

대두 품종에 따른 자엽절에서의 다신초 형성

하건수 · 한태진^{1*}

강원도농업기술원, ¹한림대학교 생명과학부

Multiple Shoot Formation from Cotyledonary Nodes of Soybean Cultivars

HA, Keon Soo · HAN, Tae Jin^{1*}

Kangwon Province Agricultural Research & Extension Services, Chuncheon, 200-150, Korea

¹Division of Life science, Hallym University, Chuncheon, 200-702, Korea

ABSTRACT For the plant regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merr.), the shoot formation rate, optimal medium and tissue conditions were examined using Korean soybean cultivars. Among the parts of seedling, a node that includes one cotyledon showed the highest shoot formation rate among other tissues. Half-strength B5 medium was more efficient than full strength medium. Formation rates of pair shoots (1 to 2 shooting) were higher in the when benzyl adenine was supplemented. The formation rates of multiple shoots, that is, 4 to 5 in shooting, were high when thidiazuron was supplemented. Multiple shoot was *de novo* formed in cutting side of cotyledonary node. The effective concentration of thidiazuron for shoot induction treatment was 2 mg/L. Among the 27 cultivars, multiple shoot formation rates were high in the 11 cultivars including 'Heugcheongkong, and pair shoot formation rates were high in the 16 cultivars including 'Malikong'.

Key words: Cotyledonary node, cultivar, shoot formation, soybean

서 론

식물의 조직배양방법은 세포 내 기작 연구나 대량번식 및 신품종 육종을 위한 형질전환체 선발 등 다양한 목적으로 매우 유용하게 이용되어 왔다. 대두의 경우 형질전환을 이용한 품종 육성시 다양한 조직배양기술이 이용되어 왔으나, 두과 작물은 클로버 (White and Voisey 1994), 땅콩 (Sellars et al. 1990) 및 완두 (Bean et al. 1997) 등 몇몇 종을 제외하고는 아직도 기내에서 세포나 조직으로부터 식물체 재분화 효율은 낮은 편으로 극복해야 할 과제로 남아 있다.

대두의 조직배양은 자엽 및 하배축에서 유래된 callus를 이용한 Gamborg 등의 보고 (1983) 이후 다양한 조직을 이용한 연구가 있었으나, 대부분 식물체를 획득하는 데에 실패하거나 효율이 높지 못해 실용화에는 어려움이 있었으며, 일부 이용

가능한 결과의 경우에도 품종의 재배환경의 지역적인 차이로 인하여 직접적인 이용에는 문제점이 있었다. 최근에 대두의 조직배양 체계는 체세포배 형성을 유도하거나 (Komatsuda 1992) 조직절편에서 직접적인 기관 형성을 유도하는 방법 (Kim et al. 1990)이 주를 이루고 있으며, Kim 등 (1992)에 의한 직접적인 재분화 유도나 Sohn과 Bae (1995)의 체세포 유도 등의 연구가 보고되고 있다.

대두의 기내배양에 의한 재분화에는 기본배지, 식물생장조절물질, 조직절편 등 매우 많은 요인이 관여하는 것으로 알려져 있으며 (Wright et al. 1986; Wie and Xu 1988), 특히 품종에 따른 다양한 반응은 재분화 연구를 어렵게 하는 요인이 되고 있다. 대두의 재분화를 위한 조직배양시 조직절편에서 직접 기관형성을 통한 재분화시에는 대부분의 보고에서 콩의 종실이나 유묘를 사용하고 있고, 자엽 (Mante et al. 1989), 자엽절 (Graybosch et al. 1987), 하배축 (Kaneda et al. 1997) 및 상배축 (Dan and Reichert 1998; Wright et al. 1987b) 등, 사용하는 조직절편이 상이하였다. 이와 같이 연구보고마다 사

*Corresponding author. Tel 033-258-5724 Fax 033-240-1436
E-mail tjhan@hallym.ac.kr

용하는 대두 품종이 다르다는 측면에서 볼 때 대두 재분화에는 적정품종의 적정조직이 존재함을 추정케 한다. 따라서 국내 육성 품종들의 재분화율을 비교하여 적정 품종을 선발하는 것이 중요하고, 대두 재분화 체계에 적절한 조직을 찾기 위하여 기존의 연구에서 재분화 연구에 사용한 유묘의 상배축, 하배축, 절 및 자엽절을 이용하여 적정조직을 구명해야 할 것이다 (Yang et al. 1990). 또한 대두의 신초 형성 및 체세포배 형성에는 기본배지 및 성장조절물질의 영향도 보고되고 있는데 (Wright et al. 1987a; Shatty et al. 1992; Simmonds and Donaldson 2000), 최근 cytokinin 효과가 보고되고 있는 thidiazuron (Bhagwat et al. 1996; Malik and Saxena 1992; Kim et al. 1997)의 경우 대두에서도 그 효과가 보고되고 있으므로 (Kaneda et al. 1997) 대두의 신초 분화에 효과가 있을 것으로 기대된다. 따라서 본 연구는 대두의 조직절편을 이용한 신초 형성을 위하여 조직 절편과 배지 조성물질 등에 따른 적정 배지 및 조직화학적 변화를 관찰하여 신초 형성체계를 확립하고 국내육성품종들의 재분화 효율을 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

대두 (*Glycine max* L.)의 국내 장려 품종 중 장류 및 두부용 콩과 혼반용 유색콩 및 생태형에 따른 여름콩 등 27품종을 강원도 농업기술원에서 분양 받아 사용하였다. 실험에 사용한 유묘는 증류수가 있는 시험관을 이용하여 연속 암소의 27°C 항온조건에서 발아시킨 후 사용하였다. 실험목적에 따라 발아기간을 달리하였고 조직절편을 상배축, 하배축, 자엽절로 구분하여 사용하였다. 자엽절의 경우 자엽을 제거한 자엽절과 1개의 자엽이 붙은 상태의 자엽절을 구분하였으며, 자엽의 향측면이 배지에 치상되도록 하였다. 신초 형성률은 모든 실험에서 치상 후 3주간 16시간 명주기, 27°C 항온 조건에서 배양 후 1~2개의 shoot (pair shoot)가 형성된 절편과 3~5개의 shoot (multiple shoot)가 형성된 절편으로 나누어 조사하였다.

조직절편에 따른 shoot 형성

배지는 1/2 B5 배지를 사용하였으며, 2% sucrose와 0.7% agar 및 성장조절물질 중 cytokinin으로 thidiazuron (TDZ)을 2 mg/L의 농도로 처리한 배지를 이용하여 신초 형성률을 비교하였고, 사용된 조직절편은 발아 7일 후 유묘의 상배축, 하배축, 자엽절 및 1개의 자엽이 포함된 자엽절로 구분하여 치상하였으며, 자엽이 포함된 자엽절 치상시에는 자엽의 향측면이 배지표면에 치상되도록 하였다.

유묘의 발아 기간에 따른 자엽절의 shoot 형성

유묘의 발아 기간에 따른 자엽절의 신초 형성률을 비교하기 위하여 발아 기간을 구분하였다. 배지는 1/2 B5 배지를 사용하였으며, 2% sucrose와 0.7% agar 및 cytokinin으로 thidiazuron (TDZ)을 2 mg/L의 농도로 처리한 배지를 이용하였다. 대두 자엽에서의 발아기간에 따른 부정근 형성 비교에서 발아 4일 된 유묘의 자엽에서 부정근 형성이 많았고 (Han, 1994), 대두 유묘는 발아 8일 정도에 상배축이 형성되므로 실험에 사용하는 유묘는 발아 2일, 발아 4일 및 발아 8일까지의 유묘를 사용하였다.

신초 형성에 미치는 기본배지와 cytokinin의 영향

MS 배지와 B5 배지를 각각 1/2 감량한 기본배지에 2% sucrose와 0.7% agar 및 thidiazuron (TDZ)을 2 mg/L의 농도로 처리한 배지를 이용하여 기본배지의 영향을 조사한 후, 발아 4일 유묘의 자엽절을 이용하여 1/2 B5 기본배지에 benzyl adenine (BA)과 TDZ를 각각 1, 2, 4, 8 mg/L 첨가하여 신초 형성률을 비교하였다.

자엽절에서의 신초 형성과 품종의 영향

대두 자엽절을 이용한 신초 형성시 품종 간 차이를 비교하기 위하여 '흑청콩' 등 국내 장려품종 27품종을 사용하였으며, 기본배지는 1/2 B5 배지에 2 mg/L TDZ를 첨가하여 사용하였다.

자엽절에서의 신초 형성시 조직화학적 관찰

신초 형성기간 동안 자엽과 자엽절 부위의 전분 분포와 형태적 변화를 알아보기 위하여 신초 유도 후 배양기간별로 자엽절편과 자엽절 조직을 조직화학적으로 관찰하였다. 배양기간별 자엽절편과 자엽절을 37% formaldehyde : glacial acetic acid : 70% ethanol (FAA) 고정용액을 5 : 5 : 90의 비율로 조성하여 고정하였으며, ethanol 탈수과정을 거치고 paraffin에 포매하여 고정한 후 로타리 마이크로톰으로 8 μm 절편을 만들어 표본을 만들었다. Haematoxylin에 염색하고 세포 내의 전분분포를 관찰하기 위하여 periodic-acid Schiff's (PAS) 반응을 유발한 후 광학 현미경으로 관찰하였다 (O'Brien and McCully 1981).

결 과

조직절편에 따른 신초 형성

대두의 절편으로부터 신초를 유도하기 위한 실험재료로

'장엽콩'의 유묘를 사용하였으며, 유묘의 조직 부위별 shoot 형성률을 비교하였다 (Figure. 1). 공시한 조직 부위는 발아 7일 유묘의 상배축, 하배축, 절 및 자엽절이었다. 형성되는 shoot의 양상은 1~2개의 shoot가 형성 (pair shoot)되어 빠르게 신장하는 경우와 3~5개의 shoot가 형성 (multiple shoot)되어 신장하지 않는 경우로 구분되었다. Pair shoot가 형성되는 경우에는 배양 2주일 후에 형성되어 급속히 신장하였다. 조직 부위별 shoot 형성률을 비교하면 상배축에서는 shoot가 형성되지 않았고 하배축에서는 pair shoot만 형성되었다. 자엽이 없는 자엽절에서는 pair shoot와 multiple shoot가 형성되었으나 pair shoot 형성률이 높았고, 1개의 자엽이 있는 자엽절에서도 두 가지 형태의 shoot가 모두 형성되었으나 multiple shoot의 형성률이 높았다.

유묘의 발아기간에 따른 자엽절의 shoot 형성

Shoot를 형성시키기 위한 유묘의 적정 배양일이 있을 것으로 생각되어 유묘의 발아기간이 다른 '장엽콩' 자엽절에서 shoot 형성률을 비교하였다 (Figure 2). 유묘의 발아기간을 2일, 4일 및 8일로 구분하였고, 8일 발아시에는 상배축이 형성된 후의 유묘 상태이었다. 모든 처리에서 형성되는 shoot는 pair shoot보다 multiple shoot가 더 많이 형성되었고, 발아일이 연장될수록 pair shoot 형성률은 높아졌으나, multiple shoot는 발아 4일의 유묘의 자엽절에서 가장 많이 형성되었다.

Shoot 형성에 미치는 기본배지와 cytokinin의 영향

대두의 자엽절을 이용한 shoot 형성시 기본배지와 cytokinin의 영향을 구명하였다. 한 가지 품종을 시험할 경우 품종마다 shoot 형성률이 상이하다면 적정배지구명에 혼란을 줄 것으로 생각되어 4가지 품종을 시험하였으며, 혼반용 유색콩인 '흑청콩'과 '검정콩 1호', 장류 및 두부용콩으로 '황금콩'과

'장엽콩'을 사용하였다. 품종별 비교에서는 장류 및 두부용콩보다는 유색콩인 '검정콩 1호'와 '흑청콩'이 shoot 형성 양상에 관계없이 형성률이 높았으며, 배지별 효율 비교에서는 MS 배지보다 B5 배지에서 형성률이 높았다 (Figure 3). MS와 B5배지모두 1/2 감량한 경우에 형성률이 높았으며 1/2 B5 배지에서 품종에 관계없이 multiple shoot 형성률이 높았다.

자엽절을 이용한 shoot 형성시 cytokinin류에서 BA와 TDZ의 영향을 농도에 따라 비교하였다 (Figure 4). Cytokinin의 처리 농도는 1, 2, 3, 4 mg/L였으며, 2 mg/L 처리시 shoot 형성률이 가장 높았다. 그러나 BA 처리시에는 pair shoot가 형성되는 비율이 높았고, TDZ 처리시에는 자엽절의 절제면에서 multiple shoot 형성률이 높게 나타나, 두 생장조절제의 영향이 shoot 형성 양상별로 특이하게 구분되었다. 생장조절제의 종류에 관계없이 4 mg/L 처리시에는 배양 2주 후 대부분 괴사하였다.

자엽절에서의 shoot 형성과 품종의 영향

콩의 품종별 shoot 형성률을 비교한 결과, shoot의 형성 양상은 품종마다 두 가지로 구분되었다 (Figure 5). 공시한 품종은 국내 주요품종 중 27품종이었고 용도별로 장류 및 두부용콩과 혼반용 유색콩이었으나, 생태형별로 여름콩이 포함되었다. '검정콩 1호' 등 11품종에서는 pair shoot (Figure 6A)가 형성되는 비율보다 multiple shoot (Figure 6B)의 형성률이 높았고, '흑청콩' 등 16품종에서는 pair shoot 형성률이 더 높게 나타났다. 공시한 품종에서는 생태형에 따른 차이는 없었으나, 종실의 크기가 크고 성숙기가 다소 늦은 품종들에서 다소 많은 수의 shoot가 형성되었다.

자엽절에서의 shoot 형성시 조직화학적 관찰

대두의 자엽절에서 shoot가 형성되는 기간 동안 자엽과 자

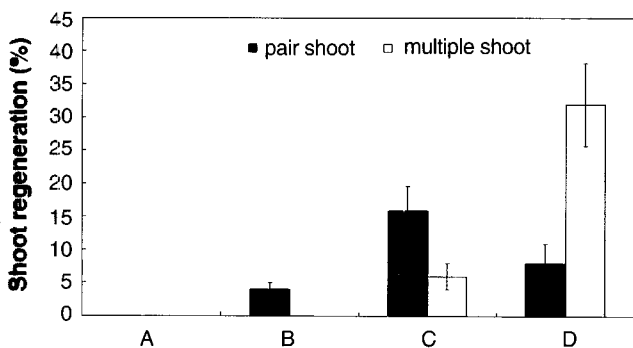


Figure 1. Shoot formation from various explants of soybean (*Glycine max* L. cv. Jangyeob) seedling. Explants were cultured in 1/2 B5 medium supplemented with 2 mg/L TDZ. Each bar represents the means ± standard error. A, Epicotyl; B, Hypocotyl; C, Node; D, Cotyledonary node.

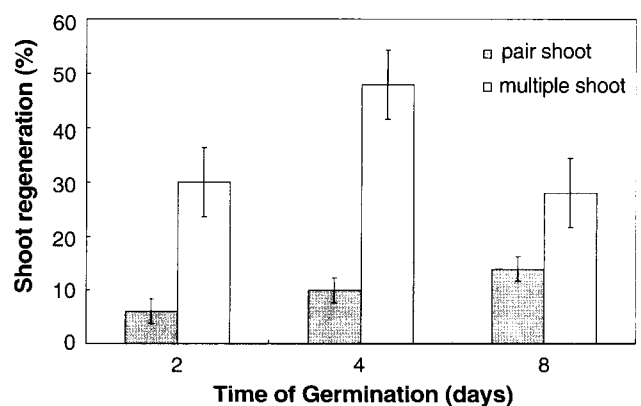


Figure 2. Effects of germination period on shoot formation from soybean (*Glycine max* L. cv. Jangyeob) cotyledonary nodes. Each bar represents the means ± standard error.

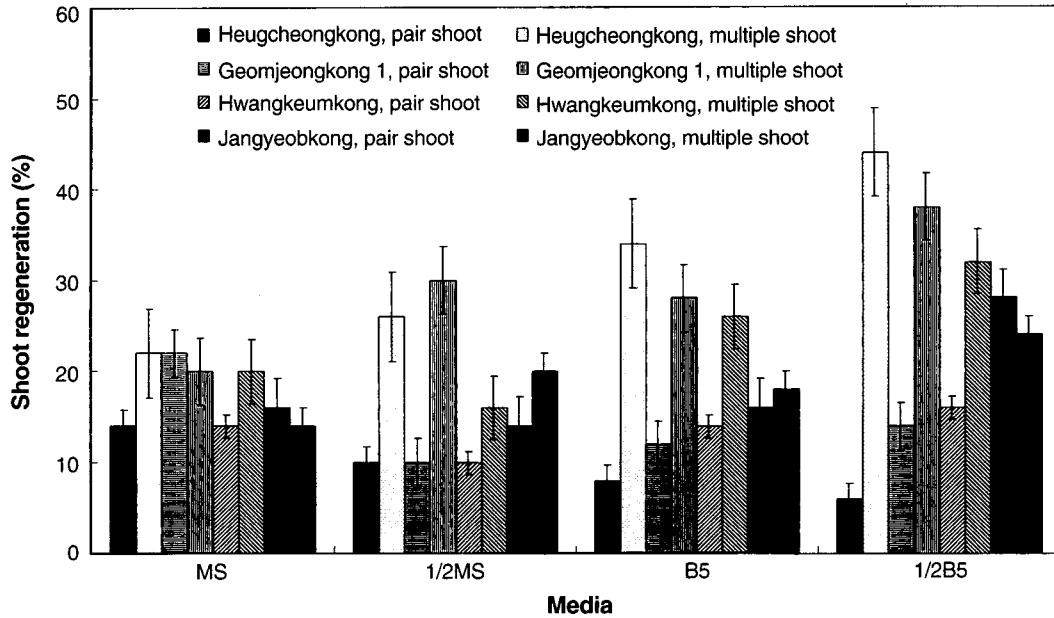


Figure 3. Effects of media on shoot formation from soybean cotyledonary nodes. Each bar represents the means ± standard error.

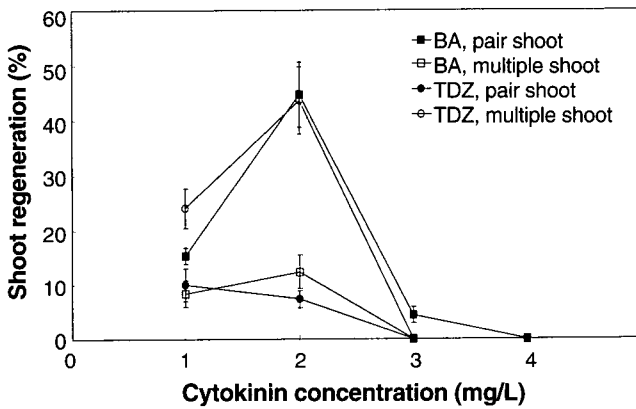


Figure 4. Effects of BA and TDZ on shoot formation from soybean cotyledonary nodes. Each bar represents the means ± standard error.

엽절에서 전분 분포와 형태적 변화 양상을 관찰하였다 (Figure 7). Shoot 형성을 위한 자엽절의 치상시에는 자엽을 구성하는 유조직 내에서 전분이 많이 관찰되었으나 배양 1주 부터는 자엽절편 내에서 전분이 관찰되지 않았다. 그러나 배양기간이 경과할수록 자엽을 구성하는 vein이 발달하고 자엽이 확장되었다. 한편 shoot 형성이 경시적으로 관찰되지 않는 배양 2주에 shoot가 형성되는 부위인 절조직을 관찰한 결과 분열조직을 포함하는 모든 조직에서 전분은 관찰되지 않았다. 그러나 절조직에서 액아의 분열이 관찰되어 pair shoot의 경우 내생적으로 잠재해 있는 액아에 의한 shoot로 확인되었고, 절조직의 절체면에서 여러 개의 shoot 원기가 확인되어 multiple shoot의 경우 새로이 형성된 shoot로 확인되었다.

고 찰

두과 작물에서의 조직배양을 이용한 식물체 분화는 Cheng 등 (1980)에 의해 처음으로 기관형성을 통한 재분화가 보고된 후 Gamborg 등 (1983)과 Kerns 등 (1986)에 의해 체세포배의 형성이 보고되는 등 몇몇 보고 (Lippmann and lippmann 1984; Lazzeri et al. 1985; Komatsuda and Ohyama 1988)가 있었으나, 아직까지 일반화되지는 못하고 있다. Wright 등 (1986)은 대두 자엽절에서의 재분화가 표피세포에서의 새로운 shoot 형성이라고 하였지만, 체세포배 형성과정을 이용한 재분화의 경우 외래 유전자의 도입시 체세포배 형성능이 있는 세포에 도입되거나 외래유전자가 도입되어진 세포를 체세포배가 형성되게 해야 하는 문제가 있다. 따라서 자엽절 등을 이용한 shoot 형성시 효율성만 높아진다면 형질전환을 위한 재분화 체계로 적합하리라 생각된다. 그러나 체세포배 형성시에도 유전형 간 차이가 있음이 보고되었고 (Simmonds and Donaldson 2000), 기관형성을 이용한 재분화에도 유전형 간 차이가 보고되었다 (Yang et al. 1990). 또한 이들 재분화 체계를 이용한 형질전환시에도 형질전환 방법에 따라 효율의 차이가 있는 것은 (Sato et al. 1993; Simmons and Donaldson 2000) 적정 형질전환체계에도 적절한 재분화체계 및 적정품종이 있어야 한다는 것을 추정케 한다.

따라서 본 연구에서는 대두 자엽절에서의 체분화 체계를 이용하여 궁극적인 형질전환을 이용한 신식물 창출시 국내에서 이용 가능한 품종을 찾고자 국내 주요 장려품종 중 27품종을 시험하여 shoot 형성률을 비교하였다. Shoot 형성 양상은 품종에 관계없이 두 가지 형태로 구분되었다. 즉, pair shoot가 형성되어 빠르게 신장하는 경우와 multiple shoot가

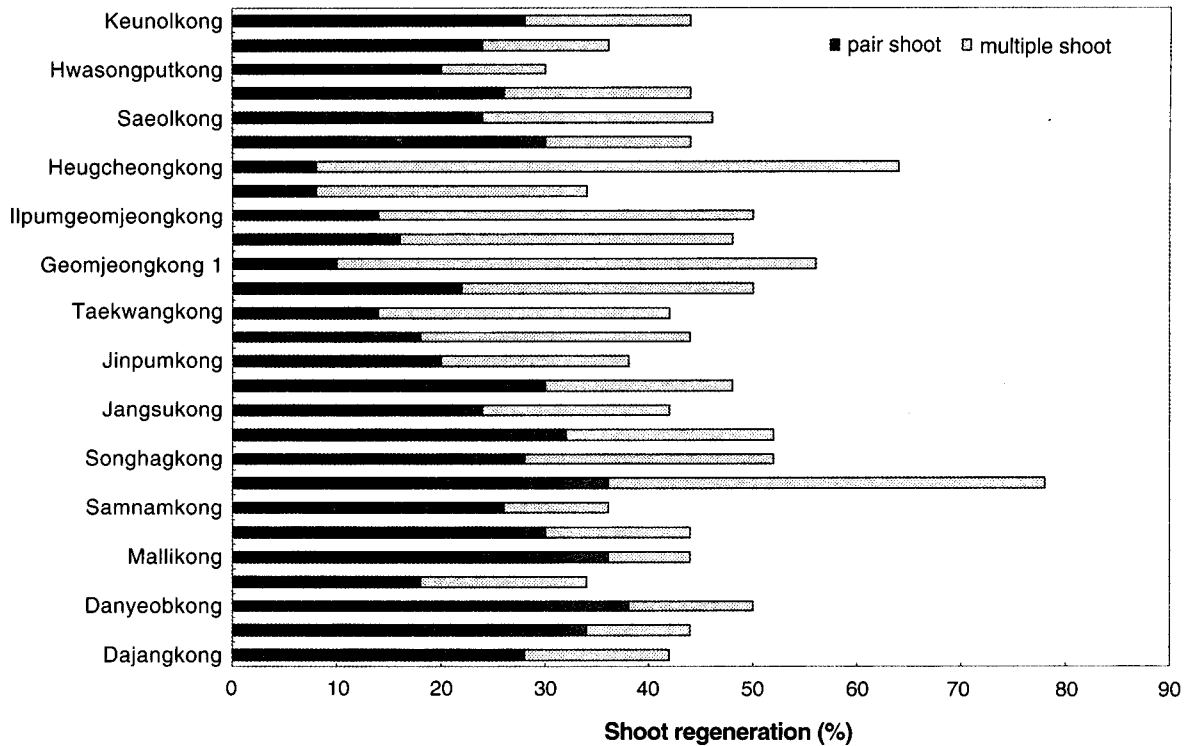


Figure 5. Comparison of shoot formation from cotyledonary nodes of soybean cultivars.

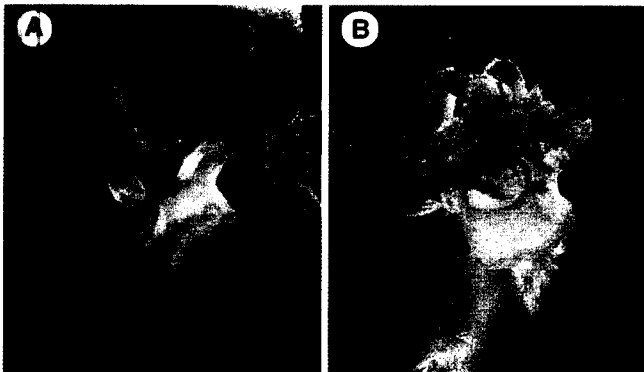


Figure 6. Shoot regeneration from cotyledonary nodes of soybeans. A, Pair shooting; B, Multiple shooting.

형성된 후 신장하지 않는 경우로 구분되었으며, 조직화학적 관찰 결과 multiple shoot의 경우 새로이 만들어지는 shoot인 것이 확인되었으므로 multiple shoot가 형성되는 체계가 더 효과적일 것으로 생각된다. 실험에 사용한 27품종은 국내에서 직접 이용이 가능한 우량품종들이었다. Shoot 형성률이 품종들의 용도별 분류에 따른 차이는 뚜렷하지 않았으나, 혼반용 유색품종을 포함하는 종실이 비교적 크고 성숙기가 다소 늦은 품종들에서 multiple shoot 형성률이 높은 경향이어서 shoot 형성 양상에 따라 '흑청콩' 등 11품종에서는 multiple shoot 형성률이 높았고, '만리콩' 등 16품종에서는 pair shoot 형성률이 높았다. 품종들의 인위적 분류에 따른 차이는 구명

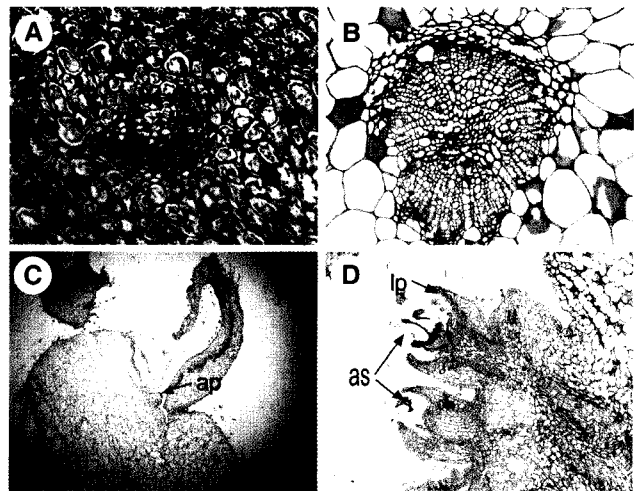


Figure 7. Light microscopic histochemistry of 8 μ m paraffin sections, showing the PAS reaction in cotyledon and cotyledonary node during the shoot formation from soybean cotyledonary nodes. A, 1 week cultured cotyledon section filled with starch granules ($\times 200$); B, Vein from 4 weeks cultured cotyledon ($\times 200$); C, Axillary bud from 1 week cultured cotyledonary node ($\times 40$); D, adventitious shoots formed from 2 weeks cultured cotyledonary node ($\times 40$). ap, axillary bud primordium; as, adventitious shoot; lp, leaf primordium; sg, starch granule; v, vein.

할 수 없었으나 품종들의 shoot 형성 양상에 따른 차이는 확인할 수 있었으므로 향후 형질전환 기법 적용시 기초자료로

의 활용이 가능하리라 생각된다.

본 연구에서와 같이 조직절편에서 직접 기관형성을 통한 재분화시에는 대부분의 보고에서 대두의 종실이나 유묘를 사용하고 있으며 유묘 사용시에도 자엽 (Mante et al. 1989), 자엽절 (Graybosch et al. 1987), 하배축 (Kaneda et al. 1997) 및 상배축 (Dan and Reichert 1998; Wright 1987b) 등 연구 보고마다 사용하는 조직절편이 상이하였다. 즉, 사용한 대두 품종이 다르다고 추정할 때 각각의 연구 보고마다 shoot의 형성을 위한 효율적인 유묘의 조직절편이 다른 것은 대두의 경우 품종에 따른 또한 유묘의 조직절편에 따른 shoot 형성이 상이함을 추정케 한다. 본 연구에서도 같은 배지에서 유묘의 상배축, 하배축, 절 및 1개의 자엽이 포함된 자엽절의 shoot 형성률에 차이를 보인 것은 (Yang et al. 1990) 품종에 따라 shoot 형성률이 높은 적정 조직절편이 있는 것을 알 수 있게 하였다. 또한 대두의 shoot 형성 및 somatic embryogenesis에는 기본배지 및 생장조절물질의 영향도 보고되고 있으며 (Wright et al. 1987a; Shatty et al. 1992), 최근 cytokinin 효과가 보고되고 있는 TDZ (Bhagwat et al. 1996; Kim et al. 1997)의 경우 콩에서도 그 효과가 보고되고 있다 (Kaneda et al. 1997). 본 연구에서는 BA와 TDZ의 효과가 상이하게 나타났다. BA 처리시에는 배양 2주 후 pair shoot가 형성되어 급속히 신장하였고 TDZ 처리시에는 배양 4주 후 자엽절의 절제면에서 multiple shoot가 형성되어 신장하지는 않는 결과를 보였다. Kaneda 등 (1997)은 하배축에서 multiple shoot가 더 많이 형성되었다고 하였으나, 본 연구에서는 반대의 결과를 보였다. 그러나 유묘의 배양일에 따른 shoot 형성비교에서 배양 4일의 유묘가 가장 적절한 재료로 구명되었으므로 Kaneda 등 (1997)의 실험에서 사용한 유묘의 배양일이 14일 인 점에 미루어 치상한 조직절편이 같은 상태의 하배축 및 자엽절은 아닌 것으로 생각된다. 한편 Wright 등 (1986)에 의해 재분화시 자엽의 중요성이 알려진 후 Yang 등 (1990)도 1개의 자엽보다 2개의 자엽이 있는 경우에 재분화율이 높았다고 하였다. 즉, 본 연구에서도 자엽이 없는 절보다는 1개의 자엽이 포함된 자엽절에서 multiple shoot 형성률이 높았으며, 자엽절에서의 shoot 형성은 배지의 구성에 의존되나 최적의 shoot 형성을 위한 자엽의 역할이 중요함을 추정케 한다. Shoot 형성 양상에서 pair shoot가 형성되어 신장하는 경우는 조직 내에 존재하고 있는 shoot 원기가 배지에 치상 후 생장한 것으로 확인되었으나 multiple shoot의 경우 절조직의 절제면에서 새로이 형성된 것으로서 자엽절을 이용한 shoot 형성 방법은 궁극적인 형질전환체계에 적합하리라 생각된다. 결국 본 연구에서 얻은 대두 자엽절을 이용한 재분화 체계와 국내 육성 품종들의 shoot 형성 양상 및 형성률에 대한 결과는 국내에서의 *Agrobacterium*에 의한 형질전환시 유용한 자료가 될 것으로 사료된다.

적 요

대두의 재분화 체계를 확립하고자 품종별 shoot 형성률, 적정배지 및 적정조직을 구명하고자 하였다. 유묘의 조직부위별 비교에서는 1개의 자엽을 포함한 절에서 multiple shoot 형성률이 높았다. 기본배지에서는 1/2 B5 배지가 효율적이었으며, TDZ 처리시에 multiple shoot 형성률이 높았으며, 처리농도는 2 mg/L가 효율적이었다. Shoot 형성시 자엽 내 전분은 배양 1주까지 증가 후 감소하였으며, 수용성 당은 배양 2주까지 증가 후 shoot가 형성되는 배양 4주에는 관찰되지 않았다. 품종 간 비교에서는 품종에 따라 shoot 형성 양상이 구분되어, '흑청콩' 등 11품종에서는 multiple shoot 형성률이 높았고, '만리콩' 등 16품종에서는 pair shoot 형성률이 높았다. 자엽절에서 shoot가 형성되는 양상에 따른 조직화학적 관찰 결과 pair shoot의 경우 내생적으로 잠재한 액아에 의한 것이며, multiple shoot의 경우는 새로이 형성된 shoot로 확인되었다.

인용문헌

- Bean SJ, Gooding PS, Mullineaux PM and Davies DR (1997) A simple system for pea transformation. *Plant Cell Rep* 16:513-519
- Bhagwat B, Vieira LGE and Ericson LR (1996) Stimulation of in vitro shoot proliferation from nodal explants of cassava by thidiazuron, benzyladenine and gibberellic acid. *Plant Cell Tiss Org Cult* 46:1-7
- Cheng TY, Saka H and Voqui-Dinh TH (1980) Plant regeneration from soybean cotyledonary segments in culture. *Plant Sci Lett* 19:91-99
- Dan Y and Reichert NA (1998) Organogenic regeneration of soybean from hypocotyl explants. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 34:14-21
- Gamborg OL, Davis BP and Stahlhut RW (1983) Cell division and differences in protoplasts from cell culture of Glycine species and leaf tissue of soybean. *Plant Cell Rep* 2:213-215
- Graybosch RA, Edge ME and Delannay X (1987) Somaclonal variation in soybean plants regenerated from the cotyledonary node system. *Crop Sci* 27:803-806
- Han TJ (1994) Changes in specific protein profiles during initiation of adventitious roots in soybean (*Glycine max* L.) cotyledon. *Kor J Plant Tissue Cult* 21:123-129
- Kaneda Y, Tabei Y, Nishimura S and Harada K (1997) Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increase the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plant Cell Rep* 17:8-12
- Kerns HR, Barwale UB, Jr. Meyer MM and Wildhorm JM (1986) Correlation of cotyledonary node shoot proliferation and somatic embryoid development of suspension cultures of soybean

- (*Glycine max* L. Merr.). Plant Cell Rep 5:140-143
- Kim JH, LAMotte CE and Hack E** (1990) Plant regeneration in vitro from primary leaf nodes of soybean (*Glycine max*) seedlings. J Plant Physiol 136:664-669
- Kim MK, Sommer HE and Bongarten BC** (1997) High-frequency induction of adventitious shoots from hypocotyl segments of *Liquidambar styraciflua* L. by thidiazuron. Plant Cell Rep 16:536-540
- Kim YH, Kim SD and Hong EH** (1992) Plant regeneration from *in vitro* tissue culture of soybean seedling. Kor J Crop Sci 37:419-424
- Komatsuda T and Ohyama K** (1988) Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean, *Glycine max*. Theor Appl Genet 75:695-700
- Komatsuda T, Lee W and Oka S** (1992) Maturation and germination of somatic embryos as affected by sucrose and plant growth regulators in soybeans *Glycine gracilis* Skvortz and *Glycine max* (L.) Merr. Plant Cell Tiss Org Cult 28:103-113
- Lazzeri PA, Hildebrand DF and Collins GB** (1985) A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. Plant Molecular Biology Rep 3:160-167
- Lippmann B and Lippmann G** (1984) Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean (*Glycine max* L. Merr.). Plant Cell Rep 3:215-218
- Mante S, Scorza R and Cordts J** (1989) A simple rapid protocol for adventitious shoot development from mature cotyledons of *Glycine max* cv. Bragg. In vitro Cell Dev Biol 25:385-388
- Malik KA and Saxena PK** (1992) Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L.: High frequency induction of direct shoot formation in intact seeding by N⁶-benzylaminopurine and thidiazuron. Planta 186:384-389
- O'Brien TP and McCully ME** (1981) The study of plant structure: Principles and selected methods. Termarcarphi Pty. Ltd., Melbourne, pp344
- Sato S, Newell C, Kolacz K, Tredo L, Finer J and Hinchee M** (1993) Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. Plant Cell Rep 12:408-413
- Sellers RM, Southward GM and Phillips GC** (1990) Adventitious somatic embryogenesis from cultured immature zygotic embryos of peanut and soybean. Crop Sci 30:408-414
- Shatty K, Asano Y and Oosawa K** (1992) Stimulation of *in vitro* shoot organogenesis in *Glycine max* (Merrill) by allantoin and amides. Plant Sci 81:245-251
- Simmonds DH and Donaldson PA** (2000) Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of short-season soybean genotypes. Plant Cell Rep 19:485-490
- Sohn JK and Bae JS** (1995) Somatic embryogenesis and plant regeneration from *in vitro* cultured immature cotyledons of soybean. Kor J Breed 27:339-344
- White DWR and Voisey C** (1994) Prolific direct plant regeneration from cotyledons of white clover. Plant Cell Rep 13:303-308
- Wie Z and Xu Z** (1988) Plant regeneration from protoplasts of soybean (*Glycine max* L.). Plant Cell Rep 7:348-351
- Wright MS, Koehler SM, Hinchee MA and Carnes MG** (1986) Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max*. Plant Cell Rep 5:150-154
- Wright MS, Ward DV, Hinchee MA, Carnes MG and Kaufman RJ** (1987a) Regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merr.) from cultured primary leaf tissue. Plant Cell Rep 6:83-89
- Wright MS, Williams MH, Pierson PE and Carnes MG** (1987b). Initiation and propagation of *Glycine max* L. Merr.: Plants from tissue-cultured epicotyls. Plant Cell Tiss Org Cult 8:83-90
- Yang YS, Wada K and Futsuhara Y** (1990) Comparative studies of organogenesis and plant regeneration in various soybean explants. Plant Sci 72:101-108

(접수일자 2001년 12월 17일)