

Lilium longiflorum 'Nellie White'의 인편으로부터 Friable 배발생 캘러스를 통한 소자구 분화

한봉희^{1*}, 이수영, 서은정, 우종규

¹원예연구소 생명공학과

Bulblet Differentiation through the Formation of Friable Embryogenic Callus from Bulb Scales of *Lilium longiflorum* 'Nellie White'

Bong-Hee Han^{1*}, Soo-Young Lee, Eun-Jung Shu, Jong-Gyu Woo

¹Horticulture, Biotechnology, Division, Horticulture Research Institute, RDA, Suwon 440-310, Korea

ABSTRACT A series of experiments were performed to establish regeneration system through friable embryogenic callus (FEC) of *Lilium longiflorum* 'Nellie White'. Only hard and regular callus was induced from bulb scales on medium containing 2.0 mg/L dicamba and 30~90 g/L sucrose. The induced hard callus was subcultured on medium with 2.0 mg/L dicamba and 30 g/L sucrose, and used as a material for induction of FEC. In order to induce FEC, induced hard and regular callus was chopped into 1~2 mm segments, and re-cultured on medium with 2.0 mg/L dicamba and 90 g/L sucrose. FEC was induced from chopped hard calli by the subcultures of two months interval. The induction rate of FEC was enhanced when hard callus was subcultured on same medium. FEC was proliferated more than 5 times on medium with 1.0~2.0 mg/L dicamba and 90 g/L sucrose. Bulblet differentiation from FEC was very favorable on MS medium supplemented with 0.1 mg/L BA, 1.0 mg/L NAA and 30 g/L maltose, but many differentiated bulblets were changed to vitrified ones. The differentiation of normal bulblets was most effective on medium containing 0.5~1.0% activated charcoal and 30 g/L sucrose.

Key words: Activated charcoal, dicamba, friable embryogenic callus (FEC), *Lilium*, maltose, sucrose

서 론

나리는 *Liliaceae* (백합과)에 속하는 단자엽 식물로 화훼에서 대표적인 구근류의 하나이고 절화 또는 분화로써 이용되고 있다. 나리에서 많은 기내육종의 성공은 기내에서 사용되고 있는 재료가 유전적으로 얼마나 안전한가에 달려 있으며, 기내선발, 원형질체 융합, 형질전환 등에 있어서 캘러스를 통하여 식물체를 재분화하는 방법이 매우 유용하게 사용되고 있다. 구근류에서 캘러스 배양을 통한 다양한 식물체 재분화 방법은 *Alstroemeria* (van Schaik et

al. 1996), *Freesia* (Wang et al. 1990), *Gladiolus* (Kamo et al. 1990), *Hemerocallis* (Smith and Krikorian 1991), *Iris* (Laublin et al. 1991), *Tulipa* (van den Bulk et al. 1995) 등에서 확립되었다. Haensch (1996)는 *Lilium* hybrid의 인편에서, Tribulato 등 (1997)은 *L. longiflorum*의 화경과 화병에서 캘러스 과정을 통한 체세포배 발생에 의한 식물체 재생에 관하여 보고하였다. Nhut 등 (2002)은 *L. longiflorum*에서 pseudo-bulblet thin cell layer으로부터 직접적으로 체세포배 발생에 성공하였다. 한편으로 *Agrobacterium* mediated 방법이나 유전자총 체계에 의한 식물체 형질전환은 식물체 육종 연구에서 새로운 육종방법으로 인식되고 있다. 유용한 유전자들이 유전자 도입에 의하여 식물체의 많은 종들에 유입될 수 있다. 그러나 형질전환 체

*Corresponding author Tel 031-290-6197 Fax 031-290-6219

E-mail: bhhan@rda.go.kr

의 개발은 필수적인 요소이며 (Taylor et al. 1996; Raemakers et al. 1997), 단자엽식물에서 배발생 캘러스는 유전자 전환을 위한 가장 좋은 재료 중의 하나이다 (Smith and Hood 1995).

따라서 본 실험은 *L. longiflorum* 'Nellie White' 인편에서 단단한 일반 캘러스를 유도하고, 유도된 단단한 캘러스를 재배양하여 배 발생 캘러스를 유도, 증식하는 효과적인 부서지기 쉬운 배 발생 캘러스 (FEC)의 유도, 증식 체계를 확립하고 FEC로부터 식물체 재분화 체계를 확립한 후 유전자 전환에 이용하고자 실시하였다.

재료 및 방법

식물재료

식물재료는 *Lilium longiflorum* 'Nellie White'를 사용하였으며 단단한 캘러스를 유도하기 위하여 MS 기본배지 (Murashige and Skoog 1962)에 90 g/L sucrose가 첨가된 배지에서 생육하고 있는 자구의 인편을 사용하였다. 유도된 단단한 캘러스는 MS 기본배지에 30 g/L sucrose, 2.0 mg/L dicamba가 첨가된 배지에서 2개월 간격으로 계대배양하면서 부서지기 쉬운 배 발생 캘러스를 유도하기 위한 재료로 사용하였다. 소자구 분화는 인편에서 발생한 캘러스에서 유도된 부서지기 쉬운 배 발생 캘러스를 증식하여 사용하였다.

Friable embryogenic callus (FEC)의 유도 및 증식

'Nellie White'의 인편에서 단단한 일반 캘러스를 유도하기 위하여 2.0 mg/L의 dicamba가 첨가된 MS배지에 30, 60, 90 g/L sucrose를 첨가하여 sucrose 농도가 단단한 일반 캘러스의 유도에 미치는 영향을 조사하였다. 유도된 단단한 일반 캘러스에서 부서지기 쉬운 배 발생 캘러스 (FEC)를 유도하기 위하여 단단한 일반 캘러스를 1~2 mm로 잘게 절단하여 배양하였다. 배지는 단단한 일반 캘러스 유도배지와 동일한 배지를 사용하였다. 단단한 일반 캘러스와 FEC를 증식하기 위하여 sucrose 농도 (30~90 g/L)와 dicamba 농도 (0~2.0 mg/L)를 달리한 배지에서 각각의 캘러스를 배양하였으며 배양 5~6주 후에 증식정도를 조사하였다.

Friable embryogenic callus (FEC)에서 소자구 분화

FEC에서 소자구의 분화는 활성탄 농도를 0~1.0%로 달리한 배지와 0.1 mg/L BA와 1.0 mg/L NAA가 첨가된 배지에 MS 무기염류 농도를 1/2x, 1x, 30 g/L sucrose 또는 30 g/L maltose를 첨가한 배지에 FEC를 배양하였다. 배지는 직경 페트리디쉬 (87 x 15 mm)에 25 mL의 배지를 분주하였고 반복은 단단한 일반 캘러스 유도의 경우, 페트리디

쉬 당 10개의 인편을 배양하여 페트리디쉬 10개로 10반복 하였으며, FEC 유도는 10개의 인편에서 유도된 일반 캘러스를 chopping 하여 페트리디쉬 당 10개로 나누어 배양하여 처리구당 10개의 페트리디쉬를 반복 사용하였다. 일반 단단한 캘러스와 FEC의 증식은 유도된 캘러스를 10 무더기로 나누어 한 개의 페트리디쉬에 배양하였고 처리구당 페트리디쉬 5개를 반복 사용하였다. 소자구 분화는 유도된 FEC 무게를 정량하여 페트리디쉬에 배양하였으며, 분화 후 FEC 1 g당 분화 개체수를 계산하였다. 일반 단단한 캘러스와 FEC의 증식율은 최종무게 - 처음무게/처음무게 × 100 (%)로 계산하였다.

배양방법

배양은 25±2℃로 조절되는 배양실에서 배양하였으며, 인편에서 일반 단단한 캘러스의 유도는 3개월간 암배양 하였으며, 일반 단단한 캘러스에서 FEC의 유기는 2개월 간격으로 암배양 하면서 조사하였다. 일반 단단한 캘러스와 FEC 캘러스의 증식 및 FEC에서 소자구 분화는 6주간 암배양한 후에 조사하였다.

결과 및 고찰

L. longiflorum 'Nellie White' 인편에서 단단한 캘러스의 형성

단단한 일반 캘러스를 유도하기 위하여 2.0 mg/L dicamba가 첨가된 MS 배지에 sucrose 농도를 30, 60, 90 g/L로 달린 배지에 인편을 배양하여 1개월 간격으로 동일배지에 계대배양 하였으며, 배양 3개월 후에 캘러스 유도율 및 인편당 유도된 캘러스의 무게를 조사하였다. 일반 단단한 캘러스의 유도율은 모든 배지에서 70% 이상으로 매우 높았으며, 유도된 캘러스의 무게는 2.0 mg/L dicamba와 sucrose 60 및 90 g/L가 첨가된 MS배지에서 270 mg 이상으로 다른 처리구 보다 높았다. 따라서 인편에서 일반 단단한 캘러스의 유도는 MS 배지에 2.0 mg/L dicamba 및 sucrose 60 혹은 90 g/L가 첨가된 배지가 적합하였다 (Figure 1, 6A). 2.0 mg/L dicamba와 30 g/L sucrose가 첨가된 배지에서 유도된 단단한 캘러스는 약간 다즙한 경향을 보였다. Dicamba는 옥신 중에서 NAA와 2,4-D 사이의 활성을 가지고 있으며, 단용 또는 싸이토키닌과 혼용으로 많은 식물체에 적용되고 있다 (Grando et al. 2002; Marcinska and Wedzony 2002).

Friable embryogenic callus (FEC) 유도 및 증식

유도된 일반 단단한 캘러스에서 FEC를 유도하기 위하여 단단한 일반 캘러스를 1~2 mm로 잘게 절단하여 2.0 mg/L

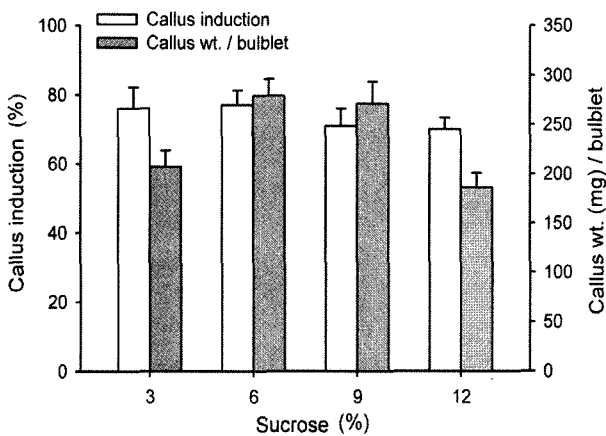


Figure 1. Hard callus induction from bulb scales of *Lilium longiflorum* 'Nellie White' after 3 months in culture.

dicamba가 첨가된 MS 배지에 sucrose 농도를 달리한 배지에 배양하였다. 배양 2개월마다 동일배지에 계대배양하면서 FEC의 발생율을 조사한 결과, MS 배지에 2.0 mg/L dicamba 및 90 g/L sucrose가 첨가된 배지에서만 FEC가 유도되었으며 유도율도 매우 낮았다. 1차 계대배양에서는 1%, 2차와 3차 계대배양에서는 3%의 FEC가 유도 되었다 (Table 1, Figure 6B). 일반적으로 체세포배 발생 캘러스의 유도는 sucrose 농도와 오옥신 특히 2.4-D와 dicamba에 의하여 유도된다. Aly 등 (2002)은 *Limonium*과 *Armeria maritima*의 체세포배 배양에서 1.0 mg/L 2.4-D와 88~118 mM sucrose가 첨가된 배지에서 체세포배 캘러스를 유도하였다고 보고하였으며, Jach와 Przywara (2000)은 해바라기 미성숙 배배양에서 350 mM sucrose가 포함된 MS 배지에서 체세포 배 발생율이 가장 높았다고 보고하였다. Tribulato 등 (1997)은 *L. longiflorum*에서 2 μM dicamba를 첨가하여 부서지기 쉬운 배발생 캘러스를 유도하였다고 보고하였다. Akula 등 (1999)은 보리의 성숙배로부터 식물체 재분화에 관한 실험에서 2.4-D, picloram, dicamba는 처음 성숙배로부터 캘러스 유도에 매우 효과적이었으며 동일배지에 2~3회 계대배양하여 크립같이 희고 단단한 캘러스를 유도하였다고 보고하였다. 본 실험에서도 처음 나리 인편에서 2.0 mg/L dicamba와 30~120 g/L sucrose가 첨가된 배지에서 단단한 캘러스만

Table 1. Induction of friable embryogenic callus from induced hard and regular callus segments of *Lilium longiflorum* 'Nellie White' according to subcultures and sucrose concentrations. MS medium was containing 2.0 mg/L dicamba, and cultures were cultured to same medium with the interval of two months

Sucrose (g/L)	Induction of friable callus (%)		
	1st subculture	2nd subculture	3rd subculture
30	0	0	0
60	0	0	0
90	1	3	3

유도되었고 유도된 단단한 캘러스를 다시 동일 배지에 절단하여 계대배양한 결과, 2.0 mg/L dicamba와 90 g/L sucrose가 첨가된 배지에서만 FEC가 유도되었다.

MS 기본배지에 2.0 mg/L dicamba와 sucrose 농도를 30, 60, 90 g/L로 달리하여 첨가한 배지에서 단단한 일반 캘러스와 FEC를 증식하였다. Sucrose 농도에 관계없이 일반 단단한 캘러스는 약 1~1.5배의 증식율을 보인 반면, FEC는 5~6배 정도의 높은 캘러스 증식율을 보였다 (Figure 2). 그러나 30 g/L sucrose가 첨가된 배지에서는 증식된 FEC가 다즙한 현상을 보였다 (결과생략). Dicamba 농도가 캘러스의 증식에 미치는 영향에서도 단단한 캘러스보다 FEC의 증식율이 월등히 높았으며, 1.0 mg/L dicamba 첨가배지가 9.2 배로 FEC 증식율이 가장 높았으며, 다음이 2.0 mg/L dicamba였다 (Figure 3, 6C). Trifonova 등 (2001)은 *Agrobacterium*에 의한 보리의 형질전환 실험에서 dicamba는 callus 유도 및 유지에 2.4-D보다 우수하였다고 하였으며, Castillo 등 (1998)

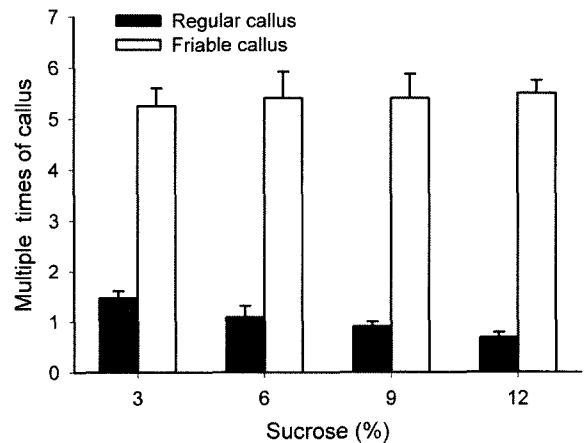


Figure 2. Growth comparison of regular and friable calli of *Lilium longiflorum* 'Nelle White' on the medium with 2.0 mg/L dicamba after 5 weeks in culture.

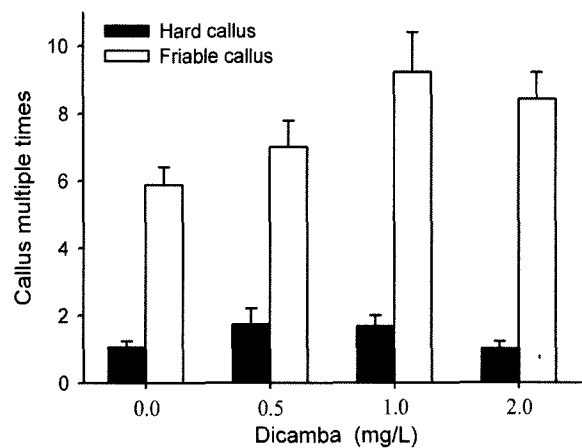


Figure 3. Growth comparison of hard and friable callus of *Lilium longiflorum* 'Nelle White' on medium with dicamba and 90 g/L sucrose after 6 weeks in culture.

도 보리의 배양에서 동일한 결과를 보고하였다. Kumer 등 (2002)은 글라디올러스의 체세포배 유도 실험에서 고농도의 sucrose (174 mM 이상)는 체세포배를 유도하지만, 저농도의 sucrose (116 mM 이하)는 신초를 분화시킨다고 하였으며, 고농도의 sucrose에서 생육한 배발생 캘러스를 저농도의 sucrose가 첨가된 배지에서 배양하면 신초가 유도된다고 하였다. 본 실험에서 FEC의 증식에 미치는 sucrose 및 dicamba의 농도를 조사한 결과, sucrose 농도에 따라서는 증식율에 차이가 없었지만 1.0 mg/L dicamba가 첨가된 배지에서 FEC의 증식이 양호하였다. 또한 배지의 sucrose 농도가 낮으면 증식된 FEC가 다즙한 현상을 보였다.

Friable embryogenic callus (FEC)에서 소자구 분화

FEC에서 소자구를 분화시키기 위하여 FEC를 0.1 mg/L BA와 1.0 mg/L NAA가 첨가된 MS 배지에 MS 염류농도와 30 g/L sucrose 및 30 g/L maltose가 첨가된 배지에서 배양하였다. 배양 7주 후 MS 기본배지를 포함한 모든 처리구에서 많은 소자구가 분화 되었으며, 그중 1/2 MS 염류, 0.1 mg/L BA, 1.0 mg/L NAA, 30 g/L maltose가 첨가된 배지에서 370개/g 캘러스로 가장 많은 소자구가 분화 되었다 (Figure 4). 그러나 MS 1x배지와 sucrose가 첨가된 처리구에서는 분화된 소자구가 모두 투명화되었으며, 1/2 MS 배지가 첨가된 배지에서도 많은 개체가 투명화되었다. Sucrose보다 maltose가 FEC에서 식물체 재분화에 효과적인 것으로 보고되고 있다. Ainsley와 Aryan (1998)은 triticale의 미성숙 배에서 캘러스를 유도하여 재분화하는 과정에서 sucrose보다 maltose가 식물체 재분화에 더 효과적이라 하였으며, Mendoza와 Kaepler (2002)도 밀의 배양에서 동일한 결과를 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 투명화가 많이 발생하였는데 이것은 소자구 분화 배지에 BA와 NAA가 첨가되

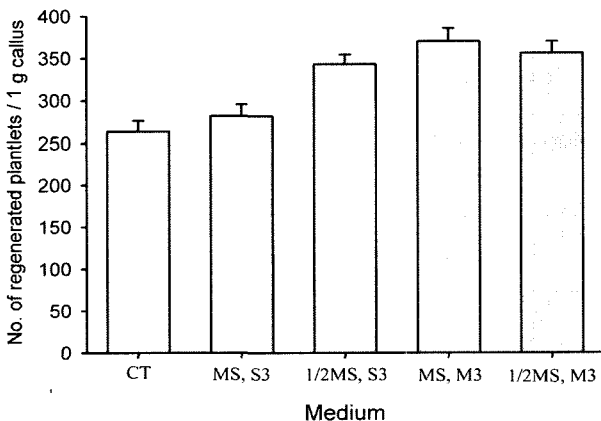


Figure 4. Bulblet differentiation from friable embryogenic callus of *Lilium longiflorum* 'Nelle White' after 7 weeks in culture (CT : control, MS, S3 : MS and sucrose 3% 1/2MS, S3 : 1/2MS and sucrose 3%, MS, M3 : MS and maltose 3%, 1/2MS and maltose 3%)

었고, FEC가 2.0 mg/L dicamba에서 배양된 것을 이식하였기 때문에 FEC에 dicamba의 잔존효과가 있어 나타나는 것으로 생각되었다.

MS 기본배지에서도 소자구의 분화가 효과적으로 이루어져 활성탄이 FEC에서 소자구의 분화에 미치는 영향을 조사하였다 (Figure 5). 활성탄의 농도가 증가 할수록 소자구 분화가 촉진되었으며, 1.0% 활성탄이 첨가된 배지에서 소자구가 405개/1 g 캘러스로 매우 많았다. 또한 재생된 소자구의 투명화도 전혀 발견되지 않았다 (Figure 6D). 활성

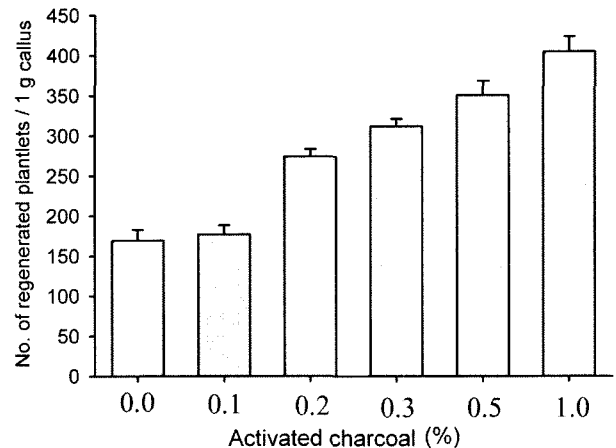


Figure 5. Bulblet differentiation from friable embryogenic callus of *Lilium longiflorum* 'Nelle White' on the medium with activated after 7 weeks in culture.

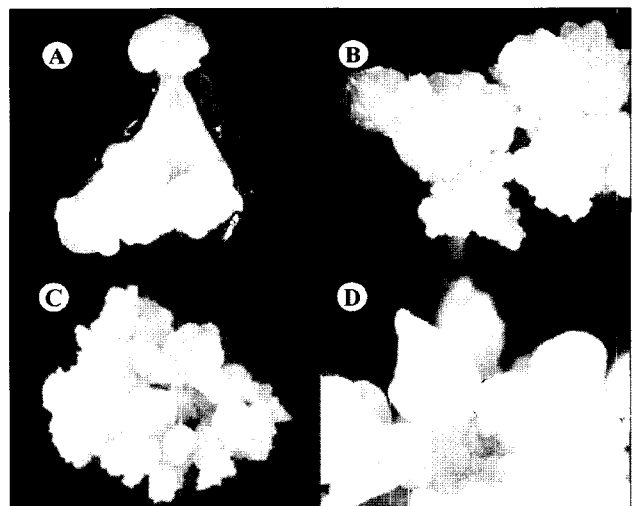


Figure 6. Bulblet formation via friable embryogenic callus in *Lilium longiflorum* 'Nelle White'. A : hard and regular callus induction from bulb scales on medium containing 2.0 mg/L dicamba and 60 g/L sucrose. B : the formation of friable embryogenic callus from formed and regular callus on medium with 2.0 mg/L dicamba 90 g/L sucrose. C : friable embryogenic callus proliferated on the medium containing 2.0 mg/L dicamba and 90 g/L sucrose. D : bulblets formed from friable embryogenic callus on medium containing 1% activated charcoal and 30 g/L sucrose.

탄은 많은 식물체의 배양에 사용되고 있으며, 생장억제물질이나 생장조절제, 유기물 등을 흡수하며 활성탄에 존재하거나 흡수된 생장촉진 물질을 배출하여 식물체의 생육을 촉진시킨다 (Pan and van Staden 1998). Bahieldin 등 (2000)은 밀의 배양에서 캘러스에서 신초의 재생은 dicamba 농도가 0.1~0.5 mg/L보다는 0.02 mg/L에서 양호하였다고 발표하여 캘러스에서 신초를 재생하기 위하여는 오옥신이 없는 배지가 효과적이라는 것을 나타내고 있다. 본 실험에서는 0.5~1.0% 활성탄이 첨가된 배지에서 소자구수가 매우 많았는데 이것은 활성탄이 캘러스에서 잔존 dicamba를 흡수하여 나타나는 결과라 생각되었다.

적 요

Lilium longiflorum 'Nellie White'에서 부서지기 쉬운 배발생 캘러스 (FEC)를 유도하여 FEC를 통한 소자구 재분화 체계를 확립하고자 실시하였다. FEC를 통한 나리 소자구 분화는 2.0 mg/L dicamba가 첨가된 MS 기본배지에 나리 인편을 배양하여 단단한 캘러스를 유도하고, 유도된 단단한 캘러스를 동일배지에서 3번 이상 계대배양하여 단단한 일 반 캘러스를 증식하였다. 증식된 단단한 캘러스는 1~2 mm 정도의 크기로 절단하여 2.0 mg/L dicamba와 90 g/L sucrose가 첨가된 MS배지에서 배양하여 FEC를 유도하였다. 2개월 간격으로 계대배양하면서 FEC를 유도하였으며, FEC 유도율은 단단한 캘러스를 동일 배지에 계대배양 하였을 때 증가하였다. 유도된 FEC는 1.0~2.0 mg/L dicamba와 90 g/L sucrose가 첨가된 MS배지에서 5배 이상의 증식율을 보였다. 증식된 FEC에서 소자구 분화는 0.1 mg/L BA, 1.0 g/L NAA, 30 g/L maltose가 첨가된 1/2 MS 배지에서 양호하였다. 그러나 많은 재분화된 소자구가 투명화 되었다. 건전한 소자구의 재분화는 30 g/L sucrose와 0.5~1.0% 활성탄이 첨가된 MS 배지가 가장 효과적이었다.

인용문헌

- Ainsley PJ, Aryan AP (1998) Efficient plant regeneration system for immature embryos of triticale (x *Triticosecale* Wittmack). *Plant Growth Regul* 24: 23-30
- Akula C, Akula A, Henry R (1999) Improved regeneration efficiency from mature embryos of barley cultivars. *Biologia Plantarum* 42: 505-513
- Aly MAM, Rathinasabapathi B, Bhalsod S (2002) Somatic embryogenesis in members of the *Plumbaginaceae* ornamental statice *Limonium* and sea thrift *Armeria maritima*. *HortSci* 37: 1122-1123
- Bahieldin A, Dyer WE, Qu R (2000) Concentration effects of dicamba on shoot regeneration in wheat. *Plant Breed* 119: 437-439
- Castillo AM, Egana B, Snaz JM, Cistue L (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain. *Plant Cell Rep* 17: 902-906
- Grando MF, Franklin CI, Shatter RG (2002) Optimizing embryogenic callus production and plant regeneration from 'Tifton 9' bahiagrass seed explants for genetic manipulation. *Plant Cell Org Cult* 71: 213-222
- Haensch KT (1996) Plant regeneration through somatic embryogenesis in different genotypes of *Lilium* hybrids. *Gartenbauwissenschaft* 61: 214-218
- Jach M, Przywara L (2000) Somatic embryogenesis and organogenesis induced in immature zygotic embryos of selected sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes. *Acta Biologica Carcoviensia Series Botanica* 42: 83-86
- Kamo K, Chen J, Lawson R (1990) The establishment of cell suspension cultures of *Gladiolus* that regenerate plants. *In Vitro Cell Dev Biol* 26: 425-430
- Kumer A, Palni LMS, Sood A, Sharma M, Palni UT, Gupta AK (2002) Heat-shock induced somatic embryogenesis in callus cultures of gladiolus in the presence of high sucrose. *J Hort Sci & Biotech* 77: 73-78
- Laublin G, Saini HS, Cappadocia M (1991) *In vitro* plant regeneration via somatic embryogenesis from root culture of some rhizomatous irises. *Plant Cell Tiss Org Cult* 27: 15-21
- Marcinska I, Wedzony M (2002) Effect of physical, physiological and genetic factors on callus induction, differentiation and regeneration of winter triticale(x *Triticosecale* Wittm.). *Cereal Res Communi* 30: 63-68
- Mendoza MG, Kaeppler HF (2002) Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). *In Vitro Cell Dev Bio* 38: 39-45
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Nhut DT, Le BV, Minh NT, Silvia JTD, Fukai S, Yanaka M, Thanh Van KT (2002) Somatic embryogenesis through pseudo-bulblet transverse thin cell layer of *Lilium longiflorum*. *Plant Growth Regul* 37: 193-198
- Pan MJ, van Staden J (1998) The use of charcoal in in vitro culture - A review. *Plant Growth Regul* 26: 155-163
- Raemakers CJJM, Sofiari E, Jacobsen E, Visser RGF (1997) Regeneration and transformation of cassava. *Euphytica* 96: 153-161
- Smith RH, Hood EE (1995) *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. *Crop Sci* 35: 301-309
- Smith DL, Krikorian AD (1991) Growth and maintenance of an embryogenesis cell culture of daylily (*Heemerocallis*) on hormone free medium. *Ann Bot* 67: 443-449
- Taylor NJ, Edwards M, Kiernan RJ, Davey CDM, Blakesley D, Henshaw GG (1996) Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture system in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nat Biotechnol* 14:

726-730

- Tribulato A, Remotti PC, Loffler HJM, van Tuyl JM (1997) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Lilium longiflorum* Thunb. *Plant Cell Rep* 17: 113-118
- Trifonova A, Madsen S, Olesen A (2001) *Agrobacterium*-mediated transgene delivery and integration into barley under a range of *in vitro* culture conditions. *Plant Sci* 161: 871-880
- van den Bulk RW, De Vries van-Hulten HPJ, Custers JBM, Dons JJM (1995) Induction of embryogenesis in isolated microspores of tulip. *Plant Sci* 104: 101-111
- van Schaik CE, Posthuma A, De Jeu MJ, Jacobsen E (1996) Plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on immature embryos of *Alstroemeria* spp. L. *Plant Cell Rep* 15: 377-380
- Wang L, Huang B, He M, Hao S (1990) Somatic embryogenesis and its hormonal regulation in tissue cultures of *Freesia refracta*. *Ann Bot* 65: 271-276

(접수일자 2005년 4월 1일, 수리일자 2005년 5월 20일)