

망두릅의 체세포배로부터 2차배 발생과 식물체 재생에 미치는 사이토카이닌의 영향

이종천 · 소웅영*
전북대학교 생물과학부

Effects of Cytokinins on Secondary Embryogenesis and Plant Regeneration from Somatic Embryos of *Aralia cordata* Thunb.

LEE, Jong Chon · SOH, Woong-Young*

Department of Biological Science, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea

ABSTRACT Embryogenic suspension cultures were initiated using embryogenic callus from immature inflorescence explants (*Aralia cordata* Thunb.) cultured on solid MS medium containing 1 mg/L 2,4-D for 8 weeks and then the embryogenic callus was proliferated in liquid MS medium containing 1 mg/L 2,4-D. After sieving the suspensions (pore size 270 μ m), embryogenic cells were cultured in liquid MS medium with cytokinins (kinetin, BA, zeatin) for two weeks. When the embryogenic cells were transferred to liquid MS basal medium, primary somatic embryos were developed after 5 weeks of culture. Secondary embryos were developed directly from the primary torpedo and cotyledonary embryos cultured in solid MS basal medium. Frequency of secondary embryogenesis was higher on medium containing 2 mg/L kinetin than the other cytokinins. Plant regeneration was highly recorded by placing secondary cotyledonary embryos induced from primary cotyledonary embryos in MS medium containing 2 mg/L kinetin or 2 mg/L zeatin (25.4% and 28.6%, respectively). The plant regeneration from secondary embryos was prohibited by tertiary embryogenesis.

Key words: Gemination, primary, solid medium, somatic embryo

서 론

배발생 캘러스의 현탁배양으로 유도된 체세포배는 식물체로 쉽게 재생될 수 있으며 체세포배의 성숙 및 발아과정에서 2차배가 발생하는 경우도 보고되어 왔다 (Lee et al 1998). 대체로 2차배는 1차배의 발아 및 식물체로의 재생과정에서 저농도로 나타나기도 하지만 2차배를 이용한 식물체 재생 (Durham and Parrott 1992), 높은 효율의 대량증식 (Raj et al. 1990), 형질전환 (Raemakers et al. 1997) 등 여러 가지로

이용될 수도 있다.

2차배 발생을 유도하기 위하여 오옥신 (Raemakers et al. 1993a, b,) 및 사이토카이닌 처리 (Maheswaran and Williams 1986b, Lee and Soh 1993), 온도처리, 서당 및 한천 농도 변화 등 많은 시도가 있었다 (Tulecke 1987).

*Brassica napus*에서는 고농도의 kinetin을 처리하면 2차배 발생이 억제되었으나 (Loh et al. 1983) 토끼풀에서는 고농도의 BAP를 처리하여 2차배 발생을 유도할 수 있었다 (Maheswaran and Williams 1986a). 또 토마토 (Young 1987)와 *Brassica campestris* (Maheswaran and Williams 1986b)에서는 저농도의 BAP처리 배지에서 2차배가 발생되었다. 이와 같이 사이토카이닌의 농도와 재료식물에 따라 2차배의 발생여부가 달라진다는 것을 알 수 있다.

* Corresponding author. Tel 063-270-3353
E-mail sohwy@moak.chonbuk.ac.kr

싸이토키닌을 첨가한 액체배지에서 땅두릅의 배발생 세포괴와 구상배로부터 2차배의 형성에 대한 단편적인 연구는 이미 보고된 바 있으나 (Lee and Soh 1993) 싸이토키닌의 처리로 세포괴로부터 1차 체세포배의 발생, 1차배로부터 2차배의 형성 및 이로부터 3차배의 유도과 식물체 재생에 대한 상호관련성에 대한 연구는 발표된 것이 없다. 따라서 본 연구는 배발생 세포괴에 싸이토키닌을 처리하여 1차배를 유도하고, 이를 고체배지에 배양하여 2차배의 형성과정을 조사하며 아울러 3차배의 형성이 식물체 재분화에 어떤 영향을 미치는지를 구명하고자 시도되었다.

재료 및 방법

실험재료 및 캘러스 유도

실험재료인 땅두릅 (*Aralia cordata* Thunb.)은 전북대학교 생물학과 온실옆 노지에서 채취하여 미성숙 화기절편을 실험재료로 사용하였다. 절편을 70% 에탄올에 1분, 그리고 Tween-20을 2~3방울을 넣은 1% sodium hypochlorite 용액에 약 10분간 침적시켜 표면살균한 다음 멸균수로 3~4 회 씻어서 사용하였다. 배지는 MS 기본배지 (Murashige and Skoog, 1962)에 sucrose 3%, 한천 8%, 1 mg/L 2,4-D를 첨가하여 pH를 5.8로 조절한 후, 121°C, 1.5기압하에서 15분간 멸균시켜 사용하였으며 이 배지를 1회용 petridish (87mm×15mm)에 25mL씩 분주하였다. 각각의 petridish에 16개 절편을 치상하여 온도 25°C, 빛 46 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 냉백색형광등 조명으로 16/8 시간의 광주기하에서 배양하였다. 8주간 배양 후 배발생 캘러스를 선발하여 체세포배 발생실험에 사용하였다.

현탁배양 및 1차 체세포배 발생

짙은 노란색의 배발생능 캘러스가 1 mg/L 2,4-D를 첨가한 MS 고형배지에서 형성되었고 이 캘러스를 같은 조건의 액체 배지를 20 mL 넣은 100 mL 삼각플라스크에 옮겨 배양하였다. 이 배발생능 캘러스의 현탁배양은 110 rpm으로 회전진탕시켰으며 캘러스 유도조건과 같은 조건하에서 2주 마다 계대 배양하여 10개월 동안 유지하였다. 본 실험을 위하여 배발생능 캘러스를 100 및 200 μm stainless 걸름체로 이중여과하여 크기를 균일하게 하였고 여기에서 얻은 배발생능 세포는 10 분간 가라앉힌 다음 동일배지에서 4주간 증식시켰다. 증식된 배발생능 세포는 MS 기본 배지에서 1주일간 배양시켰으며 그 후 270 μm 거름체로 여과시켜 실험재료로 사용하였다. 배양밀도는 싸이토키닌 (1~2 mg/L kinetin, BA 및 zeatin)을 첨가시킨 MS 기본배지 20 ml을 넣은 100 ml 삼각플라스크에 배양세포 0.2 ml (packed cell volume)을 넣어 2주간 배양시

켰다. 그 후 액체 MS 기본배지에 5주간 배양하여 1차 체세포배를 얻었다.

2차 및 3차 체세포배 형성과 식물체 재생

배발생 세포에 싸이토키닌을 처리하여 1차 체세포배를 얻었고 이 중에서 어뢰형배와 자엽형배는 2차 체세포배를 유도하기 위하여 고체 MS 기본배지가 들어있는 1회용 petridish에 각각 16개씩 치상하였다. 각 처리당 4반복하였고 위 실험을 3번 수행하였다. 2차배가 형성된 빈도는 1차배의 치상 3주 후 관측하였고 체세포배 절편당 형성된 2차배의 수를 5주 후에 관측하였다.

1차 어뢰형 및 자엽형배에서 유도된 2차 어뢰형배 및 자엽형배를 분리하여 이를 MS 기본 고체배지에 치상하였다. 4주 후 3차배의 형성을, 7주 후 식물체 재생을 관측하였는데 자엽이 녹색이고 뿌리가 신장되며 1차 잎이 형성된 것을 식물체로 재생된 것으로 판정하였다.

결 과

1차배 발생

배발생능 세포를 여러 가지 종류의 싸이토키닌 (kinetin, BA, zeatin)을 처리한 MS배지에서 2주간 배양한 후 MS 기본 배지에서 5주간 배양하여 1차배 발생을 유도하였다 (Table 1). 그 결과 1 mg/L kinetin에서 가장 많은 체세포배를 얻을수 있었고 (약 6100개) 다음으로 1 또는 2 mg/L BA 순이었다 (각각 5800개, 5100개). kinetin과 BA를 처리하였을 때 대조구에 비하여 많은 배를 얻을수 있었으나 zeatin을

Table 1. Effects of cytokinins on primary somatic embryogenesis from embryogenic suspensions of *Aralia cordata*.

Cytokinins (mg/L)	Mean no. of embryos/flask (%)
Control	4657 ± 61.85e(100.0)
kinetin 1.0	6166 ± 80.42a(132.4)
kinetin 2.0	4844 ± 52.13d(104.0)
BA 1.0	5811 ± 76.28b(124.8)
BA 2.0	5154 ± 48.73c(110.7)
zeatin 1.0	1730 ± 31.54g (37.2)
zeatin 2.0	2929 ± 46.13f (62.9)

Embryogenic cells were cultured in MS liquid medium containing cytokinins for 2 weeks and then the cells were cultured in MS liquid basal medium for 5 weeks. Means with different letters represent significantly different means ($p < 0.01$) using Duncan's multiple range test.

처리하였을때에는 대조구보다 오히려 적은 배를 얻었다.

유도된 1차배를 발생단계별로 구분해 볼 때 (Table 2) 대조구에서는 구상배의 비율이 높고 (89.0%) 자엽형배는 낮았다 (1.4%). 그러나 2 mg/L와 1 mg/L zeatin를 처리한 경우 자엽형배의 비율은 대조구보다 높았고 (각각 45.3%, 34.5), 1 mg/L와 2 mg/L kinetin 처리에서는 대조구보다 높았으나 (각각 15.2%, 11.7%) zeatin처리의 경우보다는 낮았다. BA 처리에서도 자엽기배로의 성숙율이 대조구보다 높았다. 결과적으로 싸이토키닌 (kinetin과 BA)을 처리하였을 때에는 1차배의 발생과 자엽형배의 비율이 높아짐을 확인할 수 있었다.

3차배의 발생

배발생능 세포는 싸이토키닌이 첨가된 MS 배지에서 2주간 배양하였고 그후MS 기본배지에서 5주간 배양하여 1차 체서 포배를 얻었는데 그중에서 어뢰형배와 자엽형배를 선발하여 MS 고형배지에서 3주간 배양하여 2차배의 발생 빈도를 그리고 5주간 배양하여 발생된 수를 측정하였다 (Table 3, Figure 1A).

그 결과 2차배는 주로 1차배의 자엽과 하배축에서 형성되었으며 발생빈도는 어뢰형배를 치상하였을때 1과 2 mg/L

kinetin, 1 mg/L BA, 1 mg/L zeatin 첨가배지에서 배발생 빈도가 대조구에 비하여 높게 나타났고 자엽형배의 경우에서도 위의 배지조건에서 대조구보다 높았다. 전반적으로 자엽형배는 어뢰형배보다 배발생 빈도가 높았다. 한편 1차배 절편당 형성된 2차배의 발생수를 측정하였을 때 어뢰형배의 경우 대부분의 싸이토키닌 처리조건에서 대조구보다 많은 배를 얻었으며 자엽형배의 경우 모든 처리조건에서 대조구보다 많은 2차배를 얻었다.

3차배 형성과 식물체 재생

1차배로부터 발생된 어뢰형 및 자엽형 2차배를 분리하여 MS 기본 고형배지에 옮겨서 4주간 배양하여 3차배의 형성을 (Table 4) 그리고 7주간 배양하여 식물체 재생을 측정하였다 (Table 5, Figure 1B). 1차배로부터 2차배가 형성되는 것과 2차배로부터3차배가 발생되는 형태는 동일하였는데 3차배의 형성율이 대조구에 비하여 높은 것은 대표적으로 2 mg/L BA

Table 2. Effects of cytokinins on development of somatic embryos from cell cultures of *A. cordata* for 2 weeks. Somatic embryos were counted after 5 weeks of culture in MS basal liquid medium.

Cytokinins (mg/L)	kinetin		BA		zeatin		
	0.0	1.0	2.0	1.0	2.0	1.0	2.0
Primary embryos	0.0	1.0	2.0	1.0	2.0	1.0	2.0
Globular	89.0	66.9	78.6	65.7	57.0	54.6	45.5
Heart	5.9	8.0	6.6	12.3	12.8	3.4	1.8
Torpedo	3.7	9.9	3.1	10.3	7.2	7.6	7.4
Cotyledonary	1.4	15.2	11.7	11.8	11.7	34.5	45.3
Total (%)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

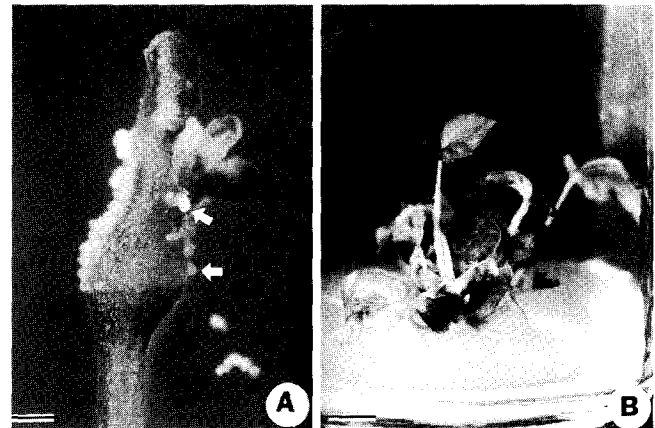


Figure 1. Secondary somatic embryogenesis (A) and plant regeneration in *Aralia cordata* (B). A, Secondary embryos (arrows) were developed on a primary torpedo embryos cultured in liquid MS medium with 1 mg/L kinetin. Bar=0.1 cm. B, Plant regeneration was regenerated from secondary embryos of cotyledonary stage induced from a primary torpedo embryo. Bar=1 cm.

Table 3. Effects of cytokinins on secondary embryo development from primary embryos of *A. cordata* on MS basal solid medium

Cytokinins (mg/L)	kinetin				BA				zeatin					
	0.0	1.0	2.0	1.0	2.0	1.0	2.0	1.0	2.0					
Primary embryos	0.0	1.0	2.0	1.0	2.0	1.0	2.0	1.0	2.0					
Torpedo	16.7	0.3	45.3	16.5	43.8	10.0	51.9	3.5	6.5	0.3	36.7	17.8	3.3	0.2
Cotyledonary	30.0	2.1	50.0	14.4	67.2	23.8	43.2	4.9	31.3	5.3	40.0	20.0	26.7	9.6

Primary torpedo and cotyledonary somatic embryos were developed from embryogenic cells cultured in MS liquid medium containing cytokinins for 2 weeks and then cells were cultured in MS basal liquid medium for 5 weeks. Frequency of secondary embryogenesis and number of embryos per explant were counted after primary embryos were cultured in MS basal solid medium for 3 weeks and 5 weeks respectively. * Normal number: frequency of secondary embryogenesis(%). Bold number: number of secondary embryos /primary embryo.

Table 4. Tertiary embryogenesis (%) from secondary embryos formed from primary somatic embryos of *A. cordata* on MS basal solid medium

Primary embryos Secondary embryos	Torpedo		Cotyledonary	
	Torpedo	Cotyledonary	Torpedo	Cotyledonary
Cytokinins (mg/L)				
0	50.3	55.7	60.4	67.0
kinetin 1	54.9	81.2	69.0	72.4
2	45.5	33.2	51.2	23.8
BA 1	51.6	50.0	40.3	60.7
2	57.5	70.9	43.8	27.8
zeatin 1	47.2	72.6	38.7	66.4
2	52.4	23.2	58.4	18.3

Primary embryos were induced from embryogenic cells cultured in MS liquid medium containing cytokinins and then secondary embryos were developed from primary embryos. Tertiary embryogenesis in MS basal solid medium were counted for 4 weeks culture.

을 처리하여 얻어진 1차 어뢰형배로부터 유도된 2차 어뢰형배 (57.5%), 1 mg/L kinetin을 처리하여 얻어진 1차 어뢰형배로부터 유도된 2차 자엽형배 (81.2%) 등이다.

한편 식물체 재생률을 볼 때 2 mg/L zeatin과 kinetin을 처리하여 얻어진 자엽형 1차배로부터 유도된 2차 자엽형배를 분리하여 치상하였을 때 재생률이 높게 나타났으며 (각각 28.6%, 25.4%) 2 mg/L zeatin을 처리하여 얻어진 어뢰형 1차배로부터 유도된 2차 자엽형배로부터 식물체 재생률은 다음으로 높았다 (20.0%). BA를 처리하여 얻어진 1차배로부터 유도된 2차배의 식물체 재생률은 다른 처리에 비하여 가장 낮았다. 2차배로부터의 3차배 발생과 식물체 재생과의 상관관계를 볼 때 3차배의 형성율이 낮으면 식물체 재생률은 높았고 반대로 배의 형성율이 높으면 재생률은 낮아서 부의 상관관계를 보여주었으며 3차배로부터 식물체 재생은 유도되지 않았다. 결과적으로 식물체의 재생에 있어서 2차배나 3차배의 배발생은 식물체 재분화율을 낮추는 요인이 될 수 있음을 확인하였다.

고 찰

사이토카이닌이 첨가된 배지에서 형성된 1차 체세포배를 MS 기본배지에 치상하여 발생된 2차배를 식물체로 재생시킬 경우 사이토카이닌 처리는 대조구보다 많은 1차배를 발생시켰을 뿐 만 아니라 식물체 재생에서도 역시 효과적이었다. 본 실험에서 배발생능 세포에 1 mg/L kinetin, BA 및 zeatin을

Table 5. Plant regeneration (%) from secondary embryos formed from primary somatic embryos of *A. cordata* cultured on MS basal solid medium

Primary embryos Secondary embryos	Torpedo		Cotyledonary	
	Torpedo	Cotyledonary	Torpedo	Cotyledonary
Cytokinins (mg/L)				
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
kinetin 1.0	3.9	6.7	2.7	3.6
2.0	9.1	16.7	5.3	25.4
BA 1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2.0	0.0	0.0	0.0	2.8
zeatin 1.0	10.0	0.0	14.3	0.0
2.0	0.0	20.0	0.0	28.6

Secondary embryos were developed from primary embryos induced from embryogenic cells cultured in MS liquid medium containing cytokinins. Plant regeneration from secondary embryos were counted in MS basal solid medium after 7 weeks culture.

처리하였을 때 자엽형배의 경우 40% 이상의 2차배 발생빈도를 보여주었는데, 체세포배의 발생시기별로 0.2 mg/L BAP를 처리하였을 때 (Lee and Soh 1993) 2차배의 형성율이 구상형배는 30% 이상이었고 심장형배 이상의 배는 10% 이하를 보여주었다. 따라서 구상형배보다 분화되지 않은 배형성 세포는 성장조절물질의 영향을 크게 받는 것으로 생각된다. 서양유채의 경우 내생 사이토카이닌이 높아 외래 사이토카이닌을 사용하면 반복적인 배발생이 저해되고 사용하지 않으면 배발생이 촉진되기 때문에 반복적인 배발생이 일어난다고 알려져 있다 (Loh et al. 1983). 그러나 반대로 땅두릅은 외래 사이토카이닌 사용에 의하여 2차배 발생이 촉진되었기 때문에 내생 사이토카이닌 함량이 낮을 것으로 추정되었다.

1차배의 발생에서 배발생 빈도는 배발생 단계 (Wetzstein et al. 1989), seedling의 발생단계 (Baker and Wetzstein 1998), 종자의 발생단계 (Merkle et al. 1998)와 관계가 있었는데 2차배 발생을 관찰한 본 실험에서 자엽형배가 어뢰형배보다 높아서 발생단계별로 다르게 반응하였다. Cassava (Raemakers et al. 1993a)에서도 1차배의 발생단계에 따라 2차배의 형성이 다르게 일어났다. 녹색을 띤 자엽이 없는 어뢰형배는 자엽을 갖고 있는 자엽형배보다 배발생능력이 낮았으며 발아단계의 성숙한 배는 배발생능이 급격히 떨어졌다. 이와 같은 결과는 2차배의 발생능력이 자엽과 관련이 있다는 것을 의미하지만 (Raemakers et al. 1993a) 자엽형배에서 거의 2차배가 형성되지 않는 경우 (Wetzstein and Baker 1993)가 있으므로 이에 대한 판단이 쉽지는 않다.

호두에서 발아불능 체세포배를 2차배 발생에 이용하였다는

보고가 있으며 (Deng and Cornu 1992) 고무나무의 어뢰형배에 싸이토키닌을 처리하여 발아율을 측정하였을 때 일부는 발아되었으나 나머지는 2차배를 발생하거나 캘러스화되었다 (Veisseire et al. 1994). 그러나 땅두릅 (Lee et al. 1998)의 자엽형배에 ABA를 처리하였을 때 발아된 것에 2차배가 형성된 것도 있고, 발아되지 않으면서 2차배도 형성되지 않는 사례도 있었다. 이는 실험재료 및 발생단계, 처리한 생장물질의 종류와 기간, 등 다각도로 연구해야 할 문제이다.

본 실험에서 체세포배를 상처 없이 MS 기본배지에 치상했을 때 1차배의 자엽이 팽창된 상태에서 많은 2차배가 형성되는데 고무나무를 재료로 한 실험과 유사하였고 (Veisseire et al. 1994) 2차배 형성율이 31~67%를 보였으나 형성되지 않는 경우도 있었다 (Baker and Wetzstein 1995).

2차배로부터 식물체 재생률은 최고 28.6% (2mg/L zeatin)을 보여주었지만 땅콩에서는 4%로 매우 낮았는데 (Durham and Parrott 1992) 이는 처음 배발생을 유도할 때 40 mg/L의 고농도 2,4-D를 사용하여 식물체 재생에도 영향을 준 것으로 생각되며 본 실험은 싸이토키닌을 처리하였기에 재생률이 높아진 것으로 생각된다. 따라서 싸이토키닌 처리가 오옥신보다 2차배 발생과 식물체 재생에 효과적으로 보이며 초기에 사용한 생장물질의 종류에 따라 배발생 및 식물체의 재생에 영향을 준 것으로 생각된다.

1차배로부터 중간단계의 캘러스의 분화없이 2차배가 이루어졌는데 이런 형태의 발생은 중간단계의 캘러스로부터 일어나는 분화시스템보다 somaclonal variation의 가능성이 적으며 (Ammirato 1989), *Camellia reticulata*의 체세포배 발생 실험에서도 2차배 발생을 이용한 유전적 안전성이 입증되었다 (Plata and Vieitez 1990). 이와 같은 장점 때문에 2차배는 광범위한 응용을 할 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

땅두릅 미성숙 화기절편을 이용하여 1 mg/L 2,4-D의 고체배지에서 배발생 캘러스를 유도하였고 동일조건의 액체배지에서 증식시켰다. 배발생 세포를 270 μm의 걸름체로 거른 다음 배발생 세포는 싸이토키닌이 포함된 MS 액체배지에서 2주 동안 배양하였고 그 후 생장조절물질이 없는 MS 액체배지에서 5주간 배양하여 1차 체세포배가 유도되었다. 이들중 어뢰형과 자엽형 시기의 배를 생장조절물질이 없는 MS 고체배지에 치상하였을 때 캘러스의 형성 없이 2차배가 직접 유도되었다. 2차배를 유도할 때 2 mg/L kinetin에서 얻어진 1차 배에서 가장 높은 빈도의 2차배가 발생되었다. 식물체 재생은 1 mg/L kinetin 혹은 1 mg/L zeatin을 처리하여 얻어진 1차 자엽형배로부터 유도된 2차 자엽형배를 생장조절물질이 없는 MS 고체배지에 치상하였을 때 높게 나타났다 (각각 25.4%, 28.6%). 2차배로부터의 3차배 발생과 식물체 재생과의 상관

관계를 볼 때 식물체의 재생에 있어서 3차배의 배발생은 저해적인 영향을 주었다.

인용문헌

- Ammirato PV (1989) Recent progress in somatic embryogenesis. Newsletter IAPTC 57:2-16
- Baker CM, Wetzstein HY (1995) Repetitive somatic embryogenesis in peanut cotyledon cultures by continued exposure to 2,4-D. Plant Cell Tiss Org Cult 40:249-254
- Baker CM, Wetzstein HY (1998) Leaflet development, induction time, and medium influence somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.). Plant Cell Rep 17:925-929
- Deng M-D, Cornu D (1992) Maturation and germination of walnut somatic embryos. Plant Cell Tiss Org Cult 28:195-202
- Durham RE, Parrott WA (1992) Repetitive somatic embryogenesis from peanut cultures in liquid medium. Plant Cell Rep 11:122-125
- Lee KS, Soh WY (1993) Effect of cytokinins on the number of cotyledons of somatic embryos from cultured cells of *Aralia cordata* Thunb. Kor J Plant Tiss Cult 20:171-175
- Lee KS, Lee JC, Soh WY (1998) Effects of ABA on secondary embryogenesis from somatic embryos induced from inflorescence culture of *Aralia cordata* Thunb. J Plant Biol 41:187-192
- Loh CS, Ingram DS, Hanke DE (1983) Cytokinins and the regeneration of plantlets from secondary embryoids of winter oilseed rape, *Brassica napus* spp. oleifera. New Phytol 95:349-358
- Maheswaran G and Williams EG (1986a) Direct secondary somatic embryogenesis from immature sexual embryos of *Trifolium repens* cultured *in vitro*. Ann Bot 57:109-117
- Maheswaran G and Williams EG (1986b) Primary and secondary direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Brassica campestris*. J Plant Physiol 124:455-463
- Merkle SA, Neu KA, Battle PJ, Bailey RL (1998) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature and mature tissues of sweetgum (*Liquidambar styraciflua*). Plant Sci 132:169-178
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497
- Plata E, Vieitez AM (1990) *In vitro* regeneration of *Camellia reticulata* by somatic embryogenesis. J Horticult Sci 65:707-714
- Raemakers CJJM, Amati M, Staritsky G, Jacobsen E, Visser RGF (1993a) Cyclic somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. Ann Bot 71:289-294
- Raemakers CJJM, Schavemaker CM, Jacobsen E, Visser RGF (1993b) Improvements of cyclic somatic embryogenesis of