

형질전환 효율성 향상을 위한 국화 최적 품종 선발 및 배지·배양조건설정

강찬호 · 윤성중 · 한범수 · 한수곤 · 권성환 · 송영주 · 장미향

Selection of the fittest varieties of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) and set of culture condition for efficient transformation

Chan Ho Kang · Seung Jung Yun · Bum So Han · So Gon Han · Sung Hwan Kown · Young Ju Song · Mi Hyang Jang

Received: 12 October 2009 / Accepted: 18 November 2009
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract To set efficient transformation system in chrysanthemum, thirty-four chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) varieties were collected and cultured for shoot regeneration. Five varieties, ‘Shuho-no-chikara’, ‘Zinba’, ‘Baekma’, ‘Pink pride’ and ‘Keumsu’ of them were selected, because they had a high shoot regeneration efficiency. MS medium containing 1.0 mg/L NAA and BA respectively was very adequate for shoot regeneration in those varieties. MS medium with 3.0 mg/L NAA and 1.0 mg/L kinetin in ‘Shuho-no-chikara’ and the medium with 0.5 mg/L NAA and 3.0 mg/L BA in ‘Keumsu’ were also suitable for shoot regeneration. The most efficient callus induction and shoot regeneration were obtained on MS medium. Shoot regeneration was enhanced more than 8% on MS medium with 0.3% phytagel and 10–15 mg/L putrescine. The best cultural material

for shoot regeneration was stem. When stem was used as a culture material, shoot regeneration rate was increased more than 26% and the days to shoot regeneration was shortened about 14 days.

서론

국화 (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura)는 국내에서 절화류 중 재배면적 및 생산액이 1~2위를 기록하고 있는 중요 화훼작물이며, 세계적으로도 소비량이 2위인 절화작물이다(재배면적 : ('00) 732→('06) 805 ha; 생산액 : ('00) 562→('06) 915 억원). 따라서 우리재배환경에 적합하면서 수출대상국의 기호를 질적으로 충족시킬 수 있는 고급 신품종을 적극적으로 개발하거나, 새로운 재배방식의 개발이나 재배면적의 규모화에 의한 생산비 절감방안을 도출 하는 등 내수증가와 수출경쟁력을 강화시킬 수 있는 새로운 노력이 필요하다. 우리나라에서는 농촌진흥청을 중심으로 많은 수의 국화 품종이 개발되어오거나 재배농가의 선호도를 완전히 충족시키지 못해 시장에서 주요하게 거래되고 있는 품종의 거의 대부분이 외국에서 육종된 품종들이 차지하고 있다. 또한 거의 대부분의 육종방식이 교배를 바탕으로 하는 전통육종에 의존하고 있어 유전적 다양성의 한계를 쉽게 넘어서지 못하고 있는 실정이다. 이러한 이유들로 해서 최근에 획기적인 신품종 개발을 위한 효율적이고 다양한 시도가 이루어지고 있는데 특히 분자육종은 기존의 유익한 형질들을 유지하면서도 단일 유전자의 도입을 통하여 원하는 특성을 특정해서 단시간 내에 빠르게 개량 할 수 있는 장점을

C.-H. Kang (✉) · S.-G. Han · S.-H. Kown · Y.-J. Song
전라북도농업기술원
(Jellabukdo Agricultural Research & Extension Service, Iksan
570-703, Korea)
e-mail: chkang@jbarens.go.kr

S.-J. Yun
전북대학교
(Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea)

B.-S. Han
국립농업과학원
(National Academy of Agricultural Science, Suwon 441-707,
Korea)

M.-H. Jang
전라남도농업기술원
(Jellanamdo Agricultural Research & Extension Service, Naju
520-715, Korea)

로 최근 다양한 유전자를 이용한 여러 가지 시도들이 이루어지고 있는 분야이다. 과거 10여년 전까지는 국화의 형질전환이 *Agrobacterium*에 의한 형질전환 기술의 개발에 집중되어 왔으나, 최근에는 형태적 생리적 변화, 조기 개화, 무촉지성, 내병성, 내충성 등 도입된 유전자의 형질 발현에 초점을 맞추어 실질적인 형질개량을 목적으로 하는 시도들이 이루어지고 있다 (Han et al. 2007; Kubo et al. 2006; Mitiouchkina and Dolgov. 2000; Takatsu et al. 1999). 이렇게 분자육종 기술의 중요성이 점차 강조되면서 조직 배양에 대한 기술적 의존도도 점차 증가하고 있다. 원래 형질전환은 모든 체세포가 새로운 유전자가 도입된 상태로 변화하기 위해서 단세포에 유전자를 주입한 후 이 세포가 증식을 거쳐 개체로 진화하는 과정을 거치기 때문에, 형질전환 기술의 효율성을 높이기 위해서는 효율적

Table 1 The varieties of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) which bred from inside and outside of the country

NO	Type	Variety	Abbreviation
1		Shinma	SM
2		Backsun	BS
3	Standard	Baekkwang	BK
4		Subangryek	SBR
5		Backma	BM
6		Charming eye	CE
7		Peak	PK
8		Pleasure damore	PDM
9		Orangem emory	OM
10	Spray	Whitny pangpang	WPP
11		Pinkp angpang	PPP
12		Suny pangpang	SPP
13		Pink pride	PP
14		Yes morning	YM
15			Agison
16		Whiparam	WP
17		Borami	BR
18		Keumsu	KS
19		Moon light	ML
20		Dongjihyang	DH
21	Spray	Say rosa	SR
22		Kibaek	KB
23		Galchae	GC
24		Dalma	DM
25		Angae soguk	AS
26		Mujung	MJ
27		Golden harim	GH
28		Rose queen	RQ

인 조직배양기술이 선제적으로 확립되어야만 한다. 그러나 새로이 개발된 품종들의 유전적 다양성에 의해 조직 배양 반응이 서로 다르게 나타날 수 있어 유전형별 특성에 따른 형질전환 효율성을 극대화시키기 위해서는 조직 배양 및 형질전환 효율성이 강한 품종을 선발하여야 한다. 또한 같은 비용 및 노력을 투자한다면 조직배양의 효율성 특히 재분화율을 높이는 것이 형질전환의 효율성을 높일 수 있는 가장 효과적인 방법이 될 수 있다. 따라서 본 연구는 국화의 형질전환 효율 향상을 위한 조건을 구명하기 위하여 적정 품종을 선정하고 재분화율을 향상시키는 주요한 방법들인 식물체에 적당한 기본배지를 선정하거나 탄소공급원의 변화나 배지응고제의 선택 그리고 기본적으로 재분화에 효율성이 있다고 알려진 화학물질을 배지 내에 첨가시키는 방법에 대하여 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

형질전환을 위한 국화 적정 품종 선발

형질전환의 기초단계인 조직배양 단계에서 효율성 강화를 목적으로 배양기간 및 배양의 난이도와 높은 재분화율 특성을 가진 국화품종을 선발하기 위하여 원예작물 전문육종기관인 원예연구소와 예산국화시험장 그리고 화훼자원연구소로부터 국내의 육성 품종 28종을 수집하여 기내증식 하여 조직배양의 재료로 사용하였다. 수집된 품종 중 5종은 대국 (standard type) 이었고 나머지 23종은 소국 (spray type) 이었다 (Table 1).

배양 및 배지조건 설정

형질전환을 위하여 선발된 각 품종의 유전적 특성에 따른 배양 및 배지조건을 설정하기 위하여 배양부위 및 기본배지, 탄소원 및 농도, 배지응고제원 및 농도를 정하는 연구를 수행하였다. 조직배양을 위하여 생장조절제를 단용 또는 혼용으로 처리 하였는데 auxin 계열로 NAA, 2, 4-D, IAA가 사용되었고 cytokinin 계열로 BA, kinetin, 2ip, TDZ 등이 0.1~5.0 mg/L 농도로 첨가되었다. 적절한 배양 부위를 정하기 위하여 배양재료를 크게 잎, 줄기, 엽병으로 구분하여 배양하고 신초 분화율 및 분화기간을 관찰함으로써 배양의 효율성을 비교하였으며 MS, B5, White, SH, LS (Murashige and Skoog. 1962; Bhojwani et al. 1989; Linsmaier and Skoog. 1965) 등 5종을 공시하여 기본배지를 설정하고 탄소원으로는 sucrose와 fructose 그리고 lactose를 1.5%, 3%, 6%로 공시하여 캘러스형성율과 기관분화 정도를 조사하였다. 배지응고제 선발을 위하여 agar와 phy-

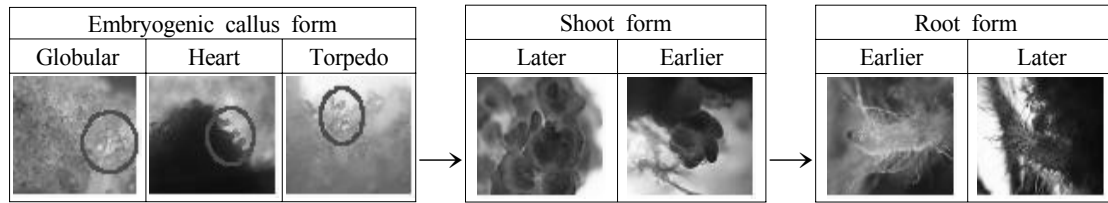


Fig. 1 The micro-proliferation steps of chrysanthemum ‘Baekma’ (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura)

tagel을 일정량씩 배지에 투입하였는데 agar는 0.8%, 1.0%, 1.2% 농도로 투입하였고 phytagel은 0.2%, 0.3%, 0.4%를 첨가하였다.

식물체 재분화를 향상을 위한 polyamine과 AgNO₃ 처리

식물체 분화에 효과가 있다고 알려진 polyamine과 AgNO₃을 선발된 국화 5품종을 대상으로 조직배양 배지에 첨가하여 신초분화율과 신초수 형성 정도를 관찰하였다. Polyamine은 putrescine, spermidine, spermine 3종을 사용하였고 처리농도는 polyamine과 AgNO₃ 공히 5, 10, 15, 20, 25, 50 mg/L 이었다.

결과 및 고찰

형질전환 실험용 국화 적정 품종 선발

옥수수 (Hodges et al. 1986)와 두릅나무 (Moon et al. 2001)에서 보듯이 조직배양에서 사용되는 재료의 유전적 특성에 따라서 조직배양의 효율성이 결정되는 사례는 많이 있다. 따라서 대부분의 배양에서 1차적으로 수행하는 것이 가장 왕성하게 분열하는 유전자 균을 선발하는 것이다. 특히 국화는 현재 재배하는 품종 중 외국 육성 품종 점유 비율이 높지만 우수 형질의 국내 육성 품종들이 꾸준히 증가하고 있어 생명공학 분야에서도 그 시험재료를 국산 품종으로 대체해야 할 필요성이 강하게 제기되고 있다. 이러한 필요성을 감안하여 국내 육성 품종을 위주로 하고 국내 시장 점유율이 높은 외국산 품종을 대비로 하여 28품종의 국화 품종을 수집하여 (Table 1) 기내화 과정을 거친 후 이를 재료로 하여 조직배양을 시행하고 성장조절제 처리에 따른 조직배양의 반응성을 조사하였다. 각 수집된 품종들을 성장조절제를 단용처리하여 각 품종별 반응성을 조사한 결과, 품종별로 각자 왕성하게 반응하는 성장조절제가 구분되었는데 수방력, 백선, 금수, 에스모닝, 백마, 오렌지메모리, 일월, 차밍아이, 씨니팡팡, 등 9종은 NAA에 활발하게 반응하였으며 신마, 백광 등 2품종은 BA에 그리고 포드, 플레저다모르, 핑크프라이드, 핑크팡팡 등 4품종은 kinetin 반응형으로 구분되었다 (Table 2). 나머지 14품종은 특별하게 뛰어난 분열효과를

나타내는 성장조절제가 없이 70% 이하의 캘러스형성을 보여 대체적으로 낮은 분열반응 특성을 나타내었다 (Data was not shown). 이상 성장조절제 단용처리에 대하여 우수한 분열효과를 보인 13품종을 대상으로 auxin과 cytokinin 혼용처리 효과를 분석하였다

품종별 혼용처리에 따른 캘러스 발생률을 분석해보면 포드 품종에서와 같이 성장조절제 혼용 처리가 단용처리에 비하여 오히려 캘러스 생성율이 떨어지는 경향을 보이는 품종도 있었지만 대체적으로 혼용처리 하는 경우 캘러스 발생률이 8.6~24.8% 까지 상승하였다. 혼용처리 중 가장 양호한 상승효과를 보인 조합은 NAA와 BA 이었는데 NAA 0.1~3.0 mg/L 와 BA 0.5~3.0 mg/L를 혼용처리 하는 것이 양호하였으며 품종 간 약간의 차이는 있었지만 NAA는 낮은 농도인 1.0 mg/L 처리에서 BA 1.0 mg/L를 혼용처리 하는 것이 평균적으로 높은 캘러스 형성과 신초 발생률 및 발생수를 나타내었다 (Table 2). 이러한 성장조절제 혼용처리 조합은 Liu 등 (1986) 과 Choi 등 (1986)이 보고한 바와 같이 배양 중 체세포배의 발생을 유도하기 위해서는 2, 4-D를 고농도에서 저농도로 낮추거나 아주 제거한 배지에서 효율적이라는 기존의 보고서와 일치한 결과를 나타내었다 (Carla et al. 1996; Choi et al. 1986; Vogelegang et al. 1992; Levi et al. 1991). 공시된 품종들 간의 분열능력을 상호 비교해본 결과, 대국형인 수방력, 백마, 신마, 백선 등 4품종과 핑크프라이드, 금수 등 소국형 2품종이 성장조절제 조합에 따라 100%의 캘러스 형성을 보이면서 큰 반응활력을 가진 품종으로 평가되어 조직배양 및 형질전환에 적합한 품종으로 선발되었다. 또한 품종 간 신초발생정도 및 발생수를 비교한 것이 그림 2이다. 그림 3에 의하면 캘러스로부터 신초가 100% 발생된 품종은 역시 반응활력이 뛰어난 5개 품종이었으며 생성된 개체수도 배양절편 하나 당 최대 4.8개 까지 발생하여 높은 신초생성 능력을 가지고 있음이 확인되었다.

배지 및 배양조건에 따른 신초 재분화

성장조절제 처리에 따라 선발된 활력이 우수한 5개 품종을 대상으로 최상의 기관 분화율을 보일 수 있는 배양 및 배지조건을 설정하였다.

Table 2 The callus formation rate(%) of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) varieties according to the growth regulator complex combinations after 8 weeks in culture

Growth regulator (mg/L)		Varieties														
		SBR	BS	BK	BM	SM	YM	KS	OM	IW	CE	SPP	FW	PP	PDM	PPP
NAA 0.1	BA0.1	76.4	64.8	49.5	62.4	84.2	40.5	48.6	74.2	25.8	50.4	64.8	-	76.4	64.2	76.4
	BA0.5	91.2	72.6	62.6	68.2	90.4	42.8	68.2	78.6	31.6	47.6	58.6	12.5	89.2	76.4	78.2
	BA1.0	100	68.2	71.2	72.6	93.2	62.6	72.4	86.2	29.8	51.2	70.4	16.4	90.8	80.6	81.2
	BA3.0	100	80.4	84.6	84.3	92.8	50.8	60.6	79.5	40.6	28.6	58.6	-	92.6	82.8	70.9
	BA5.0	86.4	72.8	80.6	58.6	76.5	49.2	45.8	84.3	35.6	40.8	40.8	-	78.6	74.8	54.6
NAA 0.5	BA0.1	92.6	90.6	72.8	86.5	92.6	75.4	92.6	90.4	42.1	42.6	79.6	-	97.6	81.6	78.6
	BA0.5	100	100	78.6	100	100	85.7	100	92.8	48.6	50.6	81.2	28.6	97.6	89.2	79.2
	BA1.0	100	100	92.6	100	100	84.8	96.4	90.4	54.2	60.4	82.4	46.2	100	90.6	84.6
	BA3.0	100	89.6	88.2	100	100	76.4	95.8	96.5	62.8	78.6	80.5	34.5	100	91.4	82.6
	BA5.0	84.8	78.2	80.6	92.8	94.5	77.2	90.4	91.8	46.5	76.5	64.8	-	92.4	78.6	68.4
NAA 1.0	BA0.1	100	94.2	68.2	90.6	100	80.6	100	76.2	64.5	60.8	78.0	-	100	85.8	72.6
	BA0.5	100	100	89.4	100	100	87.2	100	100	70.6	72.8	81.6	42.8	100	92.4	60.4
	BA1.0	100	100	90.6	100	100	88.4	100	100	74.6	74.2	84.6	56.8	100	91.8	58.2
	BA3.0	100	100	84.8	100	100	80.5	94.8	100	72.0	62.0	68.8	50.5	98.2	86.4	49.6
	BA5.0	78.6	62.5	76.9	100	94.8	60.5	90.6	86.0	59.8	68.2	71.6	40.4	88.7	72.8	51.6
NAA 3.0	BA0.1	100	80.4	80.8	100	100	82.0	100	91.2	64.0	40.8	62.5	-	100	78.4	60.4
	BA0.5	100	100	92.6	100	100	90	100	92.8	68.2	78.2	60.8	26.5	100	88.6	76.5
	BA1.0	100	100	94.6	92.6	100	72.6	96.2	100	72.5	81.6	76.4	40.8	100	82.9	68.2
	BA3.0	100	100	92.8	94.3	100	72.0	90.8	94.6	70.6	84.2	80.9	42.9	100	76.5	55.5
	BA5.0	86.2	62.8	90.6	80.6	90.0	36.5	78.6	82.4	49.5	80.0	70.6	28.6	90.6	42.8	42.8
NAA 5.0	BA0.1	80.4	79.2	84.6	90.8	82.6	74.3	72.4	76.2	25.0	62.6	50.8	-	87.2	60.0	20.8
	BA0.5	72.6	64.8	90.1	82.6	84.2	66.2	82.9	64.8	32.6	48.6	61.6	-	67.8	48.6	19.6
	BA1.0	74.8	52.9	78.6	68.4	70.6	70.6	80.6	66.2	40.8	52.6	70.8	-	72.1	62.4	-
	BA3.0	80.4	58.4	64.8	70.6	52.8	54.0	72.9	46.8	25.8	48.2	72.4	-	80.4	48.0	-
	BA5.0	61.4	29.6	56.2	52.5	64.2	28.6	50.6	26.0	12.9	26.4	60.2	-	66.8	29.6	-
NAA 1.0	Kin1.0	100	100	78.6	92.4	100	85.4	89.6	78.6	65.4	72.8	70.4	-	100	82.8	56.5
	2iP1.0	76.0	45.6	70.4	68.2	82.9	26.5	72.6	60.4	20.5	45.6	26.0	48.6	86.8	60.4	15.6
	TDZ1.0	89.2	48.2	82.6	86.8	97.6	32.6	78.4	72.8	32.6	54.8	35.8	-	100	80.9	72.8
NAA 3.0	Kin1.0	100	100	84.2	90.6	100	72.6	82.6	90.4	68.2	86.4	75.2	26.5	100	86.2	60.8
	2iP1.0	82.8	49.6	68.2	52.8	84.2	30.0	50.8	70.6	16.4	74.6	70.2	50.4	82.6	48.6	21.7
	TDZ1.0	91.6	52.6	76.3	84.7	90.6	24.5	76.5	64.0	26.8	42.9	54.6	-	92.1	81.6	78.6

* SBR:subangryek, BS:Baeksun, BK:Baekkwang, BM:Baekma, SM:Shinma, YM :Ywsmorning, KS:Kemsu, OM:Orangememory, IW:Ilwal, CE:Charmingeye, SPP:Sunnypangpang, FW:Forward, PP:Pinkpride, PDM:Pleasuredamore, PPP:Pinkpangpang

적절 배양부위 설정

배양조건을 설정하기 위하여 우선 적절한 배양부위를 설정하는 시험을 실시하였다. 배양부위는 잎과 엽병, 줄기로 3분하였으며 배양 8주후에 캘러스 형성과 신초형성을 위주로 배양반응을 조사하였다. 배양결과 기관별 반응양상이 상이하었는데 잎을 배양재료로 하는 경우에는 캘러스가 100% 발생하여 embryogenic 캘러스로의 전환 그리고 신초가 발생하는 형태로 배양반응이 진행되었으

나, 엽병과 줄기에서는 주로 캘러스 형성과정을 거치지 않고 배양체로부터 신초가 직접 발생하는 directing shooting 이 주로 일어나 신초발생시 소요되는 기간이 단축되고 형성율이 상대적으로 높게 나타났으며 발생하는 신초수도 상대적으로 많았다.

국화 잎 배양에서는 배양체 모두에서 캘러스가 발생하였으나 이 중 신초형성이 가능한 비율이 72% 정도였고, 배양체당 2.6개의 신초가 46일을 경과하여 발생하였다. 반면 엽병과 줄기를 배양할 경우에는 캘러스 발생 과정

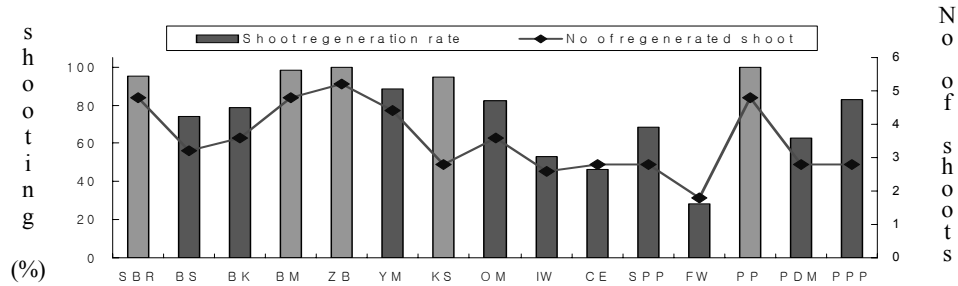


Fig. 2 The shoot regeneration rate(%) and formed number of plantlets of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) varieties according to the growth regulator complex combinations after 8 weeks in culture

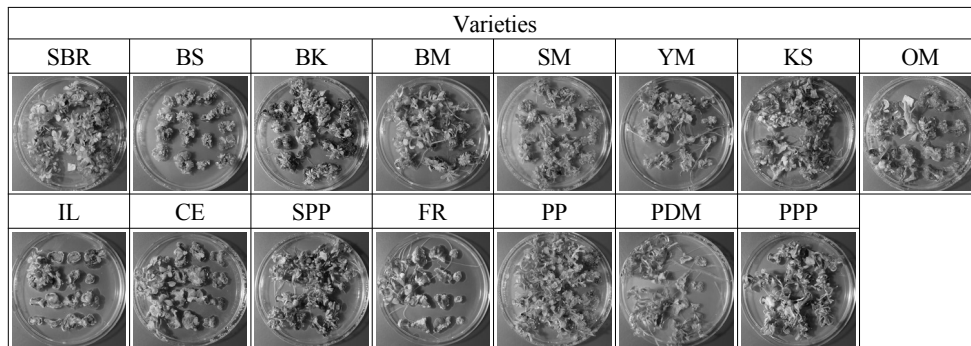


Fig. 3 The aspect of tissue culture of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) varieties with 1.0 mg/L NAA and 1.0 mg/L BA

Table 3 The cultural response according to cultural material of chrysanthemum ‘Shuho-no-chikara’, ‘Zinba’, ‘Baekma’, ‘Pink pride’ and ‘Keumsu’ (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) after 8 weeks in culture

	C.F.R (%)	Fresh wt. (mg/ea)	S.F.R (%)	No of formed shoot (ea/Disc)	Days needed for shoot formation
Leaf	100	286	72.0	2.6	46
Petiole	52	480	86.4	1.8	32
Stem	58	586	98.0	4.3	32

※ C.F.R. means callus formation rate and S.F.R. means shoot formation rate
 ※ MS medium was containing 3% sucrose, 1.0 mg/L NAA, 1.0 mg/L BA and Agar 1.0%

을 거치지 않고 직접적으로 신초가 발생하는 directing shooting이 주요한 분화 방식이었고 신초가 발생하는데 필요한 소요기간이 32일로 잎 배양에 비해 14일 짧았다. 그러나 엽병 보다는 줄기를 배양하는 경우가 훨씬 분열반응이 활발하게 전개되었는데 배양 8주 경과 후 줄기부

위의 배양 개체 당 생체중이 586 mg/개로 타 부위에 비해 분열반응이 크게 일어났으며, 신초 형성 과정에서도 줄기배양의 신초 형성율이 98%로 잎배양의 72%, 엽병 배양의 86.4%에 비하여 상대적으로 크고 신초 형성수도 배양체당 4.3개로 잎과 엽병배양에 비하여 월등히 많았다 (Table 3, Fig. 4).

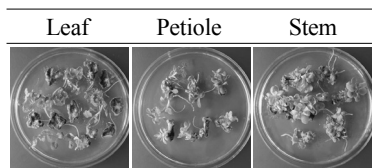


Fig. 4 The cultural response according to cultural material of chrysanthemum ‘Shuho-no-chikara’, ‘Zinba’, ‘Baekma’, ‘Pink pride’ and ‘Keumsu’ (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) after 8 weeks in culture

배지종류에 따른 국화 품종별 신초 형성률

국화의 최적 분화 및 기내생장에 적합한 배지를 선발하고자 MS, B5, white, LS, SH 배지를 배지표에 따라 조합하여 사용하였다. 치상부위는 7-8매 유엽 전개시의 줄기로 잎을 제거한 후 0.5 cm 길이로 잘라 사용하였으며 각 배지에 NAA 1.0 mg/L과 BA 1.0 mg/L의 성장조절제를 첨

Table 4 The cultural response of chrysanthemum spp. (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) according to cultural media after 8 weeks in culture

Cultural Media	SBR		BM		SM		KS		PP	
	C.F.R (%)	S.F.R (%)	C.F.R (%)	S.F.R (%)	C.F.R (%)	S.F.R (%)	C.F.R (%)	S.F.R (%)	C.F.R (%)	S.F.R (%)
MS	100	96.4	98.6	80.6	100	90.2	100	92.8	100	94.6
B5	40.6	11.4	32.2	-	42.6	12.6	41.2	10.5	82.0	32.6
White	60.6	28.6	48.2	12.8	62.4	26.4	60.2	25.0	86.9	40.6
L&S	96.2	90.6	72.8	56.3	86.8	62.8	92.8	60.4	100	91.2
S&H	90.8	88.8	78.6	64.2	90.8	70.4	93.6	62.9	100	92.8

※ C.F.R. means callus formation rate and S.F.R. means shoot formation rate

※ MS medium was containing 3% sucrose, 1.0 mg/L NAA, 1.0 mg/L BA and Agar 1.0%

Table 5 The callus formation rate(%) and shoot formation rate(%) of chrysanthemum spp. (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) according to coagulating agents after 8 weeks in culture

Concentration (%)	SBR		BM		SM		KS		PP		
	C.F.R (%)	S.F.R (%)	C.F.R (%)	S.F.R (%)	C.F.R (%)	S.F.R (%)	C.F.R (%)	S.F.R (%)	C.F.R (%)	S.F.R (%)	
Agar	0.8	90.8	82.9	86.0	62.0	90.6	72.6	90.8	76.4	82.0	64.2
	1.0	100	96.4	98.6	80.6	100	90.2	100	92.8	100	94.6
	1.2	92.8	90.2	98.2	82.8	100	80.4	86.4	93.2	74.8	78.6
Phytigel	0.2	100	95.8	96.0	80.4	100	88.6	100	90.6	100	95.4
	0.3	100	98.2	100	92.6	100	94.8	100	96.2	100	98.2
	0.4	92.0	93.0	100	93.2	100	92.6	92.8	92.8	100	90.0

※ C.F.R. means callus formation rate and S.F.R. means shoot formation rate

※ MS medium was containing 3% sucrose, 1.0 mg/L NAA, 1.0 mg/L BA and Agar 1.0%

가하여 캘러스 및 체세포배와 신초분화를 유도하였다. B5 배지에서 국화 줄기를 배양할 경우 전체적으로 분화하는 세포가 적어 캘러스 발생률이 떨어졌으며 발생한 캘러스도 배발생캘러스 비율이 낮게 형성되었다. 이는 어성초의 절간배양에서도 관찰할 수 있었던 바와 같이 B5 배지에서 형성되고 생장한 캘러스는 치밀하지 못하고 회백색의 non-embryogenic 캘러스의 비율이 높게 나타나 배양배지로는 부적합하였다는 보고와 일치하였다 (Ryu et al. 1996). 조직배양에서의 배의 형성은 배지내의 질소형태에 의해 큰 영향을 받는데 (Sung et al. 1994, Wetherel et al. 1976)) 당근으로 한 실험에서 KNO_3 단독 보다는 NH_4^+ 이온을 첨가함으로써 배발생을 증가시킬 수 있다고 보고한 내용으로 볼 때 B5 배지는 환원형 질소의 양이 적어서 신초 발생 양상이 저조한 것으로 판단되었다. 또한 White 배지도 캘러스 분화 및 신초 발생이 저조하였는데 이는 White 배지가 뿌리배양을 위한 배지로는 사용될 수 있으나 캘러스 형성 및 생장을 목적으로 사용할 때에는 무기성분의 함유량이 부족하다는 보고와 유사하였다 (Bhojwani et al. 1989). 이에 비해 MS와 LS 그리고 SH 배지는 상대적으로 높은 분열반응을 이끌어 내었는데 품종별로 약간의 차이는 있었으나 3종류의 배지 모두에서 대체적으로 90% 이상의 캘러스 형성률을 나타내었다. 그러나 신초형

성 반응에서는 3종류 배지 간에 차이를 나타내었는데 MS 배지에서 80.6%의 신초형성 반응을 보인 백마를 제외하고 수방력의 96.4%를 포함하여 신초 형성율을 90% 이상으로 유지시킨 반면 LS와 SH 배지는 수방력과 핑크프라이드 품종을 제외하고는 신초형성율이 60% 대로 하락하여 상대적으로 기관분화 유도 능력이 저하되는 것을 알 수 있었다 (Table 4).

캘러스 생장에 있어서 배지내 수분 및 양분흡수와 관련이 있는 배지응고제의 영향을 조사한 결과는 표 5와 같다. Lee 등 (1996)이 agar와 phytigel의 농도가 증가할수록 캘러스의 수분 흡수가 어려워 스폰지형의 캘러스가 발달하고 (Moon et al. 1983) 물리적 변화에 따른 흡수능력의 감소가 식물체 분화능을 증대시킨다는 보고 (Liu et al. 1985)와 벼 약배양에서는 phytigel이 배발생캘러스의 발생을 촉진한다는 보고 (Lee et al. 1995; Van and Kitto. 1992)가 있었듯이 국화의 조직배양 시 사용되는 배지응고제에 있어서도 agar 보다는 phytigel 사용이 신초형성능 향상 효과를 보였는데 수방력, 신마, 금수, 핑크프라이드 품종의 경우 1.8~4.6% 정도로 약간의 상승효과를 보인 반면 백마 품종의 경우 10.4%로 상당히 큰 신초형성율 향상 효과를 나타내었다 (Table 5). 적정 사용농도도 품종간 약간의 차이를 나타내었는데 백마의 경우 phytigel

Table 6 The cultural response of chrysanthemum spp. (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) according to cultural media after 8 weeks in culture

Carbon source	SBR		BM		SM		KS		PP	
	C.F.R (%)	S.F.R (%)	C.F.R (%)	S.F.R (%)	C.F.R (%)	S.F.R (%)	C.F.R (%)	S.F.R (%)	C.F.R (%)	S.F.R (%)
Sucrose	100	96.4	98.6	80.6	100	90.2	100	92.8	100	94.6
Fructose	98.2	62.8	70.6	24.8	62.8	29.4	78.6	41.5	88.6	70.6
Lactose	62.4	16.4	27.6	11.8	28.6	20.2	42.8	32.6	48.2	18.4

※ The used chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) varieties were SBR: 'Shuho-no-chikara', BM: 'Baekma', SM: 'Zinba', KS: 'Keumsu' and PP: 'Pink pride'

※ MS medium was containing 3% sucrose, 1.0 mg/L NAA, 1.0 mg/L BA and Agar 1.0%

Table 7 Effect of sucrose concentrations on organogenesis from stem culture of chrysanthemum 'Shuho-no-chikara' (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) with 1.0 mg/L NAA and 1.0mg/L BA

Suc. con. (%)	Callus growth	After 6 weeks						After 12 weeks					
		Shoot			Root			Shoot			Root		
		Formati onRate (%)	NO./ Disc	Height (cm)	Formati onRate (%)	NO./ Disc	Lenigth (cm)	Formati onRate (%)	NO./ Disc	Height (cm)	Formati onRate (%)	NO./ Disc	Lenigth (cm)
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.5	++	38.4	2.1	2.8	26.4	6.8	4.8	48.6	3.6	4.2	42.8	7.0	5.2
3.0	+++	86.2	3.4	3.2	60.8	6.2	4.2	97.2	4.4	5.0	90.4	7.0	5.2
4.5	++	64.6	3.2	3.4	42.6	6.2	3.6	80.8	4.2	4.8	78.6	5.2	3.6
6.0	++	46.8	2.6	3.0	28.8	5.4	3.4	56.4	2.8	4.8	56.8	5.4	3.4

- : no response + : normal ++ : good +++ : very good

0.4%가 가장 우수한 효과를 보인 반면 다른 품종들은 모두 phytigel 0.3%에서 가장 효과적이었다.

국화 품종별 조직배양 시 탄소공급원에 따른 캘러스 유기 및 식물체 분화정도를 조사한 바는 표 6과 같다. 식물조직 배양 시 영양원과 탄소공급원으로 쓰이는 당은 5탄당과 6탄당 그리고 단당류와 이당류로 나누어지는데 배양되는 식물체에 따라 가장 잘 이용할 수 있는 당의 종류가 달라질 수 있다. 국화를 배양할 시에는 탄소원으로 sucrose를 사용할 경우가 가장 양호 하였는데 기타 탄소원을 보면 fructose와 lactose 순으로 사용효과를 보였으나 캘러스 성장정도가 약하고 신초분화 능력이 떨어져서 탄소원으로는 적당하지 못하였다.

표 7은 선발된 sucrose를 대상으로 배지 내 농도를 달리 하여 기관분화 양상과 기간경과에 따른 변화정도를 나타 내주는 결과이다. 결과를 보면 탄소원을 첨가하지 않은 배지에서는 캘러스의 발생 및 분화가 전혀 이루어지지 않아 배지조성에 탄소원이 반듯이 첨가되어야 함을 알 수 있었다. 배지 내 탄소원 첨가 농도별 기관분화 양상을 보면 배양 12주 경과 탄소원 3.0% 공급 처리에서 신초 생성율 97.2%와 발근율 90.4% 정도를 유지해 가장 우수한 결과를 나타내었는데 이는 배양 8주에 재분화율이 정점을 나타낸 후 (Data was not shown) 지속적으로 유지된 결과로서 배양기간은 8주 정도가 적합하였다. 당 처리 농도 별 신초 발생 양상을 비교해 보면 1.5% 처리에서는 전체 적으로 신초발생이 약하고 분화된 신초도 적은 것으로

보아 국화 배양시 요구되는 최소 당 공급량이 1.5% 보다 는 높은 것을 알 수 있었으며 4.5%와 6.0%의 고농도 처리 역시 신초생성율 하락과 분화수의 감소 현상을 발생시키는 결과를 나타내었는데 6.0% 처리 시 신초 분화율이 3.0% 처리에 비해 39.4% 하락하였고 분화되는 개체수도 절편 체당 0.8개 감소하였다 이러한 경향은 뿌리 발생 과정에서 조금 더 현저하게 확인되었는데 절편체당 형성되는 뿌리분화수가 5.4개로 3.0%의 7.0개에 비하여 1.6개나 감소하였고 생성된 뿌리의 길이도 3.4 cm로 1.8 cm 짧았다 (Table 7). 이러한 결과는 백합의 인편 조직배양에서도 확인 할 수 있었는데 (Takayama and Misawa. 1980) 형성된 캘러스의 과다한 당흡수로 인한 조직 내 당의 축적이 자가 영양체로의 전환을 지연시킬 뿐만 아니라 배지의 높은 삼투 농도가 세포의 휴면을 유도하기 때문인 것으로 알려져 있다 (Paek and Cho. 1994; Chung et al. 1995; Lee et al. 1996).

재분화를 향상을 위한 polyamine과 AgNO3 처리

일반적으로 체세포 발생에는 캘러스 형성을 거쳐서 일어나는 경우와 Sharp 등 (1980), Korner와 Nataraja (1965), Conger 등 (1983) 그리고 Williams와 Mashewaran (1986) 등이 보고한 것과 같이 식물 외식편에서 직접적으로 일어나는 경우가 있다. 국화 배양에서는 외식편에서 신초 발생이 유도되는 direction shooting과 캘러스를 통한 체세

포의 발생이 혼재하여 나타나고 있는 상황이다. 캘러스 형성을 유도시킨 후 이로부터 체세포 배를 발생시키는 경우는 2, 4-D와 같은 auxin을 첨가하여 배발생능 캘러스를 유도시킨 후 auxin을 제거해 주거나 auxin 억제물질을 배지 내에 첨가하여 배양하는 방법과 체세포성 배를 직접적으로 유도하는 유도물질을 첨가하여 배양하는 방법을 사용하여야만 체세포배가 형성된다. 그러나 식물의 외식편에서 직접적으로 체세포배가 형성되는 경우에는 Ammirato (1983)가 보고한 바와 같이 성장조정제는 단순히 배양재료가 원래 갖고 있던 배 형성능을 자극하기 위하여 사용할 뿐이라는 견해가 있다. 또한 Sakurai와 Masuda (1977)의 *Petroselinum hortens*의 배유조직과 *Ilex*의 미숙배 및 Smith와 Krikorian (1980)의 보고서에서의 당근의 접합자 배의 경우는 성장조정제를 첨가하지 아니할 때에도 체세포배의 발생이 일어난다고 하였다. 그러나 국화의 경우에는 성장조정제 무첨가시 캘러스 형성 및 기관 발생이 거의 이루어지지 않고 있으며 캘러스의 질적 변화에 의한 기관 형성이 일정 비율로 이루어지고 있어 캘러스의 체세포배 발생 정도를 높이고 신초발생 양상을 양호하게 이끌 수 있는 첨가제의 처리 효과를 검증할 필

요성이 제기되었다.

Polyamine 처리에 따른 기관형성을 변화

Polyamine이 식물에 있어서 세포분열 촉진과 발근촉진, 화분관 성장촉진, 배발생 유도 및 개화유도 등에 관여하고 있다는 보고는 많은 학자들에 의하여 밝혀진 바 있다 (Ferrer et al. 1984; Kim et al. 1993; Song et al. 1993). 따라서 국화 배양에 있어서 putrescine, spermidine, spermine 등 polyamine이 체세포성 배의 발생정도 및 식물체의 분화와 발생에 미치는 영향을 구명하고 체세포배의 발생을 극대화시킬 수 있는 적정 농도를 밝히고자 수행한 시험결과는 표 8과 같다. Triamine인 spermidine과 tetramine인 spermine, putrescine의 체세포배 발생 촉진효과는 선발된 4개 품종의 거의 대부분의 처리농도에서 발생하였는데 품종별로 약간의 차이는 있었으나 최대 8% 이상의 신초 생성 증가와 leaf disc 당 1.2개의 신초수 증가 효과를 나타내었다. 처리별로 효과를 살펴보면 품종별로 약간의 상이한 패턴을 나타내는 경우도 있었으나 가장 효율적인 처리농도는 3종류 polyamine 모두에서 10~15 mg/L 이었으며 체

Table 8 Effect of polyamines on organogenesis of chrysanthemum spp. (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) after 8 weeks in culture

Polyamine (mg/L)	Varieties												
	SM			BM			PP			KS			
	C.F.R. (%)	Shoot		C.F.R. (%)	Shoot		C.F.R. (%)	Shoot		C.F.R. (%)	Shoot		
	F.R. (%)	No. (EA/Disc)		F.R. (%)	No. (EA/Disc)		F.R. (%)	No. (EA/Disc)		F.R. (%)	No. (EA/Disc)		
Putrescine	0	100	92.8	4.0	100	90.6	3.6	100	91.4	3.4	100	86.2	2.8
	5	100	94.2	4.2	100	89.6	4.6	100	94.2	3.0	100	92.8	3.2
	10	100	98.6	4.6	100	96.8	4.6	100	92.8	3.8	100	90.6	3.6
	15	100	97.8	5.2	100	92.8	4.2	100	96.0	4.2	100	94.2	3.6
	20	100	96.4	5.0	100	94.2	4.6	100	92.0	4.2	100	92.8	3.6
	25	100	94.6	5.0	100	93.6	3.8	100	92.8	3.8	100	93.0	2.8
	50	100	94.0	4.6	100	84.0	4.0	100	90.8	3.8	100	93.0	3.0
Spermidine	5	100	94.6	4.2	100	92.8	4.0	100	92.6	3.6	100	92.0	3.0
	10	100	93.2	4.2	100	94.0	4.2	100	94.0	4.0	100	88.6	3.0
	15	100	93.2	3.8	100	94.0	4.6	100	94.8	4.0	100	90.8	3.4
	20	100	92.6	4.2	100	92.4	4.2	100	90.6	3.6	100	89.0	3.0
	25	100	93.0	4.2	100	90.8	4.6	100	89.2	3.4	100	89.0	3.0
	50	100	92.8	4.2	100	91.6	4.0	100	91.2	3.4	100	86.0	3.0
Spermine	5	100	86.4	4.0	100	92.8	3.8	100	84.8	3.8	100	84.8	3.0
	10	100	90.6	4.2	100	95.2	4.2	100	94.6	4.2	100	86.8	3.0
	15	100	88.2	4.2	100	94.6	4.4	100	90.8	4.2	100	86.8	3.0
	20	100	92.0	4.2	100	91.2	4.4	100	91.2	3.8	100	90.8	3.0
	25	100	93.2	4.2	100	91.2	4.6	100	89.6	3.4	100	82.6	3.0
	50	100	90.6	4.2	100	92.0	3.8	100	92.0	3.4	100	84.9	3.0

* The used chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) varieties were SM: 'Zinba', BM: 'Baekma', PP: 'Pink pride' and KS: 'Keumsu'

* MS medium was containing 3% sucrose, 1.0 mg/L NAA, 1.0 mg/L BA and Agar 1.0%

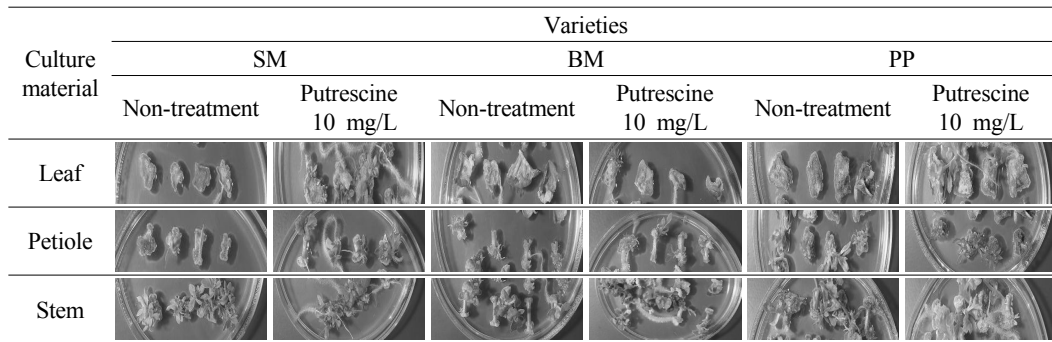


Fig. 5 Effect of polyamines on organogenesis of chrysanthemum spp. (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) after 8 weeks in culture
 ※ The used chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) varieties were SM: ‘Zinba’, BM: ‘Baekma’ and PP: ‘Pink pride’
 ※ MS medium was containing 3% sucrose, 1.0 mg/L NAA, 1.0 mg/L BA and Agar 1.0%

Table 9 Effect of AgNO₃ on organogenesis of chrysanthemum spp. (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) after 8 weeks in culture

AgNO ₃ (mg/L)	Varieties											
	SM			BM			PP			KS		
	C.F.R. (%)	Shoot		C.F.R. (%)	Shoot		C.F.R. (%)	Shoot		C.F.R. (%)	Shoot	
	F.R. (%)	No. (ea/Disc)		F.R. (%)	No. (ea/Disc)		F.R. (%)	No. (ea/Disc)		F.R. (%)	No. (ea/Disc)	
0	100	92.8	3.0	100	91.0	3.4	100	90.8	3.4	100	84.8	2.8
5	68.4	30.6	1.8	61.2	40.4	1.6	80.4	40.5	2.2	42.6	16.5	1.2
10	68.0	32.1	2.0	45.0	24.8	1.6	58.6	42.8	2.0	46.8	10.5	1.2
AgNO ₃ 15	49.6	19.6	1.4	42.2	31.2	1.4	60.2	15.6	1.8	26.4	8.0	1.0
20	51.6	16.4	1.4	26.8	15.8	1.4	40.6	12.6	1.2	32.6	-	-
25	40.6	20.8	1.2	16.5	16.4	1.2	28.8	-	-	28.6	-	-
50	32.6	11.6	1.2	18.2	-	-	12.6	-	-	-	-	-

※ The used chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) varieties were SM: ‘Zinba’, BM: ‘Baekma’, PP: ‘Pink pride’ and KS: ‘Keumsu’
 ※ MS medium was containing 3% sucrose, 1.0 mg/L NAA, 1.0 mg/L BA and Agar 1.0%

세포배의 발생과 신초 분화 및 생장 발달을 위한 가장 적절한 polyamine은 putrescine 이었다. 대체적으로 국화에서의 polyamine 처리는 높은 농도 보다는 낮은 농도 처리가 효율적이었는데 0~15의 낮은 농도처리에서의 4품종 평균 신초 발생율이 94.2%로 25~50 mg/L의 고농도 처리에 비하여 2.4% 높게 형성되는 것을 확인 할 수 있었다 (Table 8, Fig. 5).

AgNO₃ 처리에 따른 기관형성

AgNO₃ 처리에 따라 기관 형성이 증가한다는 보고 (Hakan. 2004; Brar et al. 1999; Hyde et al. 1996 ; Mohiuddin et al. 1997)는 여러 실험을 통하여 증명된 바 있으나 국화를 재료로 한 기관 분화 실험에서는 어떤 처리농도에서도 기관 분화 증가 효과가 발생하지 않았으며 오히려 처리 농도가 증가할수록 기관 분화율이 감소하는 현상이 발생하였다. 이는 배양에 있어서 AgNO₃ 의 역할과 주요한 연관

을 띄고 있는 것으로 보이는데 AgNO₃가 ethylene 억제제로서 일정한 역할을 수행하고 있는 것에 반하여 국화 배양에 있어서 ethylene 생합성 분비는 배양에 있어서 큰 영향을 미치지 않아 긍정적인 효과를 나타내기 보다는 오히려 분열반응을 억제하는 억제자로서의 역할을 수행한 것으로 해석된다.

적 요

국화에 있어서 효율적 형질전환 체계를 구축하기 위하여 국내외에서 육종되고 시장지배력이 강한 34개의 품종을 수집하고 이 중 우수한 신초생성 능력을 가진 5개 품종인 수방력, 백마, 신마, 핑크프라이드, 금수 등을 선발하였다. 이들 품종에 적합한 성장조절제를 선발한 결과 5개 품종에 공통으로 적용할 수 있는 성장조절제 처리는 1.0 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA의 혼용처리 이었으며 수방

력에는 3.0 mg/L NAA와 1.0 mg/L kinetin 처리가, 금수에는 0.5 mg/L NAA와 3.0 mg/L BA 처리가 역시 효율적으로 적용되었다. 캘러스 유도과 재분화 능력을 종합적으로 검토한 결과 기본배지는 MS, 배지응고제는 phytigel 0.3% 그리고 폴리아민인 putrescine을 10-15 mg/L로 처리할 경우 재분화율이 8% 정도 향상되었으며 배양재료로 줄기를 사용할 경우 기관분화율이 26% 정도 향상되었으며 기관분화 소요일수도 14일 단축시킬 수 있었다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 (과제번호 : 2008 0401034024) 지원에 의해 이루어진 것입니다.

인용문헌

- Ammirato PV (1983) Embryogenesis In Da Evans, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y(eds), Handbook of Plant Cell Culture Vol. 1 pp 82-123. Techniques for propagation and breeding, Macmillan Publishing co. New york.
- Brar MS, Moore MJ, Al-Khayri J M, Morelock TE, Anderson EJ (1999) Ethylene inhibitors promote in Vitro regeneration of cowpea (*Vigna unguiculata* L.). In Vitro Cellular and Develop. Biol. Plant 35
- Bhojwani SS, Razdan MK, Choi SJ (1989) Plant tissue culture. Kore text cooperation pp 33-49, pp 118-119
- Carla EV, Schaik A, Posthuma MJ, De Jeu, Jacobsen E (1996) Plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induction immature embryos of *Alstromeria spp.* L. Plant Cell Report 15:377-380
- Choi YE, Yeo UD, Soh WY (1986) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from stem callus of *Cedraia sinensis* Juss. Korean J. Plant Tissue Culture 13:61-70
- Chung JD, Harn JS, Sohn JK (1995) Somatic Embryogenesis from Filament-Derived Callus of *Paeonia lactiflora* PALL. Korean J. Plant Tissue Culture 22:47-52
- Cogner BV, Hanning GE, Mcdaniel DJ (1983) Direct embryogenesis from mesophyll cells of orchardgrass. Science 221:850-851
- Lee JH, Lee SY (1995) Effects of Gelling Agents and Growth Regulation on Rice Anther Culture. Korean J. Plant Tissue Culture 22: 35-40
- Lee JH, Lee SY, Namkoong SB (1996) Effects of Growth Regulators, Sucrose and Gelling Agents on Callus Growth and Plant Regeneration in *Angelica koreana* MAX. Korean J. Medicinal crop sci. 4: 78-85
- Ferrer R, Mignon G, Litvey J (1984) Arginine decarboxylase and polyamines required for embryogenesis in the wild carrots. Science 223: 1433-1435
- Hakan T (2004) The effect of nitrate(ethylene inhibitor) on in vitro shoot development in potato (*Solanum tuberosum* L.). Biotechnology 3: 72-74
- Han BH, Suh EJ, Lee SY, Shin HK, Lim YP (2007) Selection of non-branching lines induced by introducing *Ls*-like cDNA into chrysanthemum (*Dendranthema × grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) “Shuho-no-chikara”. Scientia Horticulturae 115: 70-75
- Hodges TK, Kamo KK, Imbrie CW, Becwar MR (1986) Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. Bio. Tech. 4:219-223
- Hyde CL and Philips GC (1996) Silver nitrate promotes shoot development and plant regeneration of chile pepper (*Capsicum annuum* L.) via organogenesis. L. In Vitro Cellular and Develop. Biol. Plant 32:72-80
- Kim SH, Kim MW, Kang YH, Lee SH (1993) Changes in endogenous polyamine levels during adventitious root regeneration from populus leaf segments. Korean J. Plant Tissue Culture 20: 329-335
- Korner RN and Nataraja K (1965) Experimental studies in *Ranunculus sceleratus* L. development of embryos from the stem epidermis. Phytomorphology 15: 132-137
- Kubo T, Tsuru M, Tsukimori A, Shizukawa Y, Takemoto T, Inaba K, Shiozaki S (2006) Morphological and physiological changes in transgenic chrysanthemum *morifolium* Ramat. ‘Ogurani-shiki’ with *rolC*. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 75: 312-317
- Levi A, Sink KC (1991) Somatic embryogenesis in *Asparagus*; The role of explants and growth regulators. Plant Cell Report 10: 71-75
- Linsmaier EM and Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol Plant 18:100-127
- Liu LF and Lai KL (1985) High frequency plant regeneration from water stressed rice tissue culture. In abstracts of the first international congress of plant molecular biology. p 11
- Liu LF and Lai KL (1986) Further studies on the variability of plant regeneration from young embryos callus culture in rice plant (*Oryza sativa* L.). Jpn J Crop Sci. 55:41-46
- Mitiouchkina TY, Dolgov SV (2000) Modification of chrysanthemum plant and flower architecture by *rol C* gene from *Agrobacterium rhizogenes* induction. Acta Hort 508:163-169
- Mohiuddin AKM, Choedhury MKU, Abdullah ZC, Napis S (1997) Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber in vitro shoot regeneration. Plant Cell Tissue, Organ Culture 51: 75-78
- Moon HK, Hong YP, Kim YW, Lee JS (2001) Genotype Effect on Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of 15 *Aralia elata*. Korean J. Plant Tissue Culture 28:129-134
- Moon HP, Choi SH, Soh YH (1983) Effect of high agar medium on plant regeneration in rice anther culture. Kor. J. Breed 20:335-340
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497
- Paek KY, Cho JT (1994) Year-round production system of pathogen-free stock and micropropagation in *Fritillaria thunbergii*. Korea RDA crop experiment station. pp 11-12

- Ryu JH, Choo BG, DOoo HS, Kwon TH (1996) Plant Regeneration by the Stem Culture in *Houttuynia cordata* Thunberg. Korean J. Medicinal crop sci. 4:126-131
- Sakurai N and Masuda Y (1977) Effect of indole-3-acetic acid on cell wall loosening ; Changes in mechanical properties and non-cellulosic glucose content of Avenacoleoptile cell wall. Plant Cell Physiol. 18: 587-594.
- Sharp WR, Sondahl MR, Caldas LS, Maraffa SF (1980) The physiology of asexual embryogenesis. In : Horticultural Reviews II, AVI Publishing Company, Westport.
- Smith DL and krikorian AD (1990) Somatic preembryos production from excised wounded zygotic carrot embryos on hormone-free medium evaluation of the effects of pH, ethylene and activated charcoal. Plant Cell Rep. 9:34-37.
- Song JJ, Kim MW, Lee SH, Kang BG, Kang YH (1993) Mechanism of polar differentiation of poplar; Endogenous hormone content and effect of NAA and polyamine on poplar differentiation. Korean J. Plant Tissue Culture 20: 21-26
- Sung NS, Paek KY, Chae YA (1994) Micropropagation of *Aconitum carmichaeli* Debx. and *Rehmania glutinosa* Libosch. through the plant tissue culture techniques. Korea RDA crop experiment station. pp33-34
- Bhojwani SS, Razdan MK, Choi SJ (1989) Plant tissue culture. Kore text cooperation pp33-49, pp 118-119
- Takatsu Y, Nishizawa Y, Hibi T, Akutsu T (1999) Transgenic chrysanthemum (*Dendranthera grandiflorum*) expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cineria*). Sci. Hort. 82:113-123
- Takayama S, and Misawa M (1980) Differentiation in lillium bulb scales grown in vitro. Effect of activated charcol. physiological age of bulbs and sucrose concentration on differentiation and scale leaf formation in vitro. Physiol Plant 48:121-125
- Van Eck and Kitto SL (1992) Regeneration of peppermint and orange-mint from leaf discs. Plant Cell, Tissue, Organ Culture 30:41-49
- Vogelezang JL, Cujipers M, Th de Graaf-Van der Zande (1992) Growth regulation of breeding plants by reversed day/night temperature. Acta Hort. 305:37-43
- Wetherel DF and DougallK (1976) Source of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. Physiol Plant 37:97-103
- Williames EG and Maheswaran G (1986) Somatic embryo ogenesis; Factors influcing coordinated behavior of cells on embryogenic group. Ann. Bot. 57:443-462