

중이온 Beam 조사가 담배 (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4)의 약과 캘러스 및 종자에 미치는 영향

배창휴 · Abe Tomoko¹ · 김동철² · 이영일³ · 정재성⁴ · 민경수⁵ · 이효연^{2*}

순천대학교 농업과학연구소, ¹일본 이화학연구소, ²순천대학교 농업생명과학대학, ³한국원자력연구소,

⁴순천대학교 자연과학대학, ⁵전남대학교 농과대학

Effect of a Heavy-Ion Beam Irradiation on Anthers, Calli and Seeds of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4)

BAE, Chang-Hyu · ABE, Tomoko¹ · KIM, Dong-Choul² · LEE, Young-Il³ · JUNG, Jae-Sung⁴ · MIN, Kyung-Soo⁵ · LEE, Hyo-Yeon^{2*}

Research Institute of Agricultural Science, Suncheon National University, Suncheon, 540-742, Korea ¹The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Wako-shi, 351-0198, Japan ²College of Agricultural Lifescience, Suncheon National University, Suncheon, 540-742, Korea ³Korea Atomic Energy Research Institute, Taejeon, 305-600, Korea

⁴College of Natural Science, Suncheon National University, Suncheon, 540-742, Korea

⁵College of Agriculture, Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Korea

ABSTRACT Effects of the heavy-ion (¹⁴N or ²⁰Ne) beam irradiation on the response of anthers, growth of calli, germination of seeds, and the early growth after the germination of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4) were investigated. Anthers precultured for 10 days before the irradiation became brown without callus or shoot induction over 20 Gy of ¹⁴N and ²⁰Ne ion beam irradiation. Relative growth rate of the cultured calli was reduced by the irradiation and became brown significantly 2 weeks after the ¹⁴N and ²⁰Ne ion beam irradiation over 50 Gy. The increased intensity of the heavy-ion (¹⁴N, ²⁰Ne) beam irradiation resulted in the delay of seed germination and the inhibition of the early growth both in water-treated and non-treated seeds before the irradiation. In addition, the heavy-ion beam irradiation to the imbibed seeds inhibited seed germination more than that to the non-imbibed seeds. The screening approach of non-imbibed seeds with heavy-ion beam irradiation using *in vitro* culture system was more useful than the filter-paper germination method in investigating the characteristics of heavy-ion beam-irradiated seed population and the screening of morphological variants at the early stage of the plant growth.

Key words: Morphological variant, screening, seed germination

서 론

돌연변이 식물체는 육종학적 측면이나 식물유전자의 기능

을 밝히는데 있어서 중요한 재료이다. 이러한 재료를 확보하기 위해서는 물리적 돌연변이원, 화학적 돌연변이원, T-DNA와 transposable element의 도입을 이용한 유전자 돌연변이 등 각종 돌연변이원을 이용하여 변이의 폭과 변이율을 향상시키는 노력이 필요하며 (Lee et al. 1989, 1996, 1998b, 1999; Song et al. 1999; Wang et al. 1988), 동시에 새로운 돌연변이원을 개발하는 방법도 모색되어야 한다. 지금까지 돌연변이원

중에서 X선, γ 선과 같은 방사선을 이용하여 각종 돌연변이체가 획득되고 있다 (Kim et al. 1996, 1998; Ling et al. 1991; Lee et al. 1996, 1998a; Nakamura and Hattori 1997; Song et al. 1999; Wang et al. 1988). 그러나, 중이온 beam을 이용한 연구는 아직 초보적인 단계에 있다. 중이온은 수소와 헬륨보다 무거운 원소의 원자로부터 방전현상을 이용하여 전자를 제거한 후 양이온화 한 핵을 일컬으며, 중이온 beam은 가속기 (cycrotron) 내에서 중이온을 고속으로 가속하여 만들 수 있는 고에너지원으로서 다른 돌연변이원 보다 강력한 돌연변이원으로 식물체에 형태적 변이를 높게 유발하는 것으로 보고되고 있다 (Abe et al. 1996, 1997a, 1997b; Iwai et al. 1999; Yatagai and Hanaoka 1994). 특히 중이온 beam은 조사의 위치와 심도의 조절이 가능하고 원소의 선택을 자유로이 할 수 있으며, 기존의 방사선 (이온 beam) 조사에 비해 수증공간에서 비산 거리가 길기 때문에 식물체의 적용범위가 넓은 장점이 있는 것으로 알려지고 있다 (Abe et al. 1997a, 1997b; Yatagai and Hanaoka 1994).

지금까지 식물에 있어 이온 beam 조사 연구로는 성숙종자를 이용한 것 (Shikazono et al. 1998; Yatagai and Hanaoka 1994)과 수분·수정기의 배발생 과정에 중이온 beam을 조사하여 고빈도의 형태적 변이체를 유도하는 연구 (Abe et al. 1996, 1997a, 1997b) 및 배양중인 약 또는 화분에 대한 영향을 보기 위하여 γ 선 (Hasegawa et al. 1995) 또는 이온 beam (Hamada et al. 1999; Nishimura et al. 1997)을 이용하여 변이체를 유발한 연구가 보고되었다. 이와 같이 방사선 처리를 이용한 돌연변이체에 대한 연구는 비교적 많이 보고되었으나 중이온 beam을 이용한 연구는 아직 시작 단계로서 앞으로 식물재료의 범위를 보다 확대함으로써 변이의 폭을 넓히는 일이 필요하다.

본 연구는 기내에서 배양중인 담배의 약과 캘러스, 그리고 종자에 중이온 (^{14}N , ^{20}Ne) beam을 조사하여 피조사체의 발아, 성장, 형태적 변화를 정상 식물체와 비교하여 돌연 변이 육종의 기초 자료를 얻는데 목적을 두고 있다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에 사용된 식물재료로는 담배 (*Nicotiana tabacum* L.) BY-4 품종의 약, 캘러스, 종자를 각각 사용하였다.

중이온 beam을 조사하기 위한 약의 준비는 담배식물체를 수경재배 하여 크기가 일정한 재료를 다량으로 채취하였다. 예비실험을 통하여 재분화가 양호했던 꽃봉오리의 크기가 12~15 mm의 것을 2% calcium hypochlorite 용액에서 10분간 침적한 다음 멸균수로 4회 세척하였다. 표면소독한 화아에서 분리한 약은 2 mg/L IAA와 1 mg/L kinetin 및 30 g/L su-

crose와 0.6% 한천이 첨가된 Nakata and Kurihara (1972) 배지에 20개씩 3반복으로 치상, 직경 6cm, 높이 0.6 cm의 샤프에서 10일간 배양한 후 중이온 beam을 조사하였다 (Hasegawa et al. 1995; Oh et al. 1994).

캘러스는 기내에서 발아 후 5주째인 식물체 잎을 5 mm²로 절단하여, 1.0 mg/L NAA와 0.1 mg/L BAP가 함께 첨가된 MS 배지 (Murashige and Skoog 1962)에 배양하여 캘러스를 유도하였다. 중이온 beam을 조사하기 위하여 캘러스를 4주간격으로 2회 계대배양 하고 beam 조사 1주일 전에 새로운 배지에 이식하였다. 캘러스 치상은 직경 9 cm, 높이 1.5 cm의 샤프 1개 당 직경 0.6~0.8 cm의 캘러스를 16개씩 치상하고 3반복 처리하였다.

종자에 중이온 beam을 조사하기 위하여 성숙 후 1개월 간 건조시키고 4°C에서 일주일간 저온처리한 당해 연도의 종자를 beam 조사 약 24 시간 전에 수분을 흡수시킨 종자와 흡수시키지 않는 종자로 구분하여 각각 사용하였다. 파종은 1.5% sugar, 0.8% 한천을 각각 포함한 1/2 MS 배지를 분주한 샤프 1개 당 100립씩 치상 하였다. 배양은 25±1°C의 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 명조건 하에서 행하였다.

중이온 beam의 조사

일본 이화학연구소 (和光)의 ring cycrotron 시설 (RRC)을 이용하여 배양 중인 약과 캘러스, 그리고 종자에 ^{14}N 과 ^{20}Ne (135 MeV/u) 이온 beam을 각각 조사하였다. 중이온 beam의 처리시간 및 조사 강도의 설정은 본 연구진이 이미 발표한 실험 결과 (Abe et al. 1996, 1997b; Bae et al. 1996, 1998)를 참고로 하여 행하였다. 약 조사는 ^{14}N 과 ^{20}Ne (135 MeV/u) 이온 beam을 0, 10, 20, 50, 100 Gy로, 캘러스 조사는 0, 5, 10, 20, 50 Gy로, 종자는 0, 5, 10, 20, 50, 100, 또는 200 Gy로 하였다. 중이온 beam을 조사한 식물체는 25±1°C의 배양실에서 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 광 하에서 배양하였다.

중이온 beam 처리체의 특징 조사

약에 미치는 중이온 beam의 영향은 중이온 beam을 조사한 후 30일째의 약으로부터 신초와 캘러스가 형성된 개체수를 조사하였다. 캘러스에 대한 영향은 중이온 beam을 조사한 후 1주일 간격으로 캘러스의 생중량을 조사하여 14일 후 상대생장율을 구하였다. 종자는 자엽이 전개한 것을 발아로 간주하여 중이온 beam을 조사한 후 2.5일 간격으로 발아율을 조사하였다. 초기 생장은 중이온 beam을 조사하여 발아한 유식물체의 근장, 신초장, 엽수를 파종 후부터 7일 간격으로 조사하였다. 건조종자에 미치는 중이온 beam의 영향을 조사하기 위해서, 중이온 beam을 조사한 종자를 여과지 상에서 발아시킨 경우, 조사 후 1주일째 50 Gy 이상의 선량에서 종자 발아가 전혀 관찰되지 않고 여과지 내 환경이 불안정하여 식

물체가 쉽게 고사하여 초기생장까지 관찰하기가 어려웠으므로 (Figure 2D), 50 Gy 이상의 선량에서도 백체가 출현하여 발아 후의 성장특성까지도 효과적으로 조사할 수 있는 기내 배양 방법을 사용하여 (Figure 2E) 피조사체들의 특성을 조사하였다.

결과 및 고찰

중이온 beam이 약의 캘러스 형성과 재분화에 미치는 영향

담배의 약에 중이온 beam을 조사한 다음 4주 후에 약으로 부러 유도된 캘러스 및 식물체의 재분화에 대한 결과를 살펴 보면, 동일한 10 Gy 선량의 경우 캘러스와 신초분화가 이루어진 빈도는 ^{14}N 이온 beam 조사에서 20.6%, ^{20}Ne 이온 beam 조사에서 6.7%를 나타내 이온 beam의 종류에 따라 차이를 보였다 (Figure 1, Figure 2A). 그러나, 20 Gy 이상 선량에서는 ^{14}N 과 ^{20}Ne 이온의 종류에 관계없이 모든 약이 고사하였는데, 이와 같은 유사한 결과가 다른 품종의 담배 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi)에서도 나타났다 (자료 미제시). H.mada 등 (1999)은 담배의 약을 재료로 하여 He 이온 beam을 50 Gy 이상 선량에서 조사시 약배양체에서 반응이 없었으나 C 이온 beam 조사시에는 25 Gy 및 200 Gy 선량에서 16.3%와 5.8%의 반응을 나타내어 선량에 따라 약의 반응이 조금씩 다른 것으로 나타났다. 또한 Hasegawa 등 (1995)은 담배의 약에 γ 선을 조사하여 2.5 Gy의 저선량에서 잎모양,

잎색깔, 잎반점, 꽃모양, 꽃색깔, 식물체형에서 형태이상을 나타내는 변이체가 28.6%까지 얻어졌음을 보고하였다. 본 실험에서 재분화 개체 중 형태이상을 보인 식물체빈도가 약 3%로 γ 선에서 보다 낮게 나타난 것은 관찰시기가 식물체의 초기 상태였던 점과 조사항목이 잎의 형태 이상이 큰 개체만을 대상으로 한 결과이기 때문이다. 위의 결과를 종합할 때 담배의 약에는 20 Gy 이하의 저선량의 중이온 beam을 조사함으로써 변이효율을 증대시킬 것으로 생각된다.

중이온 beam이 캘러스 생장에 미치는 영향

계대배양 후 7일째의 캘러스에 ^{14}N 과 ^{20}Ne 이온 beam을 0~50 Gy까지 각각 조사한 후 7일째와 14일째의 생중량을 조사하였다 (Table 1). ^{14}N 과 ^{20}Ne 이온 beam 모두 선량이 증가할수록 정상주에 비하여 캘러스의 상대생장율 (RGR)이 감소하였으며, 선량의 종류에 따른 상대생장율의 감소폭도 비슷한 경향으로 나타났다. 50 Gy 이상의 고선량에서도 캘러스의 생중량은 증가하였으나 중이온 beam을 조사한 후 2주째부터는 갈변하면서 고사하는 캘러스가 나타났다 (Figure 2C). 중이온 beam을 조사한 후 4주째에도 외관상 녹색을 보이는 캘러스를 식물체 재분화 배지 (MS배지 + 1.0 mg/L BAP + 0.1 mg/L NAA)에 배양하였으나 신초의 재분화는 이루어지지 않았다. 이와 같이 중이온 beam은 배양 중인 캘러스 세포 또는 염색체에 어떠한 변이를 주었는지 불분명하나 최소한 식물체의 재분화에 관련된 유전자에 변이를 발생시킨 것으로 생각된다. 카사바 식물 캘러스에서 10 Gy와 30 Gy의 γ 선 조

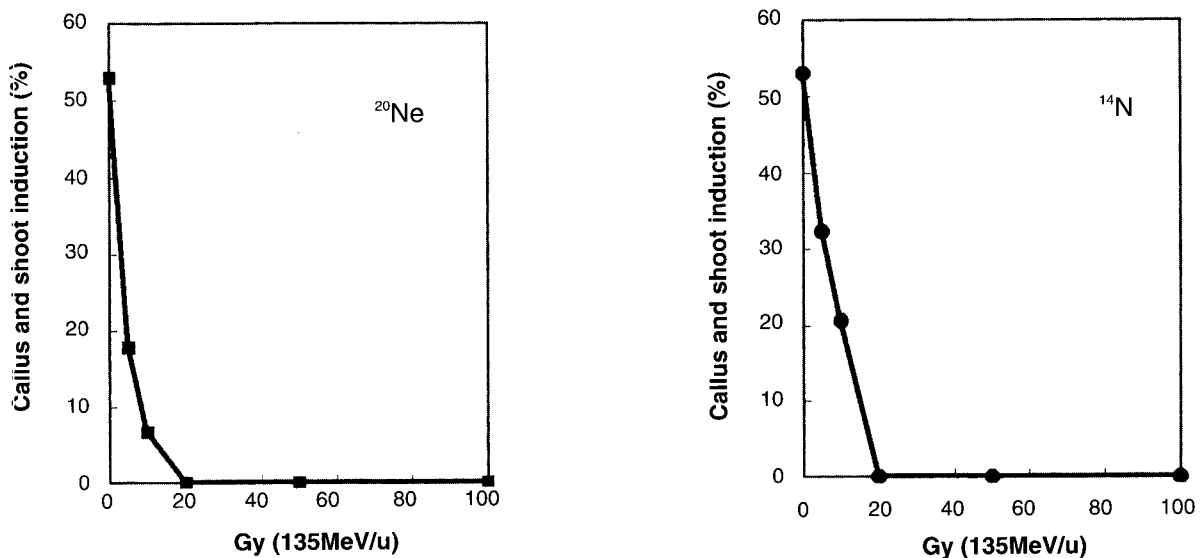


Figure 1. Effect of various intensities of the heavy-ion (^{14}N or ^{20}Ne) beam irradiation on callus and shoot induction from anthers of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4) at 4 weeks after the irradiation. Twenty anthers were precultured for 10 days before the heavy-ion beam irradiation.

Table 1. Effect of various intensities of the heavy-ion (^{14}N , ^{20}Ne) beam irradiation on fresh weight of calli from leaves of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4).

Mutagen	Gy (135 MeV/u)	Fresh weight of callus (mg) ^a			RGR ^d
		0 day ^b	7 days	14 days ^c	
^{14}N	0	318 ± 31	730 ± 71	978 ± 90	3.0
	5	240 ± 19	477 ± 34	617 ± 46	2.5
	10	332 ± 20	594 ± 33	711 ± 36	2.0
	20	264 ± 22	430 ± 37	507 ± 47	1.9
	50	278 ± 24	421 ± 36	509 ± 40	1.8
^{20}Ne	0	220 ± 20	445 ± 50	629 ± 75	2.8
	5	227 ± 6	404 ± 16	588 ± 18	2.3
	10	289 ± 10	481 ± 20	617 ± 23	2.1
	20	279 ± 18	438 ± 27	539 ± 36	1.9
	50	327 ± 34	474 ± 43	594 ± 51	1.8

^aTwenty calli cultured on Murashige and Skoog (1962) medium containing 1.0 mg/L NAA and 0.1 mg/L BAP were collected for data analysis. Data presented are means of 3 replications with SE.

^dRelative growth rate; c/b.

Table 2. Effect of various intensities of the heavy-ion (^{20}Ne) beam on germination rate of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4) seeds without water treatment before irradiation^a.

Time	0 Gy ^b	5 Gy	10 Gy	20 Gy	50 Gy	100 Gy
0 day ^c	0.0 ^d	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2.5 day	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5 day	25.0	18.3	17.8	14.5	3.7	0.0
7.5 day	86.3	92.3	91.4	85.4	87.9	1.7
10 day	95.9	95.8	95.0	92.3	93.9	97.4
15 day	96.1	96.5	96.4	94.0	96.9	99.1
20 day	96.1	96.5	96.4	94.0	96.9	99.1
25 day	96.1	96.5	96.4	94.0	96.9	99.1
30 day	96.1	96.5	96.4	94.0	96.9	99.1

^aSeeds produced fully expended cotyledons were considered to be germinated.

^bIrradiation intensity of ^{20}Ne ion beam (135 MeV/u).

^cThe day after ^{20}Ne ion beam irradiation.

^dThe rate of germination (%).

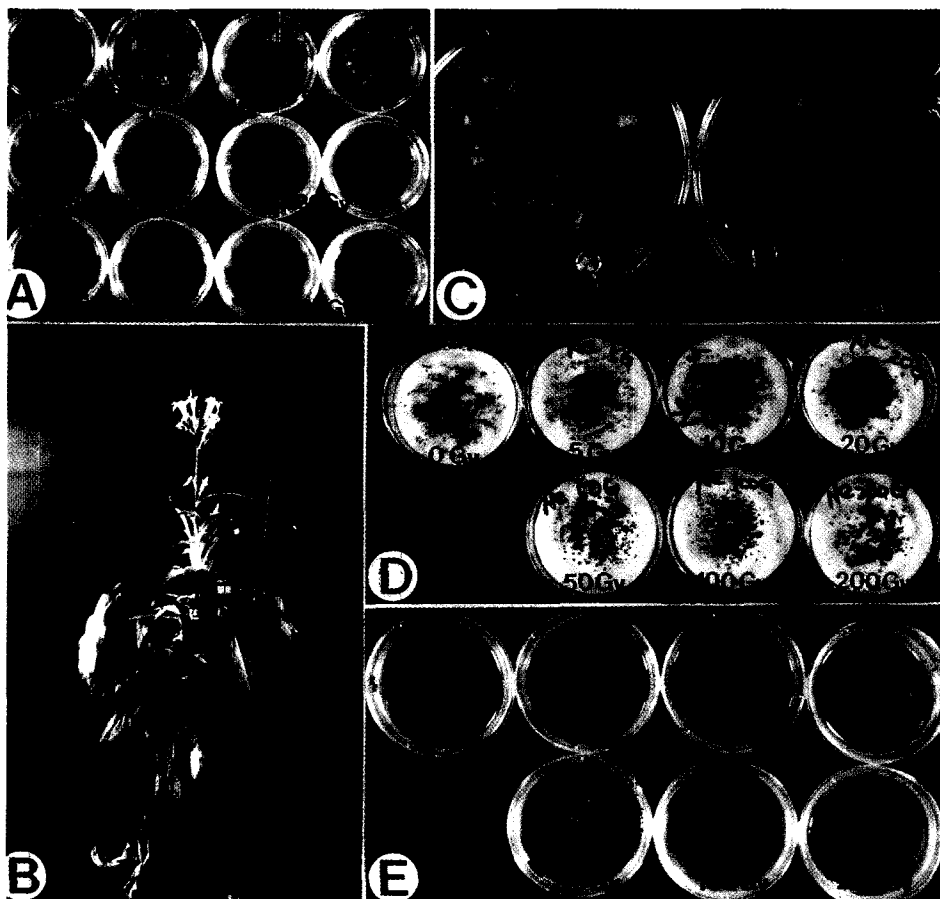


Figure 2. Effect of the heavy-ion (^{14}N or ^{20}Ne) beam irradiation on the responses of anthers (A), calli (C), germination pattern of seeds (D, E), and an anther derived variant (B) of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4). A, Callus and shoot induction of anthers with ^{14}N ion beam irradiation; B, An anther derived variant showing multiple leaves with ^{14}N ion beam irradiation; C, Calli cultured for 2 weeks after 50 Gy of ^{14}N ion beam irradiation; D, Germination pattern of dried seeds cultured on the filter papers; E, Germination pattern of seeds cultured on *in vitro*. Seeds were irradiated with ^{20}Ne ion beams at 24 hr after water treatment (E).

사가 캘러스 세포생장에 거의 영향을 미치지 않은 것 (Lee et al. 1999)과 비교할 때, 본 연구에서 중이온 beam을 5~20 Gy 처리시에도 상대생장율이 감소한 것 (Table 1)은 식물종에 따른 감수성의 차이이거나 돌연변이원에 따른 차이로 생각된다. 상기의 결과로부터 캘러스를 이용한 변이체를 개발하기 위해서는 이미 세포배양 중 일어나고 있는 체세포군 변이와 중이온 beam의 선량을 최적화 시킨 돌연변이원을 병행처리함으로써 효과적으로 변이체를 선발할 수 있다고 본다.

종자의 발아에 미치는 영향

종자에 수분처리 여부에 따른 중이온 beam의 영향을 조사하기 위해 먼저 중이온 beam을 조사하기 전에 수분을 처리하지 않고 beam을 조사하여 종자의 발아 및 초기 성장을 검토하였다. ^{20}Ne 이온 beam을 조사한 종자를 기내에 배양한 후 시간의 경과에 따라 발아를 관찰한 결과

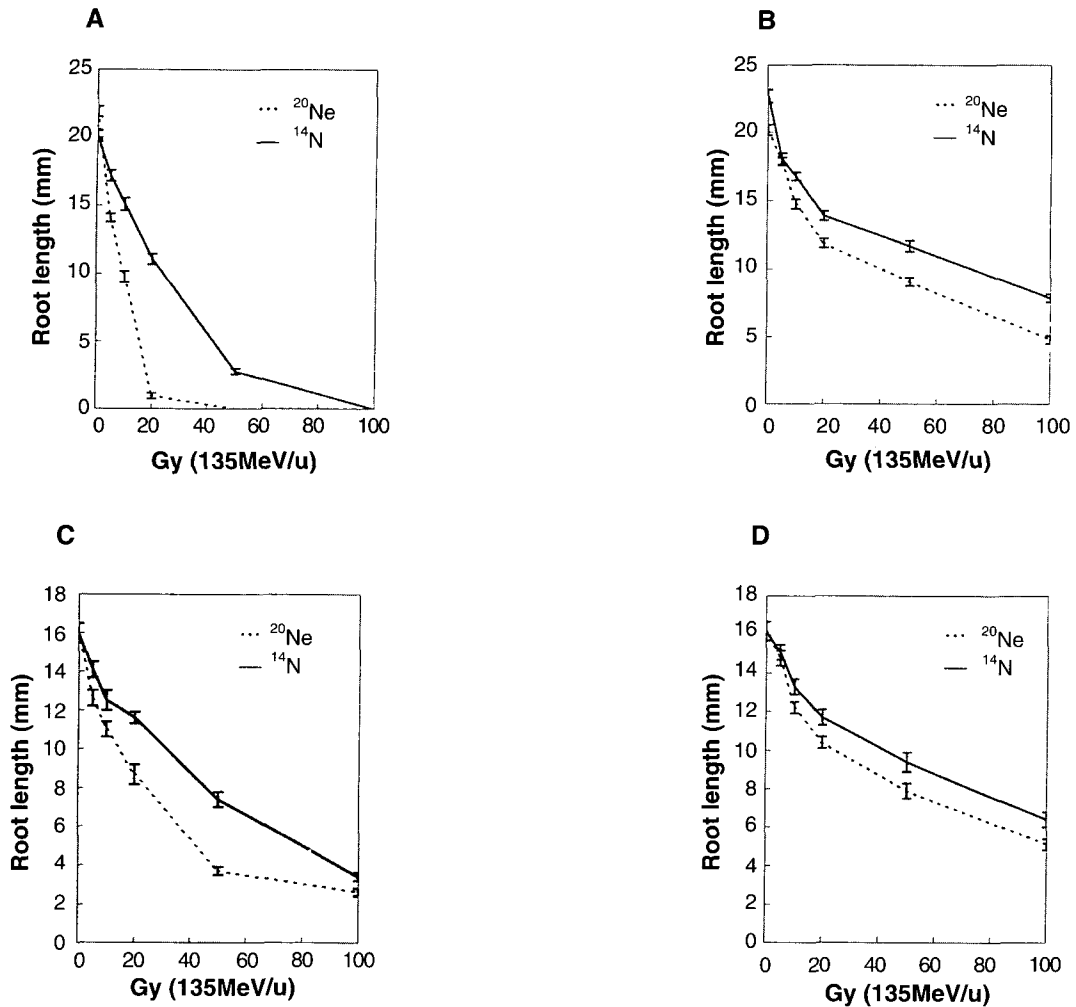


Figure 3. Effect of various intensities of the heavy-ion (^{14}N or ^{20}Ne) beam irradiation on the root length (A, B), and shoot length (C, D) of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4) after 3 weeks culture of irradiation. A and C: Water treatment; B and D: Non-water treatment.

의 나타나지 않았다.

이상의 결과를 종합하면 담배 BY-4 품종을 이용하여 중이온 beam을 여러 가지 재료에 조사한 결과 식물재료에 따라 조사선량에 대한 감수성이 다양하게 나타났다. 배양중인 약은 켈러스나 종자에 beam을 조사한 경우 보다 낮은 선량에서 고사하였고 조사선량에 대한 감수성이 종자나 켈러스의 경우 보다 큰 것으로 나타났다. 선중에 따른 영향으로는 ^{14}N 보다는 ^{20}Ne 이온 beam 처리에서 약의 반응과 유식물의 초기생장을 크게 억제하는 것으로 나타났다. 그러나, 종자에 100 Gy 이상 고선량 처리시에는 ^{14}N 가 ^{20}Ne 이온 보다 발아를 억제하는 효과가 컸다. 본 연구에서 특기할만한 형태변이 식물체로는 ^{14}N 이온 beam을 조사한 처리구에서 다엽이 발생하는 변이체 (Figure 2B)와 화기가 다수 발생하는 변이체, 그 밖에도 4일 간 배양한 후 5 Gy의 중이온 beam을 조사한 처리구에서는 안토시아닌 결핍을 보이는 화색변이체가 유발되었다. 이러한 변이체는 식물분자생물학의 발전에 따른 기능유전자

의 해석에 필요한 연구재료로서 매우 유익하게 활용될 수 있으며, 육종의 소재로 사용하는데도 유용하기 때문에 중이온 beam을 이용한 돌연변이식물체 개발에 대한 효과가 기대된다.

적 요

배양 중인 담배의 약과 켈러스, 그리고 종자에 중이온 (^{14}N 또는 ^{20}Ne) beam을 조사하여 중이온 beam 조사가 약의 반응, 켈러스의 성장, 종자의 발아와 초기 생장에 미치는 영향을 조사하였다. 중이온 beam을 조사하기 전 10일간 preculture 한 다음 beam을 조사한 약은 ^{14}N , ^{20}Ne 모두 20 Gy 이상의 선량에서 켈러스 또는 싹초유도가 없이 고사하였다. 배양 중인 켈러스는 ^{14}N 와 ^{20}Ne 이온 beam의 조사로 상대생장율이 감소하였고, 중이온 beam 조사 2주 후부터는 50 Gy 이상 선

량 처리구에서 심하게 갈변하였다. 종자에 미치는 중이온 beam 조사의 영향으로 수분을 처리한 후 또는 수분 처리 없이 beam을 조사한 종자 모두에서 선종에 관계없이 선량이 증가함에 따라 발아를 지연시키며 유묘의 초기 생장을 억제하였다. 또한 수분을 흡수시킨 후 중이온 beam을 조사한 경우가 수분을 흡수시키지 않고 beam을 조사한 경우 보다 종자의 탈아를 심하게 억제시켰다. 건조 상태의 종자에 중이온 beam을 조사한 경우 피조사체들의 특성과 생장의 초기단계에서 형태적 변이체를 검토하는데는 여과지를 이용한 방법보다 기내에서 배양하는 방법이 보다 효과적이었다.

사-사-본 논문은 과학기술처 원자력연구개발과제 (1999)의 연구결과의 일부이다.

인용문헌

- Abe T, Bae CH, Matsuyama T, Yoshida S (1997a) Hormone mutants obtained by heavy-ion beam irradiation. *Am Soc Plant Physiol* **5**:787
- Abe T, Bae CH, Yoshida S (1997b) An effective mutation method for plants using heavy-ion beams. *RIKEN Accel Prog Rep* **30**: 127
- Abe T, Kumata S, Torashima T, Kitayama S, Yoshida S (1996) Effect of heavy-ion beams during the fertilization cycle of plants. *RIKEN Accel Prog Rep* **29**: 165
- Bae CH, Abe T, Min KS, Kim DC, Jung JS, Lee CW, Lim YP, Lee HY (1998) Mutation induction and selection of salt-tolerant plants by heavy-ion beam irradiation in tobacco proembryo. *Kor J Plant Tiss Cult* **25**: 103-107
- Bae CH, Abe T, Yoshida S (1996) Characterization of salt-tolerant plants induced by heavy-ion beams irradiation. *Chem Regul Plants* **31**: 218
- Hamada K, Inoue M, Tanaka A, Watanabe H (1999) Potato virus Y-resistant mutation induced by the combination treatment of ion beam exposure and anther culture in *Nicotiana tabacum* L. *Plant Biotech* **16**: 285-289
- Hasegawa H, Takashima S, Nakamura A (1995) Effect of gamma-ray irradiation on cultured anthers of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Radioactivity and morphological variants appearing in the haploid plants. *Plant Tiss Cult Lett* **12**: 281-287
- Iwai H, Abe T, Yoshida S, Kamada H, Satoh S (1999) Production of non-organogenic and loosely attached callus in leaf disk cultures of haploid *Nicotiana plumbaginifolia* by ^{14}N ion beam irradiation. *Plant Biotech* **16**: 307-309
- Kim JS, Shin IC, Lee YK, Kim JK, Song HS (1998) Effects of gamma ray on the seedling growth of rice varieties. *Kor J Breed* **30**: 227-231
- Kim JS, Shin IC, Oh JH, Park YS, Lee YH (1996) Reaction to late blight (*Phytophthora infestans*) and RAPD polymorphisms of potato mutants induced from *in vitro* culture of nodal stem by γ -ray irradiation. *Kor J Breed* **28**: 323-331
- Lee EK, Kim JS, Lee YK, Lee YB (1998a) Effect of low dose γ -ray irradiation on the germination and growth in red pepper (*Capcium annuum* L.). *J Kor Soc Hort Sci* **39**: 670-675
- Lee HS, You SH, Kwon SY, Kim JS, Kwak SS (1999) Gamma radiation-induced changes of antioxidant enzymes in callus cultures of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Kor J Plant Tissue Cult* **26**: 53-58
- Lee HY, Jung JS, Lee JS (1998b) Induction of chlorophyll deficient mutant plant of *Cymbidium kanran* by EMS treatment. *Kor J Plant Tissue Cult* **25**: 183-187
- Lee HY, Nou IS, Kim JH, Liu JR, Lee JS, Kim HJ, Kameya T (1989) Development of bialaphos resistant transgenic tobacco plants by pollination and utilization of fertilization cycle. *Kor J Plant Tissue Cult* **21**: 99-103
- Lee YI, Kim JS, Shin IC, Kang KK (1996) Selection from γ -ray-induced leaf mutants in *Perilla frutescens*. *Kor J Breed* **28**: 75-79
- Ling DX, Luckett DJ, Darvey NL (1991) Low-dose gamma irradiation promotes wheat anther culture response. *Aust J Bot* **39**: 467-474
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497
- Nakamura K, Hattori K (1997) Effect of ^{60}Co gamma-ray irradiation at different culture stages on rice anther culture. *Breed Sci* **47**: 101-105
- Nakata K, Kurihara Y (1972) Competition among pollen grains for haploid tobacco plant formation by anther culture. II. Analysis with resistance tobacco mosaic virus (TMV) and wildfire diseases, leaf color, and leafbase shape characters. *Jpn J Breed* **22**: 92-98
- Nishimura H, Inoue M, Tanaka A, Watanabe H (1997) Pollen as a transporter of mutations induced by ion beams in *Nicotiana tabacum*. *Can J Bot* **75**: 1261-1266
- Oh SC, Soh WY, Cho DY, Yang DC (1994) Enzyme activity in plant regeneration from diploid and haploid calli of *Nicotiana tabacum* cv. BY-4. *Kor J Plant Tissue Cult* **21**: 333-339
- Shikazono N, Tanaka A, Waytanabe H, Tano S, Fukunish N, Kitayama S (1998) Effects of heavy ions on survival of *Arabidopsis thaliana*. *RIKEN Accel Prog Rep* **31**: 147
- Song HS, Kim JK, Lim YT (1999) A new variety of rose of sharon (*Hibiscus syriacus*) "Baekseol" selected from γ -ray irradiated population. *Kor J Breed* **31**: 458-460
- Wang AS, Cheng DSK, Milcic JB, Yang TC (1988) Effect of X-ray irradiation on maize inbred line B73 tissue cultures and regenerated plants. *Crop Sci* **28**: 358-362
- Yatagai F, Hanaoka F (1994) Biological effects of heavy ions. *RIKEN Review* **4**: 41-42