.

*Triticum aestivum*의 미숙 배 배양에 있어서 세포분열은 배반 구역의 원형성층의 주변으로부터 형성된다고 보고하였으며 (Vasil et al. 1982b), 줄기와 뿌리의 정단 분열 조직은 서로 관계없이 독립된 기관이라고 생각하였으며, 옥수수의 미숙배를 이용하여 배양한 결과 증식 되어진 배반의 표면에서 정단 분열조직과 엽원기를 포함하는 경정의 분화가 있음을 보고하였다 (Springer et al. 1979). 즉 줄기와 뿌리의 분열조직은 독립된 기관으로서 서로 상관하지 않고 형성된다고 하였다. 본 실험에서도 캘러스의 표면으로부터 분열조직이 많이 형성되었고 (Figure 2A), 그 분열조직이 그대로 성장하여 부정근으로 발달되는 것으로 보여진다. 또한, 분열조직의 세포가 가도관이 형성된 지역 즉 원형성층의 지역에서 형성되어지고 있으며 (Figure 2C), 줄기와 뿌리의 분열조직이 서로 상관하지

않고 독립적으로 형성되고 있음을 관찰하였다(Figure 2E, F). *Pennisetum americanum* (Vasil and Vasil 1982a; Botti and Vasil 1984)의 미숙 배와 어린 꽃, *Saccharum officinarum* (Ho and Vasil 1983)의 어린 잎의 배양으로부터 얻어진 배발생 캘러스 속에서 하나의 세포로부터 체세포배가 발생한다고 보고하였는데, 본 연구에서도 배에서 발생된 캘러스의 원형성층 지역으로부터 체세포배가 형성됨이 확인되었다 (Figure 2A, C). 이러한 체세포배의 형성과정은 수정에 위한 전배의 출현 또는 난할과 대조되어진다고 생각되었다. 또한 본 실험에서 체세포배의 형성이 전형성층 부분에서 보이는 것으로 보아 *in vivo*에 있어서는 NAA가 전형성층 부분에서 배발생적 세포 또는 전배 발생의 증식을 자극하는 것으로 생각되었다.

적 요

L. longiflorum Georgia × *L. elegans* Kakutanohikari 잡종 배로부터 유식물체를 분화시키고, 이때 유도된 캘러스의 증식과 이 캘러스로부터 유식물체 분화 과정을 조직학적으로 관

찰하였다. 잡종 배는 배양한 60개 절편 중 48개 절편에서 86 개체의 배주가 발아되었으며, 1 mg/L NAA가 캘러스로부터 식물체의 재분화에 가장 효과적이었으며, 재분화를 억제한 캘러스만을 증식시키기 위해서는 0.1 mg/L NAA + 1 mg/L BA가 가장 양호하였다. 또한 Pyridoxin-HCl을 첨가하지 않은 경우에는 유식물체의 재분화가 거의 보이지 않았으며 50 mg/L의 Pyridoxin-HCl을 첨가한 배지에서 유식물체의 재분화가 가장 효과적이었다. 배에서 발생된 캘러스의 원형성층 지역으로부터 체세포배가 형성되었으며, NAA가 전형성층 부분에서 배발생적 세포 또는 전배 발생의 증식을 자극하는 것으로 생각되었다.

사 사

본 연구는 2005년도 공주대학교 자체학술 연구비 지원과 KOSEF (R01-2003-000-11683-0)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

- Asano Y, Myodo H (1977) Studies on crosses between distantly related species of lilies 1. For the intrastylar pollination technique. J Japan Soc Hort Sci 46: 59-65
- Botti C, Vasil IK (1984) The ontogeny of somatic embryo of *Pennisetum americanum* (L.)K. Schum II. In cultured immature inflorescence. Canad J Bot 62: 1629-1635
- Haekett WP (1969) Aseptic multiplication of lily bulblets from bulb scales. Intern Plant Prop Soc Proc 19:105-108
- Han BH, Suh EJ, Yae BW, Yu HJ (2004) Micropropagation of *Lilium longiflorum* 'Geogia' by using bioreactor. Kor J Plant Biotechnol 31: 197-201
- Ho W, Vasil IK (1983) Somatic embryogenic in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. Protoplasma 118: 169-180
- Joung HY, Sung MS, Lee WW, Yu CJ (1995) *In vitro* propagation *Lilium* oriental hybrid 'Casa Blanca' and *Lilium leichtalinii* var. *trigrinum* as influenced by growth regulators and cultural explant. RDA J Agri Sci 37: 378-386
- Kato Y, Yasutaka Y (1977) Plantlet formation and differentiation of epidermal tissue is green callus cultures from excised leaves of *Lilium*. Phytomorphology 27: 390-396
- Kim MS, Jeon JH, Youm JW, Kim JH, Lee BC, Kang WJ, Kim HS, Joung H (2005) Efficient plantlet regeneration via callus formation from leaf segment of *Lilium* oriental hybrid 'Casa blanca'. J Plant Biotech 7: 129-134
- Lian ML, Chakrabarty D, Paek KY (2002) Growth of *Lilium* oriental hybrid 'Casablanca' bulblet using bioreactor culture. Scientia Hort 97: 41-48
- Montezuma-de-Carvalho J, Guimaraes MML (1974) Differential cytokinin structure -activity relationships in *Phaseolus*. Plant Physiol 61: 72-75
- Murashige T, Skoong F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15: 473-497
- Nam SW, Kim-Lee HY (2003) Plant regeneration through adventitious bud formation and callus induction from scales of *Lilium lancifolium*. Kor J Plant Biotechnol 30: 53-58
- Ninimi Y, Onozawa T (1979) *In vitro* bulblet of formation from leaf segments of lilies, especially *Lilium rubellum* Baker. Actientia Horti 11: 379-389
- Novak FJ, Petru E (1981) Tissue culture propagation of *Lilium* hybrids. Scientia Hort 14: 191-199
- Park SY, Yoo YK, Jeong JH, Kim KS (1998) Effect of light scale explant conditions on propagation efficiency in *Lilium callosum* scale culture. Kor J Hort Sci and Tech 16: 358-360
- Park YC, Kim JS, Song SW, Kim YC, Kim KH (2005) Plant regeneration from leaf segments culture of several Jeju native lilies
- Robb SM (1977) The culture of excised tissue from bulb scales on *Lilium speciosum* Thun. J Expt Bot 8:348-352
- Shimmonds JA, Cumming (1976) Propagation of *Lilium* hybrids II. Productions of plantlets from bulb-scale callus culture for increased propagation rates. Scientia Hort 5: 161-170
- Sharp ER, Raskin RS, Sommer HE (1971) Haploidy in *Lilium*. Phytomorphology 21: 334-337
- Springer WD, Green CE, Kohn KA (1979) A histological examination of tissue culture initiation from immature embryos of maize. Protoplasma 102: 269-281
- Takayama S, Misawa M (1979) Differentiation in *Lilium* bulb-scales grown *in vitro*. Effect of various cultural condition. Physiol Plant 46: 184-190
- Takayama S, Misawa M (1982) Regulation of organ formation by cytokinin and auxin in *Lilium* bulb-scales grown *in vitro*. Plant Cell Physiol 23: 67-74
- Vasil V, Vasil IK (1982a) The ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum* (L.)K. Schum. In cultured immature embryos. Bot Gaz 143: 454-465
- Vasil V, Vasil IK, Haydu C, Wang D, Akins PO (1982b) Somatic embryogenesis in cereals and grasses. In E.D. Earle. ed. Plant regeneration and genetic variability. Praeger prss. New York
- Yoon ES (1991) Ovary slice culture as a technique of hybridization between incompatibility species of *Lilium*. Survival rate and germination rate of hybrid embryos. Kor J Plant Tiss Cult 18: 185-193