

한국 품종 대두(*Glycine max* L) 미숙배로부터 체세포배발생과 배지의 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid 농도가 체세포배의 형태에 미치는 영향

최필선^{1,2} · 소응영² · 조덕이³ · 유장렬^{*1}

¹한국과학기술연구원 유전공학연구소 생물자원연구그룹,

²전북대학교 생물학과, ³전주 우석대학교 생물학과

Somatic Embryogenesis in Immature Zygotic Embryo Cultures of Korean Soybean (*Glycine max* L.) Cultivars and Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid on Somatic Embryo Morphology

Pil S. CHOI^{1,2}, Yoong Y. SOH², Duck Y. CHO³, and Jang R. LIU^{*1}

¹Biological Resources Research Group, Genetic Engineering Research Institute, KIST, P.O.Box 115, Yusong, Taejon, 305-600; ²Department of Biology, Chonbuk National University, Chonju, 560-756; and ³Department of Biology, Chonju Woosuk University, Chonbuk, 565-800. *Corresponding author.

Immature zygotic embryos of five Korean soybean cultivars cultured on Murashige and Skoog's (MS) medium supplemented with various concentrations of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) produced somatic embryos without forming an intervening callus. The highest frequency (up to 90%) of somatic embryo formation was obtained when zygotic embryos were cultured on medium containing 1 to 2 mg/L 2,4-D in four cultivars. However, the frequency was highly variable to the cultivars. Transversely sliced primary somatic embryo halves were also capable of forming secondary embryos at frequencies of up to 70% when cultured on medium containing 0.1 to 1 mg/L 2,4-D. Somatic embryos formed on zygotic embryos cultured on medium containing 0.1 to 0.2 mg/L 2,4-D had two cotyledons more frequently than one or horn-type cotyledon and those on medium containing 0.5 to 4mg/L 2,4-D had a horn-type cotyledon at a prominently higher frequency. However, somatic embryos on medium containing 10 mg/L or higher concentrations of 2,4-D were usually stunted at the globular stage even after transfer to medium containing lower concentrations of 2,4-D or other growth regulators. When somatic embryos with one or two cotyledons or a horn-type cotyledon were transferred to medium containing GA₃, those with two cotyledons converted to plantlets at a higher frequency (25%) than the others.

Key words: cotyledon number, horn-type cotyledon, secondary embryo

대두의 식물체 재분화는 Christianson 등(1983)에 의해 체 세포배발생 경로로 가능성이 입증된 이래 여러 품종에서 보고되었는데, 다른 종에 비하여 체세포배 유도에 월등히

높은 농도의 오옥신(2,4-D 혹은 NAA)을 요구한다(Finer and Nagasawa, 1988; Li et al., 1985; Ghazi et al., 1986; Liu et al., 1992; Tetu et al., 1987; Wright et al., 1991). 특히, 고

농도의 2,4-D(20 mg/L)가 첨가된 배지에서 유도된 체세포배는 대부분 구형기(globular stage)에서 더 이상 발달이 진행되지 못하여 완전한 식물체로 전환이 이루어지지 않으며(Lazzeri et al., 1988; Buchheim et al., 1989), 저농도의 2,4-D(1 mg/L)가 첨가된 배지에서는 자엽기 상태의 체세포배가 형성되나 대부분 형태적으로 비정상적이다(Lippmann and Lippmann, 1984). 그리고 이러한 비정상적인 체세포배의 발달은 배지의 2,4-D 농도와 밀접한 관계가 있으며, 식물체 재생률을 감소시키는 요인으로 작용한다(Ranch et al., 1985, 1986). 본 연구에서는 경제적으로 중요한 위치를 점하고 있음에도 불구하고 기내육종에 실질적으로 이용할 만한 수준의 기내재분화 시스템이 확립되지 못한 국내 대두 5가지 품종의 미숙배를 이용하여 2,4-D 농도와 품종에 따른 체세포배의 형성 빈도, 자엽 변이 및 식물체 재분화의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

대두(*Glycine max* L; 품종: 울산콩, 아주까리콩, 금산콩, 뱀콩, 반청두) 종자를 각각 수돗물에 8시간 침적한 후, 젖은 거어즈로 덮어 25°C 암소에서 재생시켰다. 유근의 길이가 2-3 mm 정도 성장한 종자만을 취하여 버미큘라이트를 담은 화분에 각각 과중한 후 생육상(ConViron: 상대습도: 60-70%; 광도 약 30,000 lux; 16시간 명, 27°C/8시간 암, 22°C)에서 8-9주 동안 재배하여 성숙한 식물체를 얻었다. 개화 후 15-20일째, 미숙배의 크기가 2-3 mm로 자란 꼬투리를 취하여 70% 에탄올에 1분, 1% sodium hypochlorite 용액에 15분간 침적하고 멸균수로 3-5회 수세한 후 미숙배를 분리하여 배양재료로 이용하였다. 배지는 90×15 mm 플라스틱 페트리 디쉬에 25 ml씩 분주하여 사용하였으며 별도의 언급이 없는 한 25°C 암소에서 배양하였다.

체세포배를 유도하기 위하여 미숙배를 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 10, 20 및 30 mg/L 2,4-D를 단독으로 첨가한 MS(Murashige and Skoog, 1962) 배지에 각 처리구 당 30-40개씩 치상하였다. 배양 6주후에 체세포배 형성 빈도 및 2,4-D 농도별 비정상 체세포배의 빈도와 종류를 조사하였다. 그리고 이들 각각의 품종에서 형성된 자엽기의 체세포배로부터 2차 체세포배 형성률을 알아보기 위하여 각 품종당 50개 이상의 체세포배를 횡으로 반분하여 0.1, 0.5 및 1 mg/L 2,4-D를 첨가한 MS 기본배지에서 초기배양과 동일한 조건으로 4주동안 배양한 후 품종과 2,4-D 농도에 따라 조사하였다. 또한 체세포배로부터 식물체 재분화를 조사하기 위하여 자엽기의 체세포배를 MS 기본배지 혹은 MS 배지에 각각 0.5% 활성탄, 0.1 mg/L IAA, 1 mg/L BA, 1 mg/L GA₃를 첨가한 5종류의 배지에 옮겨 명조건(cool-white 형광등, 약

1,000 lux, 16시간 광주기) 하에서 배양하였다.

체세포배의 조직학적 관찰을 위하여 해부현미경으로 심장형기의 체세포배를 선별하여 25% glutaraldehyde 용액에 4°C에서 4시간 동안 고정된 후 tertiary butyl alcohol 시리즈로 탈수하여 파라플라스트에 매몰하였다. 회전식 마이크로 톱으로 7μm 두께의 절편을 만들어 hematoxylin과 fast green으로 염색하여 광학 현미경하에서 관찰하였다.

결 과

미숙배의 유근부위에서는 캘러스의 형성이 관찰되지 않았으며, 배양이 진행됨에 따라 점차 갈변되었다. 그러나 자엽부위의 경우에는 배양 1주 후부터 부풀기 시작하였으며, 3-4주째부터 2,4-D의 농도에 따라 다양한 반응을 보였다. 즉 배양 6주 후 체세포배 형성률을 비교한 결과, 0.1-0.2 mg/L 2,4-D가 첨가된 배지에서는 미숙배의 자엽부위로부터 캘러스 형성없이 대부분 신장이 일어나면서 체세포배가 36% 이하의 빈도로 직접 형성되었으며, 0.5-4 mg/L 2,4-D가 첨가된 배지에서는 자엽부위에서 팽창이 일어나면서 체세포배를 형성하였는데 ‘아주까리콩’을 제외한 4가지 품종에서 체세포배의 형성이 높은 빈도로 관찰되었다. 이중 ‘울산콩’의 경우 1 mg/L 2,4-D 농도에서 91%로 가장 높은 체세포배의 형성률을 나타냈다. 그리고 10, 20 및 30 mg/L와 같은 고농도의 2,4-D가 첨가된 배지에서 대부분의 미숙배는 유근부위에서부터 갈변이 일어나 자엽부위로 이어졌고 자엽의 일부분에서 구형기의 체세포배만이 낮은 빈도로 형성되었다(Figure 1A, B, C, D, E). 이와같이 대부분의 품종에서 체세포배 형성 빈도는 1-2 mg/L 2,4-D를 첨가하였을 때 가장 높았으며 특히, 다른 품종에 비하여 ‘울산콩’의 경우가 높았다. 그러나 ‘아주까리콩’의 경우에는 예외적으로 저농도에 비하여 20 mg/L 2,4-D가 첨가된 배지에서 가장 높은(62%) 체세포배 형성률을 보였으며, 이는 동일농도에서 ‘울산콩’(13%)의 경우보다 상당히 높았다. 그리고 이들 품종에서 유도된 각각의 체세포배로부터 이차 체세포배 형성률을 조사한 결과, 유근을 포함한 하단부보다 자엽을 포함하고 있는 상단부에서 주로 이차 체세포배가 형성되었고 ‘금산콩’과 ‘울산콩’의 경우 0.5 mg/L 2,4-D에서, ‘아주까리콩’, ‘반청두’ 및 ‘뱀콩’에서는 1 mg/L 2,4-D를 첨가한 배지에서 높은 형성률을 보였으며, 특히 다른 품종에 비하여 ‘금산콩’에서 가장 높게 나타났다(Figure 2, Figure 3F, G).

한편, 배양 동안 관찰된 체세포배의 종류를 보면, 한개의 자엽을 갖는 체세포배(Figure 3B), 두개의 자엽을 갖는 정상적인 체세포배(Figure 3D) 및 나팔형의 체세포배(Figure 3C)가 관찰되었으며, 발달이 더 이상 진행되지 않는 구형기의 체세포배(Figure 3A)도 관찰되었다. 6주후 관찰된 이

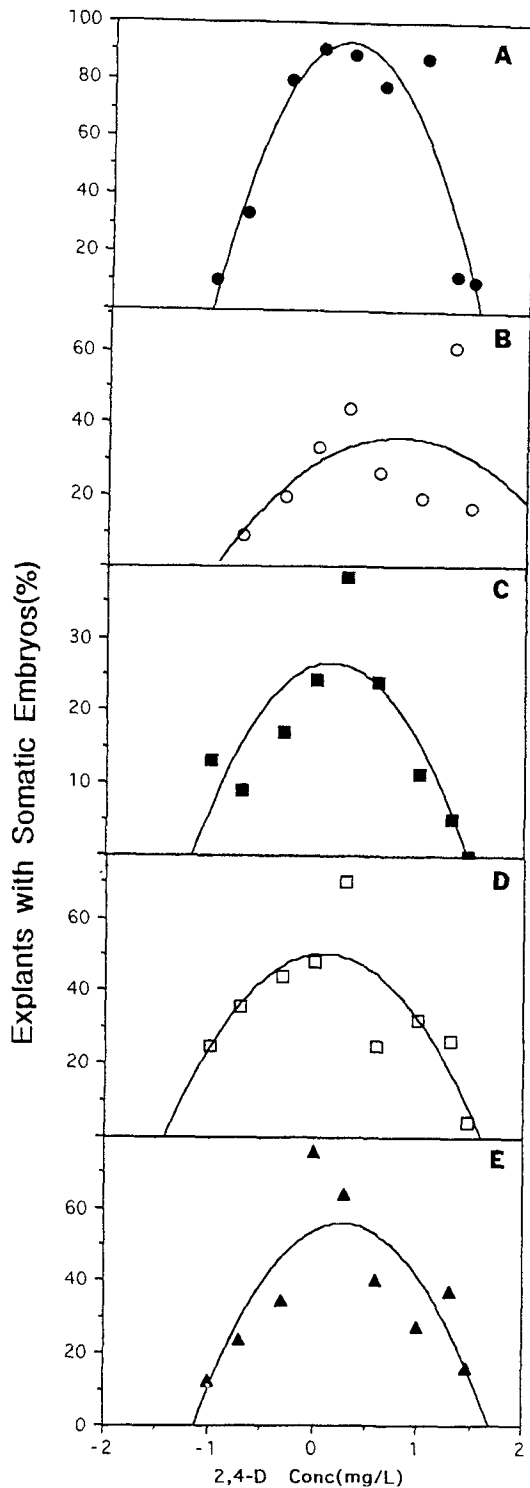


Figure 1. The frequency(%) of somatic embryo formation on immature zygotic embryos cultured on medium containing various concentrations of 2,4-D in *Glycine max* L. A: 'Ulsan', $\hat{y}=89.8+28.4x-57.0x^2$, $R^2=0.888$: B: 'Ajuggari', $\hat{y}=29.4+18.3x-11.7x^2$, $R^2=0.474$: C: 'Keumsan', $\hat{y}=26.3+4.4x-15.3x^2$, $R^2=0.725$: D: 'Baem', $\hat{y}=50.0+3.9x-21.9x^2$, $R^2=0.665$: E: 'Banchungdo', $\hat{y}=53.6+15.8x-28.2x^2$, $R^2=0.661$.

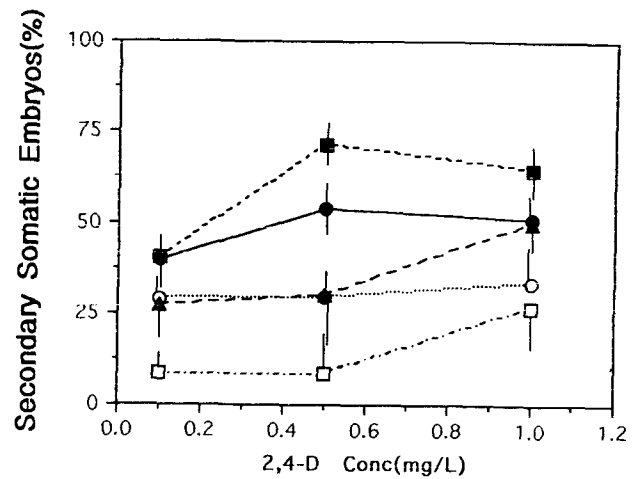


Figure 2. The frequency(%) of secondary somatic embryo formation on transversely sliced primary somatic embryo halves cultured on medium containing various concentrations of 2,4-D in *Glycine max* L. (●): 'Ulsan': (○): 'Ajuggari': (■): 'Keumsan': (□): 'Baem': (▲): 'Banchungdo'

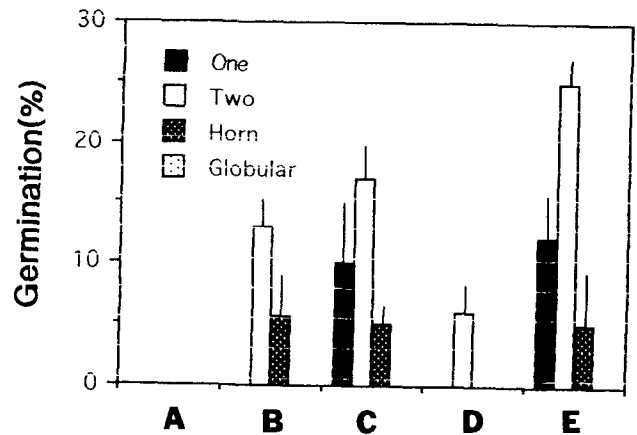


Figure 4. The germination frequency of somatic embryos with different patterns of cotyledon. Somatic embryos were cultured on MS basal medium (A), MS basal medium with 0.5% charcoal (B), MS medium with 0.1 mg/L IAA, MS medium with 1 mg/L BA (D), or MS medium with 1 mg/L GA3 (E).

들 체세포배의 형태는 품종간에는 큰 차이가 없이 유사한 경향을 보였으나, 2,4-D 농도에 따라 뚜렷한 차이를 보였다. 즉, 0.1-0.2 mg/L 2,4-D의 낮은 농도에서는 나팔형과 하나의 자엽을 갖는 체세포배보다는 두개의 자엽을 갖는 체세포배의 빈도가 약간 많았으며, 0.5-4 mg/L까지는 2,4-D 농도가 증가할수록 나팔형의 체세포배 수가 상당히 증가하는 반면, 두개의 자엽을 갖는 체세포배는 감소하였다. 그리고 구형기의 체세포배는 4 mg/L이상의 2,4-D 농도에서부터 아주 낮

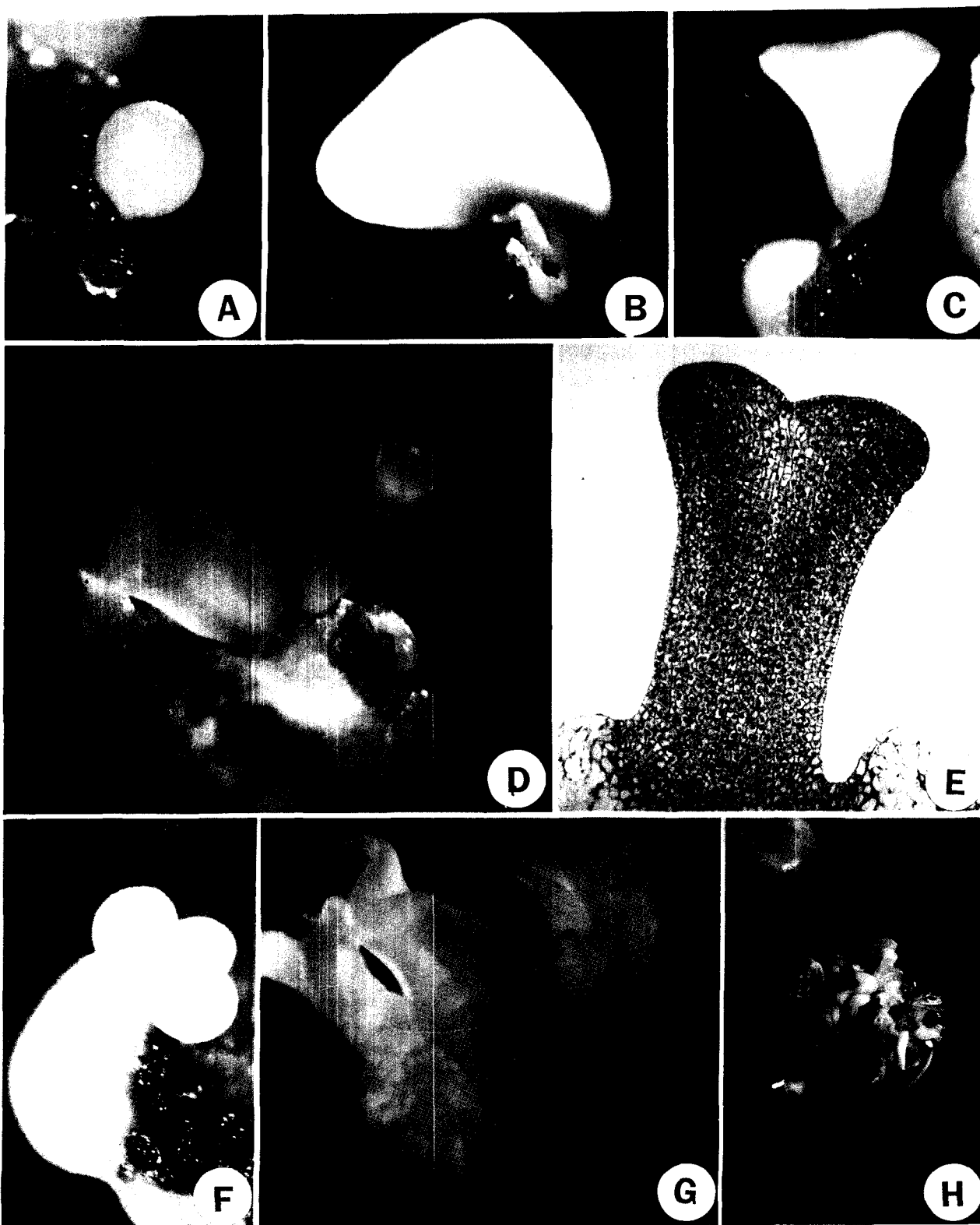


Figure 3. Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of *Glycine max* L. cv Ulsan. A: Somatic embryo at the globular stage: B: Somatic embryo with one cotyledon: C: Somatic embryo with a fused cotyledon: D: Somatic embryo with two cotyledon: E: Longitudinal section of a torpedo-shaped somatic embryo: F: Secondary globular embryos forming on primary somatic embryo explant: G: Secondary somatic embryo at the cotyledonary stage H: Germination of somatic embryo.

Table 1. The frequency of cotyledonary variation of somatic embryos formed of immature zygotic embryos cultured on medium containing various concentration of 2,4-D in *Glycine max* L.^{a,b}

Cultivar 2,4-D Conc.(mg/L)	Ulsan				Ajuggari				Keumsan				Baemkong				Banchungdo			
	Two	One	Horn	Others	Two	One	Horn	Others	Two	One	Horn	Others	Two	One	Horn	Others	Two	One	Horn	Others
0.1	2(67)	1(33)	0	0	0	0	0	0	2(50)	1(25)	1(25)	0	1(33)	1(33)	1(33)	0	2(67)	0	1(33)	0
0.2	3(42)	2(29)	2(29)	0	1(100)	0	0	0	4(50)	2(25)	2(25)	0	5(50)	3(30)	2(20)	0	5(56)	0	4(44)	0
0.5	7(42)	6(21)	15(54)	0	2(40)	1(20)	2(40)	0	3(30)	3(30)	4(40)	0	4(15)	6(23)	15(58)	1(4)	3(17)	4(24)	10(59)	0
1	12(21)	8(14)	37(65)	0	3(20)	5(33)	7(47)	0	3(17)	4(24)	10(59)	0	7(18)	10(27)	20(51)	2(5)	17(30)	13(23)	21(38)	5(9)
2	6(18)	6(18)	21(64)	0	3(19)	5(31)	8(50)	0	5(12)	11(27)	25(61)	0	10(30)	9(27)	13(39)	1(3)	10(24)	14(33)	15(36)	3(7)
4	6(27)	7(30)	7(30)	3(13)	1(8)	5(42)	4(33)	2(17)	2(14)	5(36)	6(43)	1(7)	2(22)	3(34)	2(22)	2(22)	3(17)	5(28)	2(11)	8(44)
10	0	0	0	9(100)	1(7)	0	0	5(83)	0	0	0	5(100)	2(18)	0	0	9(82)	0	2(12)	0	15(88)
20	0	0	0	6(100)	2(7)	2(7)	0	25(86)	0	0	0	2(100)	0	0	0	7(100)	0	0	0	14(100)
30	0	0	0	1(100)	0	0	0	7(100)	0	0	0	0	0	0	0	1(100)	0	0	0	3(100)

^a 'One', 'two', or 'horn' indicate somatic embryos with one, two, or horn-type cotyledons(s), respectively; and 'others' indicates stunted somatic embryos mostly at the globular stage.

^b Numbers without the parantheses indicate numbers of somatic embryos and those in parantheses the percentage of designated type somatic embryos out of total numbers of somatic embryos obtained.

은 빈도로 관찰되기 시작하였으며, 10 mg/L 이상의 농도에서는 모두 구형기의 체세포배만이 관찰되었다(Table 1). 그리고 어뢰형기의 체세포배를 조직학적으로 관찰한 결과, 뚜렷하게 두개의 자엽과 유관속이 양극으로 잘 발달되어 있는 체세포배임을 확인할 수 있었다(Figure 3E).

한편, 체세포배의 종류에 따라 여러가지 배지에서 식물체로의 재생률을 각각 조사한 결과, 구형기의 체세포배는 어떠한 배지에서도 식물체로의 전환이 일어나지 않았으며, 하나의 자엽을 갖는 배의 경우 1 mg/L GA₃를 첨가한 배지에서만 유근이 발달하였고 다른 배지에서는 전혀 이러한 현상이 관찰되지 않았다. 두개의 자엽을 갖는 배의 경우 MS 기본배지를 제외한 모든 배지에서 유근의 발달이 이루어졌으며, 특히 1 mg/L GA₃를 첨가한 배지에서 25%로 가장 높았다. 그리고 나팔형의 체세포배 경우에는 모든 배지에서 10% 이하의 낮은 재생률을 나타내었다(Figure 3H, Figure 4). 이와같이 재생된 유식물체를 기본배지로 옮긴 후 2주경과 되었을 때 5-7 cm 길이의 줄기와 3-4 cm 되는 뿌리를 가진 식물체로 발달하였다.

고 찰

대두에서 체세포배 발생은 주로 미숙배(Buchheim et al., 1989; Finer and Nagasawa, 1988; Lazzeri et al., 1988; Li et al., 1985)로부터 이루어져 왔으며, 일부는 어린 잎과 줄기(Ghazi et al., 1986)에서도 성공한 바 있다. 국내에서 재배되고 있는 5가지 품종의 미숙배를 배양하여 체세포배를 얻을 수 있었으며, 품종에 따라 2,4-D 농도의 요구성이 다르게 나타났다. 즉, '울산콩', '금산콩', '뱀콩' 및 '반청두'에서의

체세포배 형성 빈도는 1-2 mg/L 2,4-D 농도에서 높게 나타났다. '아주까리콩'의 경우는 20 mg/L 2,4-D 였다. 그리고 '울산콩'의 경우가 동일 농도의 2,4-D 첨가 배지에서 다른 품종에 비하여 일반적으로 높은 체세포배를 형성하였고 예외적으로 20 mg/L 2,4-D 처리구에서는 '아주까리콩'에 비하여 훨씬 낮은 형성률을 보였다. 이것은 대두의 체세포배 발생에 오옥신이 고농도(20 mg/L)로 이용된다는 것(Liu et al., 1992; Tetu et al., 1987)이 '아주까리콩'에서는 일치하나, 나머지 4가지 품종 즉, '울산콩', '금산콩', '뱀콩' 및 '반청두'에서는 다르게 나타났다. 또한 대두의 품종에 따라 체세포배 형성 빈도가 다르게 나타나는 것으로 보아, 계통간의 유전적 차이가 체세포배 형성빈도에 영향을 없다는 결과(Barwale et al., 1986; Komatsuda and Ohyama, 1988)와는 상당한 차이가 있었다. 따라서 알팔파의 경우(Kao and Michayluk, 1981)와 마찬가지로 대두의 체세포배 발생에 2,4-D의 요구성이 품종간 유전적 차이와 재료의 생리적 차이에 따라 달라질 수 있다는 것을 시사하고 있다. 그리고 0.1-4 mg/L 2,4-D 첨가 배지에서는 주로 자엽기의 성숙한 체세포배가 형성되었으며, 이중 0.1-0.2 mg/L과 같은 낮은 농도에서는 두개의 자엽을 갖는 정상적인 체세포배가, 0.5-4 mg/L에서는 비정상 자엽을 갖는 나팔형의 체세포배가 주로 형성되었으며, 10 mg/L 이상의 고농도에서는 자엽발달이 이루어지지 않은 구형기의 체세포배만이 형성되었다. 이와같은 결과는 저농도의 2,4-D에서 주로 자엽기의 체세포배가 형성되며, 이들은 주로 비정상적인 형태로 발달된다는 것(Lippmann and Lippmann, 1984)과 고농도에서는 구형기의 체세포배가 형성된다는 것(Buchheim et al., 1989)과도 일치한다. 그리고 대두의 체세포배 발생 과정에서 자엽변이에 영향을 주는 요인으로는 서당과 오옥신의 상호작용

(Lazzeri et al., 1988) 및 내재 오옥신의 극성이동(Liu et al., 1993) 등이 알려져 있다. 본 연구에서도 체세포배의 자엽변이와 2,4-D농도 사이에 밀접한 관계가 있는 것으로 보이고 특히, 자엽형성 초기과정에서 유관속변이에 영향을 주어(Soh, 1993) 자연상태에서는 거의 볼 수 없는 비정상 자엽을 갖는 체세포배가 형성되는 것으로 추측된다.

한편, 비정상 체세포배는 식물체로의 재생률과도 밀접한 관계가 있는데 특히, 나팔형의 경우에는 정상적인 체세포배에 비하여 재생률이 상당히 떨어진다(Kerns et al., 1986; Soh, 1993). 본 연구에서도 두개의 자엽을 갖는 정상적인 체세포배에 비하여 하나의 자엽이나 나팔형의 자엽을 가진 체세포배 및 구형배의 재생률이 일반적으로 낮으며, 6주후 구형배로 관찰된 것들은 어떠한 배지에서도 충분한 기간이 경과한 후에도 더 이상 발달하지 않았다. 이와같이 식물체 재생률에 있어서 비정상 체세포배가 정상인 것에 비하여 낮은 것은 유경의 퇴화에 있고(Isabelle et al., 1993), 구형배로부터 식물체 재생이 일어나지 않는 것은 고농도의 2,4-D 배지로부터 체세포배로 흡수된 2,4-D가 재생배지로 옮겨질 때 해리되지 않고 어떠한 화합물과 공유결합하여 2,4-D의 효과를 계속 유지함으로써 식물체로의 전환을 저해하는 것(Buchheim et al., 1989; Lazzeri et al., 1985)으로 보인다. 결국 배양과정에서 발생하는 체세포배의 비정상성이 높은 빈도로 나타나는 것은 식물체로의 재생률을 감소시키는 중요한 요인이 되기 때문에 체세포배를 통한 재생률을 극대화하기 위해서는 비정상 체세포배의 빈도를 줄이는 체계적인 연구가 수행될 필요가 있다고 생각된다. 본 연구에서는 국내품종 대두를 대상으로 기내육종에 이용될 수 있는 수준의 재분화 시스템을 처음으로 확립하였으며 이러한 시스템은 최근 주목되고 있는 *Agrobacterium*에 의한 형질전환에도 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

국내 5가지 품종의 대두 미숙배로부터 발생하는 체세포배 형성빈도와 자엽변이에 대한 2,4-D 농도의 영향을 알아 보았다. 여러가지 농도의 2,4-D가 첨가된 MS 기본배지에 각 품종의 미숙배를 6주동안 암소에서 배양한 결과 '울산콩', '금산콩', '백콩' 및 '반청두'의 경우 1-2 mg/L 2,4-D를 첨가한 배지에서, '아주까리'는 20 mg/L 2,4-D를 첨가한 배지에서 가장 높은 체세포배 형성빈도를 보였다. 또한 황으로 반분한 체세포배를 0.1-1 mg/L 2,4-D가 첨가된 배지에서 배양하였을 때 최고 70%의 빈도로 이차배를 형성하였다. 미숙배(접합자배)에서 유도된 체세포배의 형태는 2,4-D 농도에 따라 다르게 나타났는데 즉, 0.2 mg/L 이하의 농도에서는 하나의 자엽을 갖는 배와 나팔형보다는 두개의 자엽

을 갖는 정상적인 형태가, 0.5-4 mg/L 농도에서는 정상적인 형태보다는 나팔형의 체세포배 형성빈도가 높게 나타났다. 또한 체세포배의 자엽형태에 따라 식물체 재생률을 조사하기 위하여 MS 기본배지와 0.1 mg/L IAA, 1 mg/L BA, 1 mg/L GA₃ 및 0.5% 활성탄을 각각 MS 기본배지에 첨가하여 16시간 광주기하에서 4주동안 배양한 결과, 식물체 재생률은 일반적으로 두개의 자엽을 갖는 정상적인 배가 하나의 자엽을 갖는 배, 나팔형 및 구형기의 체세포배에 비하여 높았으며, 특히 1 mg/L GA₃를 첨가한 배지에서 가장 높은 재생률(25%)을 보였다.

사 사

본 논문은 과학기술처 특정과제(G70580)의 연구결과이다. 대두 종자를 제공하여 준 최양도 박사과 원고에 대하여 세심한 수정과 논평을 해준 백경희, 광상수, 이문순 박사에게 감사한다.

인 용 문 헌

- Barwale UB, Kerns HR, Widholm JM (1986) Plant Regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta* 167: 473-481
- Buchheim JA, Colburn SM, Ranch JP (1989) Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. *Plant Physiol* 89: 768-775
- Christianson ML, Warnick DA, Carlson PS (1983) A morphogenetically competent soybean suspension culture. *Science* 22: 632-634
- Finer JJ, Nagasawa A (1988) Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill). *Plant Cell Tissue Org Cult* 15: 125-136
- Ghazi TD, Cheema HV, Nabors MW (1986) Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryogenic callus of soybean, *Glycine max* L. *Plant Cell Rep* 5: 452-456
- Isabelle GT, Mauro MC, Sossountzov L, Miginiac E, Deloire A (1993) Arrest of somatic embryo development in grapevine: histological characterization and the effect of ABA, BAP and Zeatin in stimulating plantlet development. *Plant Cell Tissue Org Cult* 33: 91-103
- Kao KN, Michayluk MR (1981) Embryoid formation in alfalfa cell suspension cultures from different plant. *In Vitro* 17: 645-649
- Kerns HR, Barwale VB, Meyer MM, Widholm (1986) Correlation of cotyledonary shoot proliferation and somatic embryoid development in suspension cultures of soybean (*Glycine max* L. Merr). *Plant Cell Rep* 5: 140-143

- Komatsuda T, Ohyama K** (1988) Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant *Glycine max* tissue culture. *Theor Appl Genet* **75** : 695-700
- Lazzeri PA, Hildebrand DE, Collins GB** (1985) A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. *Plant Mol Biol Rep* **3** : 160-167
- Lazzeri PA, Hildebrand DE, Sunega J, William EG, Collins GB** (1988) Soybean somatic embryogenesis: interaction between sucrose and auxin. *Plant Cell Rep* **7** : 517-520
- Li BJ, Langridge WHR, Szalay AA** (1985) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in the soybean *Glycine max*. *Plant Cell Rep* **4** : 344-347
- Lippmann B, Lippmann G** (1984) Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean *Glycine max* L. Merr. *Plant Cell Rep* **3** : 215-218
- Liu CM, Xu ZH, Chua NH** (1993) Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *The Plant Cell* **5** : 621-630
- Liu W, Moore PJ, Collins GB** (1992) Somatic embryogenesis in soybean via somatic embryo cycling propagation. *In Vitro Cell Dev Biol* **28** : 153-160
- Ranch JP, Oglesby L, Zielinski AC** (1985) Plant regeneration from embryo-derived tissue culture of soybean. *In Vitro* **21** : 653-658
- Ranch JP, Oglesby L, Zielinski AC** (1986) Plant regeneration from tissue cultures of soybean of somatic embryogenesis. *In* I Vasil, ed, *Plant Regeneration and Genetic Variability, Vol 4, Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Academic Press, New York pp 97-110
- Soh WY** (1993) Developmental and structural diversity of regenerated plants in cell and tissue cultures. *In* 7th symposium on plant biotechnology Molecular approach to plant cell differentiation pp 1-35
- Tetu T, Sangwan-Norreel B, Sangwan R** (1987) In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration in three precocious varieties of soybean. *CR Seances Acad Sci Ser* **3** : 613-617
- Wright MS, Launis KL, Novitzky R, Duesing JH, Harms CT** (1991) A simple method for the recovery of multiple fertile plants from individual somatic embryos of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *In Vitro Cell Dev Biol* **27** : 153-157

(1993년 12월 15일 접수)