

## 녹두 줄기 조직배양에서 캘러스와 부정아 형성에 관한 세포조직학적 연구

박 종 범\*

신라대학교 생물학과

Received August 24, 2006 / Accepted October 24, 2006

**Cytohistological Study of Development of Callus and Adventitious Shoots from Cultured Stem of *Vigna radiata*.** Jong-Bum Park\*. Dept. of Biological Science, Silla University, Busan 617-736, Korea – This study was carried out to establish a reproducible culture system for callus formation and adventitious shoot development from young stem segments of *Vigna radiata*, and histological work for origin of callus tissue and adventitious shoot. Induction of callus from young stem explants of *Vigna radiata* was very effective on MS inorganic salts supplemented with 0.5 mg/L 2,4-D and 1.0 mg/L kinetin. For the adventitious shoot regeneration from the callus tissues, the hormone combination of 0.75 mg/L NAA, 1.5 mg/L kinetin and MS salts resulted in about 21% efficiency. Histological examination showed that callus tissues originated from out-growths by callus cambium rings with de novo meristematic activities, which were localized at the outside of the vascular cambium. Adventitious shoots were developed from shoot apical meristem originated from the surface of callus masses. The shoot apical meristem produced leaf primordium, which then became leaf.

**Key words** – *Vigna radiata*, adventitious shoot, organogenesis, tissue culture

식물 조직배양에 관한 연구기술이 확립되면서 여러 식물을 실험재료로 하여 조직배양을 통한 부정아와 부정근의 형성과 기원에 대한 연구가 많이 이루어졌다[3,5,21,39]. 특히 Sterling [33]이 담배 줄기 절편체를 배양하여 부정아를 분화시켰는데 그 기원이 형성층-외사부지역, 내사부지역, 캘러스의 3곳이라고 보고한 이후 기관분화와 그들의 기원에 관한 형태학적, 조직학적 연구가 이루어지게 되었다. 조직배양을 통해 형성된 캘러스조직에서의 부정아 분화는 캘러스내의 특정부위에 한정되어 있지 않고 무작위적으로 형성된다는 보고[7]가 있는 반면, 많은 연구자들은 부정아가 캘러스의 표면이나 그 근처의 세포들이 세포분열하여 하나의 분열조직군을 형성하면서 발생한다고 보고하였다[13,15,40]. 캘러스 조직에서의 부정근 분화에 대해서는 조직배양을 통해 이미 형성된 부정아의 영향을 받아 캘러스조직의 내부에서 뿌리가 형성된다고 보고한 연구결과[15,40]가 있는 반면 부정아에 영향을 받지 않고 특정한 배양조건에서 캘러스내의 특정 세포군이 분열하여 형성된 돌기들이 뿌리로 분화한다는 연구보고[34]도 있다. 이와같이 조직배양을 통한 기관분화에 있어서 부정아와 부정근의 기원 및 이들 두 기관의 발생과정에 대하여는 아직까지 정확하게 밝혀진 바 없다. 비록 조직배양을 통한 부정아와 부정근의 발생에 대하여 많은 연구결과가 보고[20,25]되었음에도 불구하고, 이러한 결과들이 서로 모순되는 상반된 결과들을 나타내고 있다. 이것은 거의 대부분의 연구들이 서로 다른 발생단계에 있는 다른 종들을 실험

재료로 사용하였으며 또한 매우 다른 실험조건에서 연구되었기 때문이다[16,19]. 특히 유관속 체계가 다른 부정아와 부정근이 캘러스 내의 각각 다른 지역에서 형성된 후 완전한 관속체계를 갖춘 소식물체로 분화하려면 캘러스 내에서 전이지역을 통해 부정아와 부정근의 관속체계가 연결되어야만 한다. 그러나 아직까지 캘러스 내에서 부정아와 부정근의 관속체계가 어떠한 과정을 통해 연결되는지 그 발생과정에 대하여는 전혀 보고된 바 없다.

경제적으로 매우 유용한 작물 중의 하나인 녹두(*Vigna radiata* W.)의 품종개량 및 생산성 향상을 위하여 조직배양을 이용한 유전학적, 세포학적, 생리화적인 연구가 필요하다. 녹두의 조직배양에 관한 연구는 식물체내에 이미 존재하고 있는 분열조직을 실험재료로 사용하여 이들 분열조직으로부터 직접 식물체 재생을 유도한 연구보고가 대부분이었는데, 이들 연구는 주로 발아된 녹두 종자의 shoot tip, 자엽, 자엽절, 배축 등을 재료로 사용하여 식물체 재생을 보고하였다[2,4,18,24,26,32,35]. 최근에는 녹두 종자의 자엽이나 배축을 배양하여 형성된 캘러스로부터 식물체 재생을 유도한 연구결과가 보고되었으며[1], 또한 자엽으로부터 체세포 배를 유도한 후 체세포 배로부터 식물체 재생을 유도한 연구결과도 보고되었다.[22]. 이처럼 녹두 조직배양에 관한 연구는 shoot tip, 자엽, 자엽절, 배축 등으로부터 직접 식물체 재생을 유도한 연구보고가 대부분이고 캘러스나 체세포 배로부터 유도된 기관 재분화에 의한 식물체 재생에 관한 연구보고는 최근 이루어지고 있다.

따라서 본 연구는 녹두 유식물체의 줄기를 조직배양하여 캘러스조직을 형성하고 이 캘러스조직으로부터 부정아의 분

**\*Corresponding author**

Tel : +82-51-999-5472, Fax : +82-51-999-5176

E-mail : jbpark@silla.ac.kr

화를 유도한 다음, 이러한 과정에서 나타나는 캘러스 형성과 부정아의 분화에 대한 기원을 세포조직학적으로 연구할 목적으로 실시하였다.

**재료 및 방법**

**식물재료**

시중에서 구입한 녹두(*Vigna radiata* W.)의 종자를 실험실 내에서 발아시킨 유식물체의 줄기를 실험재료로 사용하였다.

**캘러스 배양 및 기관분화**

녹두 유식물체의 줄기를 2% sodium hypochlorite 용액으로 10분간 표면살균하고 멸균수로 3-4회 세척시킨 후 무균대 내에서 2 mm 두께로 절단하여 MS고형배지에 치상한 후 25±1℃로 조절된 incubator에서 암배양하여 캘러스조직을 유도하였다. 유도된 캘러스조직은 약 4-5주 간격으로 새로운 MS배지에 계대배양하여 캘러스를 유지하였다. MS고형배지는 Murashige와 Skoog[28] 기본배지에 sucrose 30 g/L 와 식물호르몬을 첨가하여 pH를 5.6-5.8로 조절한 다음 agar 10 g/L를 첨가하여 121℃에서 15분간 고압멸균하여 사용하였다. MS배지에 첨가한 식물호르몬은 auxin으로는 2,4-D, IAA, NAA를, cytokinin으로는 kinetin과 BAP를 여러가지 농도로 조합하여 첨가하였다. 캘러스로부터 기관분화는 여러가지 종류의 식물호르몬이 여러가지 농도로 조합한 기관분화용 MS고형배지에서 부정아의 분화를 유도하였다. 실험에 사용한 각 배지마다 40개의 sample을 사용하였고 2번 반복 실험하여 평균치와 표준편차를 구하였다.

**세포조직학적 관찰**

녹두 유식물체 줄기 조직편을 배양한 후 12시간, 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 72시간, 5일, 7일동안 배양된 캘러스조직과 배양 1주 후, 2주 후, 3주 후, 4주 후 캘러스로부터 분화된 부정아를 각각 FAA (formalin: acetic acid: ethyl alcohol; 1:0.5:5, v/v/v)고정액으로 12시간 실온에서 고정시킨 후 alcohol 상승농도 순서로 탈수하고 xylen으로 치환한다. Xylen치환된 조직을 순수 paraffin으로 침투, 매물시켜서 rotary microtom으로 10 μm 두께로 절단하여 hemalum과 safranin 염색액으로 이중염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

**결 과**

**캘러스 유도 및 기관분화**

녹두 유식물체 줄기 조직편을 배양하여 캘러스 조직과 부정아 등 기관분화를 유도하기 위하여 MS배지에 여러 가지 농도로 조합한 식물호르몬을 첨가하였다. 캘러스 조직을 유

도하기 위하여 배지에 첨가한 식물호르몬 중 auxin으로는 2,4-D (0.5 mg/L)가 IAA나 NAA보다 캘러스 형성에 더 효과적이었고, cytokinin으로는 kinetin (1.0 mg/L)이 BAP (1.0 mg/L)보다 훨씬 더 효과적이었다(Fig. 1). 녹두 유식물체 줄기 조직편을 0.5 mg/L 2,4-D와 1.0 mg/L kinetin이 첨가된 MS배지에서 배양하였을 때 배양 2-3일 후부터 줄기 절편이 부풀기 시작하여 배양 4-5일 후부터 캘러스 조직이 유도되었다. 반면에 캘러스로부터의 기관분화를 유도하기 위하여 배지에 첨가한 식물호르몬 중 auxin으로는 NAA (0.5 mg/L)가 IAA나 2,4-D보다 훨씬 더 효과적이었고, cytokinin으로는 kinetin (1.0 mg/L)이 BAP 보다 효과적 이었다(Fig. 2). MS배지에 첨가된 여러 가지 식물호르몬 중 기관분화에 효과적인 것으로 나타난 NAA와 kinetin을 여러 가지 농도로 세분하여 MS배지에 첨가하였다. MS배지에 1.0 mg/L kinetin을 기본 농도로 첨가 한 후 여러 가지 농도의 NAA를 첨가한 결과, 0.75 mg/L 농도의 NAA를 첨가한 배지가 가장 효과적이어서 약 17%의 기관형성율을 나타내었다(Fig. 3). 이러한 결과를 바탕으로 MS배지에 0.75 mg/L NAA를 기본농도로 첨가한 후 여러 가지 농도의 kinetin을 첨가한 결과, 1.5 mg/L

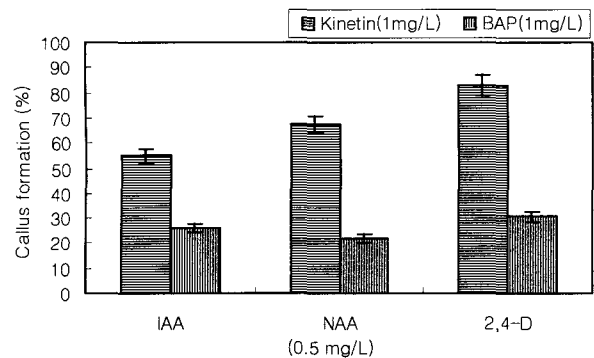


Fig. 1. Effects of various auxin and cytokinin combination on callus formation from young stem of *V. radiata* after four weeks of culture.

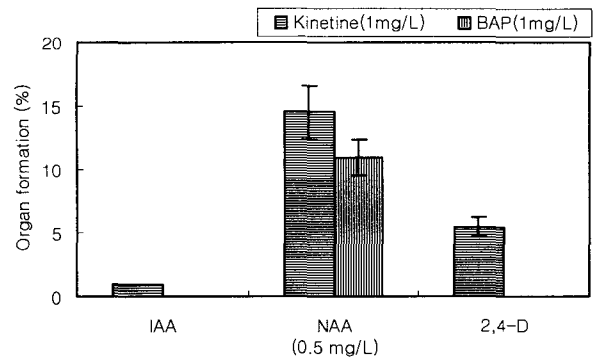


Fig. 2. Effects of various auxin and cytokinin combination on organ formation from young stem of *V. radiata* after four weeks of culture.

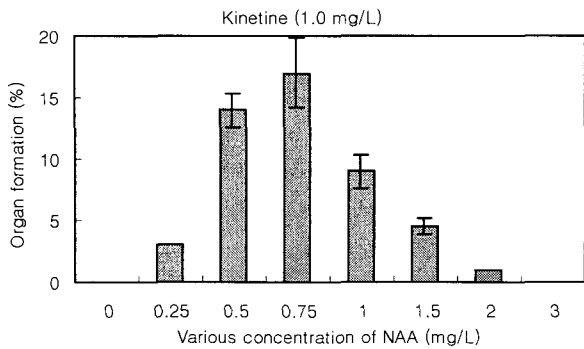


Fig. 3. Effects of various concentrations of NAA on organ formation from young stem of *V. radiata* after four weeks of culture.

농도의 kinetin을 첨가한 배지가 가장 효과적이었다. 따라서 캘러스로부터의 기관분화에는 0.75 mg/L NAA와 1.5 mg/L kinetin이 첨가된 배지가 약 21%의 높은 기관형성율을 나타내어 이 배지가 가장 효과적인 기관분화 배지임을 알 수 있었다(Fig. 4).

**캘러스 형성 기원**

녹두 유식물체 줄기 조직편을 0.5 mg/L 2,4-D와 1.0 mg/L kinetin이 첨가된 MS배지에서 배양하였을 때 배양 4-5일 후부터 캘러스 조직이 유도되어 약 4주 후에는 캘러스 조직 형성이 왕성하였다. 녹두 유식물체 줄기 조직편과 캘러스조직을 배양 후 12시간 간격으로 조직을 절단하여 현미경 관찰한 결과, 배양 12시간 후 정상 줄기의 내부구조(Fig. 5A)에 비해 주로 유관속의 사부 위쪽 부위에 위치한 피층 유조직세포가 신장, 확대되었으며, 배양 24시간 후에는 이렇게 신장된 피층 유조직세포 일부가 평측 또는 수축분열하여 분열세포화되면서 점차 서로 연결되기 시작하였다. 배양 36시간 후에는 유관속 바깥부위에서 이들 분열세포들끼리 서로 연결되어 새로운 전형성층을 만들어 캘러스 형성층환을 형성하였다(Fig. 5B). 배양 48시간 후에는 유관속 바깥부위에 새로이 형성된 캘러스 형성층환이 분열하여 군데군데 meristemoid를 형성하였다(Fig. 5C). 이 시기에는 유관속의 사부 유조직도 신장되어 피층 바깥부위로 밀려나오면서 세포분열하였고 유관속 조직세포 및 안쪽의 수 조직도 분열하여 줄기 절편의 거의 모든 조직이 분열세포화되는 것이 관찰되었다. 배양 60시간 후에는 이들 meristemoid가 계속 분열하여 캘러스조직이 유도되기 시작하여(Fig. 5D) 배양 72시간 즉 3일 후에는 캘러스조직이 왕성하게 형성되었으며(Fig. 5E), 배양 5일 후에는 캘러스 조직 중에 가도관이 존재하는 meristematic nodule이 형성되었다(Fig. 5F).

**부정아 형성 기원**

녹두 유식물체 줄기 조직편을 0.75 mg/L NAA와 1.5

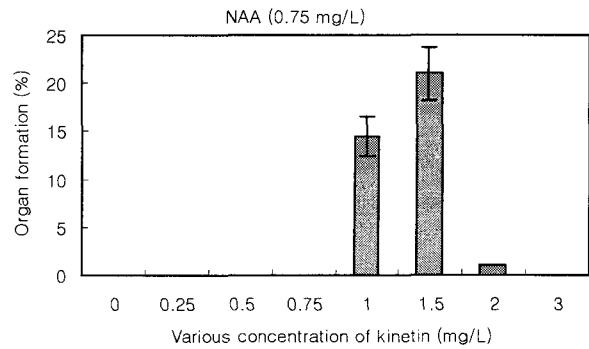


Fig. 4. Effects of various concentrations of kinetin on organ formation from young stem of *V. radiata* after four weeks of culture.

mg/L kinetin 이 첨가된 MS배지에서 배양하였을 때 배양 약 2주 후부터 캘러스조직 표면으로부터 하얀색의 작은 돌기들이 관찰되었으며, 약 4주 후에는 이러한 돌기가 부정아로 분화하여 약 6주 후에는 정상적인 shoot가 관찰되었다(Fig. 6A). 캘러스조직으로부터 분화된 부정아 형성과정을 배양 후 1주일 간격으로 조직을 절단하여 관찰한 결과, 배양 2주 후 캘러스 조직 외부에서 형성된 meristematic nodule로부터 부정아 시원세포가 발생한 후 이들 세포가 부정아 정단분열조직으로 분화되었으며, 이로부터 엽원기가 발생되어 줄기와 잎이 형성되었다 (Fig. 6B-D).

**고 찰**

식물 조직배양에서 형성된 캘러스로부터 부정아나 부정근을 발생시키는 것은 배지에 첨가된 식물호르몬인 auxin과 cytokinin의 비율에 따라 달라진다[12]. Kinetin은 세포분열을 촉진시켜 주는데 여기에 적정농도의 auxin이 첨가되면 세포분열뿐만 아니라 세포분화도 촉진시켜 준다고 알려져 있다[6]. 그러나 cowpea같은 콩류 작물은 배지에 다양한 auxin-cytokinin 비율을 첨가하여도 부정아 분화가 잘 일어나지 않은 것으로 보고되었다[14]. 녹두 유식물체 줄기의 조직배양에서 얻어진 캘러스로부터의 기관분화에는 21%의 기관형성율을 나타낸 0.75 mg/L NAA와 1.5 mg/L kinetin를 첨가한 MS배지가 효과적인 기관분화배지였다. 강낭콩 조직배양에서 2,4-D는 캘러스의 성장에는 매우 효과적이었으나 캘러스로부터 기관분화에는 별로 효과적이지 못한 반면에[8], NAA(10 mg/L)와 kinetin(10 mg/L)이 첨가된 배지가 부정근의 형성에 효과적이었다[9]. 또한 콩(*Glycine max*)의 조직배양에서는 NAA(10.75 μM)와 kinetin(2.33 μM)이 첨가된 MS배지가 캘러스로부터의 기관분화에 매우 효과적인 것으로 보고되었다[11]. 발아된 녹두 종자의 shoot tip을 5x10<sup>-6</sup> M의 cytokinin(BA, kinetin, zeatin)이 첨가된 BM배지에서 배양하면 많은 부정아가 유도되었는데, 부정아 유도에 요구되

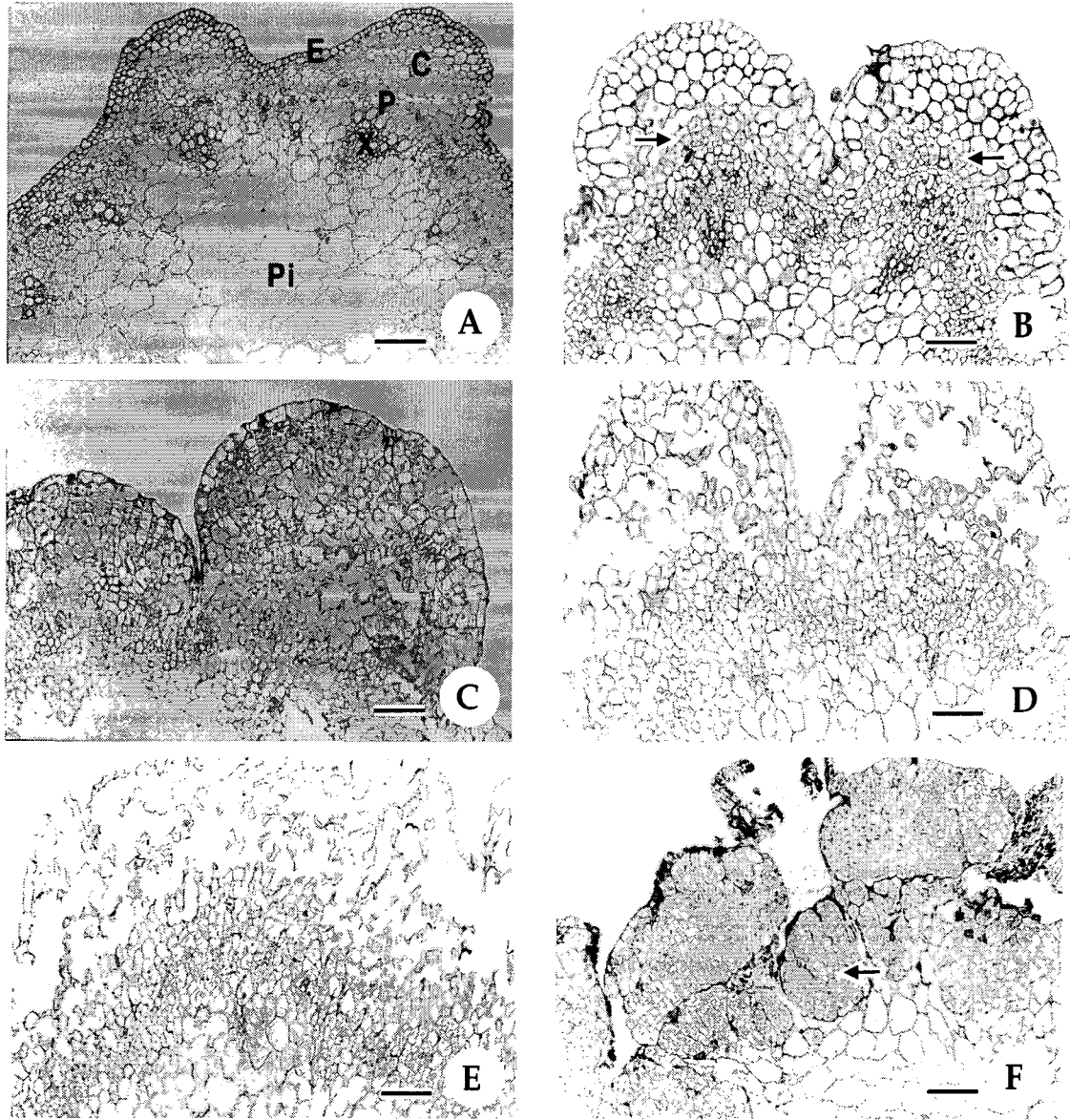


Fig. 5. Transverse sections of cultured stem and calli in various developmental stages. A: Internal structure of control stem. B: Callus cambium ring (arrow) formed after 36 h of culture C: Meristemoid formed after 48 h of culture. D: Callus tissue initiated from meristemoid after 60 h of culture. E: Callus tissue formed after 72 h of culture. F: meristematic nodules formed after 5 days of culture. Arrow is tracheid. C, cortex; E, epidermis; P, phloem; Pi, pith; X, xylem. Scale bar = 100  $\mu$ m

는 식물 호르몬의 농도는 shoot tip의 크기에 따라 다양하였으며[17], 또한 녹두 자엽을 8.9  $\mu$ M BA가 첨가된 MS배지에서 배양하여 부정아를 재생한 연구보고도 있다[26]. 한편 발아 3일된 녹두 종자의 자엽과 배축을 NAA(1.07  $\mu$ M), BA(8.88  $\mu$ M), 10% 코코넛액 및 BA(6.66  $\mu$ M), thidiazuron (TDZ, 2.5  $\mu$ M), 10% 코코넛액이 첨가된 MS배지에서 각각 배양하여 캘러스를 유도한 후 이 캘러스로부터 부정아를 재생하였다[1]. 최근에는 녹두 자엽절을 비 퓨린계로 cytokinin과 같은 활성을 가진 물질인 TDZ를 저농도(1.0  $\mu$ M)로 첨가한 N<sub>6</sub>배지에서 배양하였을때, 10  $\mu$ M BAP를 첨가한 배지에서 보다 부정아 유도에 더 효과적인 결과를 얻었음을 보고하

였다[27]. 캘러스로부터의 기관분화는 당과 auxin이 첨가되지 않은 배지에서는 전혀 일어나지 않았고 또한 배양기간 동안 광선을 조사하면 부정아 형성이 매우 감소하였으며[23, 29], 배지속에 kinetin이 첨가되지 않아도 부정아 형성이 매우 감소되었다[31]. 한편 IAA와 kinetin이 첨가된 배지속에 alkaloid인 nicotine(50 mg/mL)을 더 첨가하면 캘러스로부터 부정아 형성이 현저하게 증가한 보고도 있다[31].

배양된 줄기 절편으로부터의 캘러스 형성은 줄기 절편 유관속 부위의 피층 유조직세포와 표피세포가 신장, 확대되어 분열세포화한 후, 서로 연결되어 캘러스 형성층세포를 형성하여 캘러스 유도가 이루어지게 되고 이와 거의 동시에 줄기

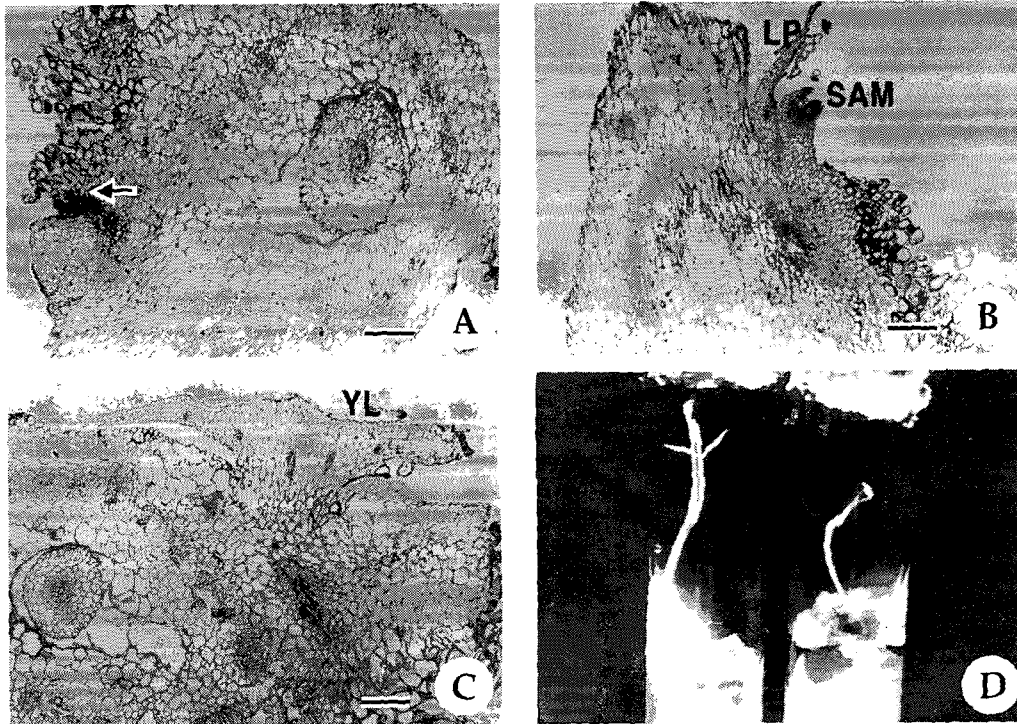


Fig. 6. Transverse and longitudinal sections of adventitious shoots in various developmental stages. A: Adventitious shoot initial cells (arrow) initiated from meristematic nodule. B: Shoot apical meristem (SAM) and leaf primordium (LP) formed after 2 weeks of culture. C: Young leaf (YL) initiated from leaf primordia. D: Adventitious shoots produced from callus after 6-weeks of culture. Scale bar = 100  $\mu$ m

절편의 유관속과 수를 포함한 거의 모든 조직세포가 분열세포화되어 캘러스조직을 형성하게 된다. 캘러스 조직의 분열이 왕성하게 일어나게 되면 세포분열이 완료된 세포들 중 일부가 가도관을 형성하게 되고 이 주위에는 형성층 같은 세포들의 무리인 meristematic nodule이 형성되는데, 캘러스내에서 meristematic nodule은 무작위적으로 산재되어 존재하고 있다[30]. 캘러스조직으로부터의 부정아 형성은 부정아 시원세포가 분화되어 형성된 부정아 정단분열조직으로부터 발생되어 나오는데, 이러한 부정아 시원세포의 기원은 캘러스의 외부부의 meristemoid에서 가도관이 형성된 후 군데군데 형성층이 산재된 meristematic nodule로부터 발생되었다[10].

있는 부정아 정단분열조직으로부터 발생한 엽원기로부터 형성되었다. 이상의 결과를 간단히 요약하면, 녹두 유식물체 줄기로부터의 캘러스 형성과 부정아 발생은 탈분화과정(분열조직화 과정), 부정아 정단분열조직 형성과정, 엽원기 형성과정으로 구분짓을 수 있다. 이러한 결과는 *Vitis* 와 *Muscadinia*의 잡종 잎을 조직배양하였을 때 형성된 부정아를 조직학적으로 연구한 결과, 절단된 엽병의 피층 바깥의 유조직세포가 신장, 분열하여 캘러스를 형성하고 이 캘러스로부터 전분열조직과 meristematic nodule이 형성된 후 나중에 부정아 분열조직과 엽원기가 발생되었다는 연구보고와 거의 일치한 결과이다[36]. 또한 식물조직배양에서 형성된 캘러스로부터의 부정아 분화는 캘러스 표면 근처에 형성된 meristematic

nodule로부터 분화되었고, 뿌리는 캘러스 내부에 형성된 meristematic nodule로부터 분화된다는 보고도 있다[15,38,40]. 녹두 자엽을 BA가 첨가된 MS배지에서 배양하여 재생된 부정아를 조직학적 연구와 주사전자현미경으로 관찰한 결과, meristematic nodule은 배양 48시간 후 유도되었으며, shoot primordia는 2개의 nodule로 구성되어 있음이 보고되었다[26].

캘러스에 형성된 meristematic nodule들은 shoot로도 분화할 수 있고 뿌리로도 분화할 수 있는데[37], 어떠한 배양조건에서 특정 분열군이 shoot로 또는 뿌리로 분화가 이루어지는지 그 분화과정을 생리적 또는 생화학적 측면에서 연구, 보고된 것은 거의 없다. 그 이유는 이러한 연구를 수행하는데 있어서 적당한 실험체계가 확립되어 있지 못한데 있다. 조직배양 결과 형성된 캘러스조직에서 기관형성 과정에 관련되는 세포는 극히 일부에 지나지 않기 때문에 이러한 조직만을 캘러스에서 용이하게 분리해 낼 수 없는 문제점이 있고, 또 기관 분화시 shoot와 뿌리가 동시에 발생하지 않으므로 캘러스의 유용도가 낮아진다는 문제점이 있기 때문이다. 정확하게 어떠한 요인이 작용하여 meristematic nodule을 특정기관으로 분화시키는지 아직 밝혀지지 않았으나 본 실험 결과 캘러스에서 무작위적으로 형성된 meristematic nodule 중 캘러스의 외부부위에 존재하는 meristematic nodule에서 부정아 정단분열조직이 형성되어 부정아로 발생함을 알 수 있었다.

## 요약

녹두 유식물체 줄기를 조직배양하여 캘러스조직을 형성하였고 이로부터 부정아 형성을 유도한 다음, 캘러스 조직과 부정아 분화에 대한 기원을 조직해부학적으로 연구하였다. 녹두 줄기절편으로부터 캘러스조직의 유도는 0.5 mg/L 2,4-D와 1.0 mg/L kinetin이 첨가된 MS배지가 효과적이었고, 캘러스로부터의 부정아 분화에는 0.75 mg/L NAA와 1.5 mg/L kinetin이 첨가된 MS배지가 매우 효과적이어서 약 21%의 기관형성율을 나타내었다. 캘러스 조직을 조직학적으로 관찰한 결과, 캘러스조직은 유관속 형성층 외측에 새롭게 형성된 분열능력이 있는 캘러스 형성층환이 바깥쪽으로 생장을 함으로써 유도되었다. 부정아는 캘러스 조직의 외부 표면부위에서 기원된 부정아 정단분열조직으로부터 발생되었다. 부정아 정단분열조직은 엽원기를 형성하여 나중에 잎이 발생되었다.

## 참고 문헌

- Amutha, S., A. Ganapathi and M. Muruganatham. 2003. *In vitro* organogenesis and plant formation in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **71**, 203-207.
- Amutha, S., M. Muruganatham and A. Ganapathi. 2006. Thidiazuron-induced high-frequency axillary and adventitious shoot regeneration in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **42**, 26-30.
- Attfield, E. M. and P. K. Evans. 1991. Stages in the initiation of root and shoot organogenesis in the cultured leaf explants of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. *J. of Experimental Bot.* **42**, 59-63.
- Bajaj, Y. P. S. and H. Singh. 1980. *In vitro* induction of androgenesis in mung bean (*Phaseolus aureus*). *Indian J. Exp. Biol.* **18**, 1316-1318.
- Baraldi, R., F. Rossi and B. Lercari. 1988. *In vitro* shoot development of *Prunus* GF 655-2: interaction between light and benzyladenine. *Physiol. Plant.* **74**, 440-443.
- Boulter, D. and O. J. Crocorno, 1979. Plant cell culture implications: Legumes, pp. 614-631, In Sharp, W. R., P. O. Larsen, E. F. Paddock, V. Raghavan, (eds.), *Plant Cell and Tissue Culture*, Ohio State University Press, Columbus.
- Cheng, T. Y. 1975. Adventitious bud formation in culture of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* Mirb. Franco). *Plant Sci. Lett.* **5**, 97-102.
- Crocorno, O. J., J. E. Peters and W. R. Sharp. 1976a. Plantlet morphogenesis and the control extract. *Z. Pflanzenphysiol.* **78S**, 456-460.
- Crocorno, O. J., J. E. Peters and W. R. Sharp. 1976b. Interactions of phytohormones on the control of growth and root morphogenesis in cultured *Phaseolus vulgaris* leaf explants. *Turrialba* **26**, 232-236.
- Echenique, V., P. Polci and L. Mroginski. 1996. Plant regeneration in weeping lovegrass, (*Eragrostis curvula*) through inflorescence culture. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **46**, 123-130.
- Evans, D. A., W. R. Sharp and E. F. Paddock. 1976. Variations in callus proliferation in leaf tissue cultures of *Glycine max* strain T219. *Phytomorphology* **26**, 379-381.
- Flick, C. E., D. A. Evans and W. R. Sharp. 1983. Organogenesis, pp 13-81 In Evans, D. A. W. R. Sharp, P. V. Ammirato and Y. Yamada (eds.), *Handbook of Plant Cell Culture*. Vol. 1, Macmillan Publishing Co., New York.
- Geneve, R. L. 1991. Patterns of adventitious root formation in English ivy. *J. Plant Growth Regul.* **10**, 215-220.
- Gill, R., S. Eapen and P. S. Rao. 1987. Callus induction from protoplasts of *Vigna unguiculata*, *V. sublobata* and *V. Mungo*. *Theor. Appl. Genet.* **74**, 100-103.
- Gladfelter, H. J. and G. C. Phillips. 1987. De novo shoot organogenesis of *Pinus eldarica* Medw. in vitro. I. Reproductive regeneration from long-term callus cultures. *Plant Cell Rep.* **6**, 163-166.
- Gonzalez, A., A. Casares, T. R. Sanchez and R. Rodriguez. 1991. Adventitious root induction in *Corylus avellana* L. cotyledon slices. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **27**, 125-131.
- Gulati, A. and P. K. Jaiwal. 1992. *In vitro* induction of multiple shoots and plant regeneration from shoot tips of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* **29**, 199-205.
- Gulati, A. and P. K. Jaiwal. 1994. Plant regeneration from cotyledonary node explants of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Plant Cell Rep.* **13**, 523-527.
- Haissig, B. E. 1986. Metabolic processes in adventitious rooting of cuttings, pp. 142-189, In Jackson, M. B. (ed.), *New Root Formation in Plant and Cuttings*, Martinus Nijhoff Publishers, Boston.
- Haissig, B. E. 1988. Future directions in adventitious rooting research, pp. 302-310, In Davis, T. D., B. E. Haissig and N. Sankhla (eds.), *Adventitious Root Formation in Cutting*, Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- Hicks, G. S. 1987. Adventitious rooting of apple micro-cuttings in vitro: an anatomical study. *Can. J. Bot.* **65**, 1913-1920.
- Kaviraj, C. P., G. Kiran, R. B. Venugopal, P. B. Kavikishor and S. Rao. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledonary explants of green gram (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)-a recalcitrant grain legume. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **42**, 134-138.
- Liau, D. F. and W. G. Boll. 1970. Callus and cell suspension culture of bush bean (*Phaseolus vulgaris*). *Can. J. Bot.* **48**, 1119-1130.
- Mathews, H. 1987. Morphogenetic responses from in vitro cultured seedling explants of mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **11**, 233-240.
- McCown, B. H. 1988. Adventitious rooting of tissue cultured plants, pp. 289-302, In Davis, T. D., B. E. Haissig and N. Sankhla (eds.), *Adventitious Root Formation in Cutting*, Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- Mendoza, A. B., K. Hattori, T. Nishimura and Y.

- Futsuhara. 1993. Histological and scanning electron microscopic observations on plant regeneration in mung-bean cotyledon (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) cultured *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **32**, 137-143.
27. Mundhara, R. and A. Rashid. 2006. Recalcitrant grain legume *Vigna radiata*, mung bean, made to regenerate on change of hormonal and cultural conditions. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **85**, 265-270.
  28. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.
  29. Olieman-van der Merr, A. W., R. L. M. Pierik and S. Ruest. 1971. Effects of sugar, auxin, and light on adventitious root formation in isolated stem explants of *Phaseolus* and *Rhododendron*. *Meded. Fac. Landbouwwet Rijksuniversiteit Groningen*. **36**, 511-518.
  30. Perez-Frances, J. F., F. Valdes and R. Martin. 1995. Callus induction and culture from explants of *Erysimum scoparium* in a growth regulator-free medium. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **43**, 223-228.
  31. Peters, J. E., O. J. Crocomo and W. R. Sharp. 1976. Effects of caffeine and nicotine on the callus growth and root morphogenesis of *Phaseolus vulgaris* tissue cultures. *Turrialba*. **86**, 337-341.
  32. Sen, J. and S. Guha-Mukherjee. 1998. *In vitro* induction of multiple shoots and plant regeneration in *Vigna*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* **34**, 276-280.
  33. Sterling, C. 1951. Origin of buds in tobacco stem segments cultured *in vitro*. *Amer. J. Bot.* **38**, 761-767.
  34. Steward, F. C., M. O. Mapes and K. Mears. 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Amer. J. Bot.* **45**, 705-708.
  35. Tivareker, S. and S. Eapen. 2001. High frequency plant regeneration from immature cotyledons of mung bean. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **66**, 227-230.
  36. Torregrosa, L. and A. Bouquet. 1996. Adventitious bud formation and shoot development from *in vitro* leaves of *Vitis X Muscadinia* hybrids. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **45**, 245-252.
  37. Torrey, J. G. 1966. The initiation of organized development in plants, pp. 39-91, In Abercrombie, M. and J. Brachet (eds.), *Advances in Morphogenesis*, Vol. **5**, Academic Press, New York.
  38. Villalobos, V. M., E. C. Yeung and T. A. Thorpe. 1985. Origin of adventitious shoots in excised *Radiata pine* cotyledons cultured *in vitro*. *Can. J. Bot.* **63**, 2172-2176.
  39. Voesenek, L. A. C. J., C. W. P. M. Blom and R. H. W. Pouwels. 1989. Root and shoot development of *Rumex* species under waterlogged conditions. *Can. J. Bot.* **67**, 1865-1869.
  40. Wagley, L. M., H. J. Gladfelter and G. C. Phillips. 1987. De novo shoot organogenesis of *Pinus eldarica* Medw. *in vitro*. II. Macro- and micro-photographic evidence of de novo regeneration. *Plant Cell Rep.* **6**, 167-171.