

## 지황 잎조직 절편으로부터 신초 형성

황 성 진<sup>†</sup>

동신대학교 한약재산업학과

### Efficient Procedures for Direct Shoots Regeneration from Leaf Explants of *Rehmania glutinosa* Lib.

Sugn Jin Hwang<sup>†</sup>

Department of Oriental Medicine Materials, Dongshin University, Naju 520-714, Korea

**ABSTRACT** : Adventitious shoots were directly induced from leaf explants of *R. glutinosa*, an important medicinal plant. Proliferating shoot cultures were obtained by culturing leaf discs on Murashige and Skoog(MS) medium alone or combination with auxins and cytokinins. MS medium supplemented with 1 mg/l BA and 2 mg/l IAA was the most effective, providing high shoot bud formation frequency without formation of intervening callus. The effect of leaf age on adventitious shoot formation was also investigated. The maximum shoot bud production (93.4%) was achieved using 3rd leaf from apex of 6 weeks old plantlets after seed germination. Plantlet were rooted on a half-strength MS (1/2MS) medium containing 0.1 mg/l IBA. This protocol is useful for clonal propagation and *Agrobacterium*-mediated transformation in *R. glutinosa*.

**Key words** : leaf discs, plantlet regeneration, *Rehmannia glutinosa*

## 서 언

지황은 현삼과에 속하는 약용식물로 한방에서는 주로 근경을 지혈, 강심, 이뇨, 혈당강하 등의 처방전에 이용하고 있다 (Bajaj *et al.*, 1988). 주요 성분으로 iridoid glycoside인 ajugol, aucubin, melittoside, rehmanniosides, catalpol, leonuride 등과 당류인 stachyose, raffinose, sucrose, mannitol, amino acids, 그리고 소량의 campesterol을 함유하며, 주로 분근이나 어린 뿌리를 통한 영양 번식을 통해 노지에서 증수하고 있다 (Gorge and Sherrington, 1984). 그러나, 이러한 번식방법은 월동 기간 동안 바이러스나 병원균에 의해 종묘가 심하게 오염되어질 뿐만 아니라 개화 후 결실을 또한 6% 이하로 매우 낮게 나타나는 등의 문제점을 갖고 있다 (Guofeng *et al.*, 2002).

식물조직배양은 기내에서 우량 유묘를 대량증식하거나 또는 형질전환을 통한 우량 수종의 육성, 그리고 약리물질의 생산과 같은 연구에 효과적으로 사용되어질 수 있다. 기내증식의 경우 두가지 방식에 의해 이루어지게 된다. 가령, 배지에 치상한 조직으로부터 직접 유식물체를 유도하거나 간접적인 방법에 의한 경우가 있다. 캘러스 단계를 거치지 않고 형태형성이 이루어지는 방식이 순계육성에 보다 효과적이다. 즉, 모식물

체의 유전적인 특성을 그대로 이어받을 수 있다고 보고 있다. 캘러스단계를 거쳐 유식물체를 얻는 방식은 배양과정에서 체세포변이의 발생 빈도가 매우 높아 육종 측면에서 바람직하지 않기 때문이다 (Gorge, 1993; Bhojwani and Razdan, 1996; Larkin and Scowcroft, 1981; Marcotrigiano and Jagannathan, 1988). *Agrobacterium* spp.를 이용한 형질전환 식물체의 생산에 있어서도 균과 공조배양 (co-culture)한 잎절편 (leaf discs) 으로부터 캘러스단계를 거치지 않고 직접 형질전환된 부정아가 만들어 지는게 바람직하다.

지황의 경우 캘러스 단계를 거쳐 유식물체를 유도해낸 경우와 경정배양을 통해 무병주를 생산한 사례가 있다 (Harn, 1984; Jiang and Mao, 1979; Lee and Chae, 1996). 또한 Park등(2002)은 *Agrobacterium* spp.와 잎조직 절편의 공조배양을 통해 형질전환을 시도한 바 있다.

본 연구에서는 기내 무병주의 대량생산과 주요 약리물질인 iridoid glycosides의 생합성의 조절, 그리고 병해충에 대한 저항성을 갖는 형질전환된 개체를 얻고자하는 많은 연구들에 있어서 반드시 선행되어야 할 재분화 효율의 극대화를 위한 최적조건을 규명하고 하였으며 그 결과를 보고하고자 한다.

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-61-330-3225 (E-mail) botany@dsu.ac.kr  
Received October 4, 2005 / Accepted December 30, 2005

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

지황 종자는 작물과학원 인삼약초과로부터 분양을 받아 70% (v/v) ethanol에서 3분간, 2% (v/v) sodium hypochlorite 용액에서 5분동안 침지한 후 멸균수로 3회 반복하여 수세하고, 멸균된 여과지 위에서 여분의 수분을 제거한 다음 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 MS (Murashige and Skoog, 1962)배지 (2% sucrose, pH 5.8)에 치상 하였다. 암소에서 발아된 유식물체는 2주 후 18시간 광도  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 조사되는 항온실( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ )에서 배양 하였다.

### 2. 잎조직 절편으로부터 신초의 재분화

유식물체의 잎을 cork borer를 사용하여 직경 1.5 cm 크기로 잎절편 (leaf discs)을 만들어 식물생장조절물질인 auxins (IAA, NAA, 2,4-D)과 cytokinins (BA, kinetin)이 단독 또는 혼합처리된 MS배지 (3% sucrose, pH 5.8)에 치상하였다. 한편, 유식물체의 상태에 따른 재분화율을 확인하기 위하여 4주, 6주, 8주, 10주 동안 기내에서 자란 잎을 각기 시료로 사용하였다. 배지에 치상한 모든 배양조직은 16시간 동안 광도  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 조사되는 항온실에서 배양하였다.

### 3. 발근

잎 절편으로부터 분화된 길이 약 2 cm 크기의 신초를 선별한 후 기저부를 절취하여 식물생장조절물질을 전혀 첨가하지 않거나 auxins (IBA, IAA)을 농도별 (0.1, 1, 2 mg/l)로 첨가한 1/2MS배지 (2% sucrose, pH 5.8)에서 발근을 유도하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 부정아의 형성에 있어서 식물생장조절물질의 영향

재래육종 방식으로 번식이 어렵거나 형질전환에 의한 신품종의 육성이 요구되는 약용작물에 있어서 식물조직배양기법에 의한 고효율의 재분화 시스템의 확보는 무엇보다도 중요하다. 특히, 모식물체의 조직으로부터 직접 유식물체를 유기하는 것은 배양과정에서 나타나는 유전적 변이를 최소화 할 수 있기 때문에 대량번식에 있어 매우 유익하다. 또한 형질전환에 있어서도 마찬가지로 도입유전자의 안정성을 가져올 수 있고, 형질전환된 개체를 얻는데 많은 시간 절약을 할 수 있다. 지황의 조직절편으로부터 직접 고효율의 재분화 시스템의 확보는 형질전환 효율을 높이는 것은 물론 우량품종의 조기 증식을 위해 반드시 필요하다고 본다.

지황의 종자를 무균적으로 발아시킨 후 4주 이상 성장한 유식물체로부터 잎 절편을 절취하여 auxins 또는 cytokinins이 농도별로 단독 또는 혼합하여 처리된 MS배지에 치상하였다. 잎 절편을 식물생장조절물질이 첨가된 배지에 치상한 후 절취

**Table 1.** Response of leaf explants to various plant growth regulators in *R. glutinosa*

PGRs (mg/l)	No. of explants inoculated	Explants producing adventitious shoot or root (%)
NAA	1	21.1 <sup>R</sup>
	2	45.4 <sup>R</sup>
	3	82.1 <sup>R</sup>
IAA	1	83.7 <sup>R</sup>
	2	47.2 <sup>R</sup>
	3	21.3 <sup>R</sup>
2,4-D	1	C*
	2	C*
	3	C*
BA	0.5	ND**
	1	ND**
	2	33.4 <sup>S</sup>
	0.5	ND**
	1	ND**
2	ND**	

Data were collected after 6 weeks in culture

Explants were performed twice

<sup>R</sup>Adventitious root differentiation; <sup>S</sup>Adventitious shoot differentiation

\*C: callus production; \*\*ND: not detected

부에서 나타나는 다양한 분화현상을 관찰한 결과 auxins을 단독으로 첨가한 모든 배지 조건에서는 절취 부위로부터 캘러스가 형성되거나 부정근이 형성 되었다 (Table 1). 즉, NAA와 IAA 처리구에서는 모두 약간의 차이가 있었으나 부정근이 형성 되었다. NAA 처리구에서 형성된 부정근의 경우 가늘고 길며 잔털이 많은 반면 IAA의 처리구에서는 굵고 지근의 형성이 늦게 이루어 지는 특징을 보여주었다. 2,4-D의 처리구에서는 대부분 캘러스가 유기되었으며, 1 mg/l 2,4-D의 처리구에서는 세포질이 충만하고 표면이 매끄러운 배발생 캘러스를 형성 하였다. 한편, 유기된 캘러스를 절취하여 동일조성의 배지로 옮겨 증식 시켰을 때 고농도의 2,4-D에서 유기된 캘러스는 계대배양 과정에서 모두 갈변화 현상을 보여주었다. 일반적으로 auxins의 단독 처리에 의해 신초를 재분화 시키는 경우는 매우 드물다. 단지, 배발생캘러스의 유도라든지 부정근의 유기를 위해서 단독으로 배지에 첨가하여 사용한다.

한편, 배지에 cytokinins만을 단독으로 처리 한 경우 auxins 처리와 달리 캘러스나 부정근의 형성은 이루어지지 않았으며, 2 mg/l BA 처리구에서 매우 낮은 효율의 부정아가 형성되었다 (Table 1). 이와같이 cytokinins의 단독 처리에 의해 조직 절편으로부터 직접 부정아를 유도한 경우가 간혹 있다. Mandal등 (2001)은 *C. tinctorius*의 자엽조직의 절편으로부터 BA 처리에 의해 직접 신초를 유도 하였고, Li와 Liu (2005) 또한 BA 단독 처리에 의해 *C. acuminata*의 잎과 엽병으로부터 직접 식물체를 유기 한 바 있다. 그러나, 대부분의 경우

**Table 2.** Effects of various combinations of cytokinins and auxins on adventitious shoots regeneration from leaf explants of *R. glutinosa*

PGRs (mg/l)		No. of explants	Explants producing shoot (%)	No. of shoots per explant (Mean±S.E)	
NAA	1	20	21.3	1.0±0.1	
	2	20	14.1	0.5±0.1	
	3	20	7.5	0.1±0.1	
BA 0.5	IAA	1	20	14.2	0.7±0.2
		2	20	33.2	1.7±0.5
		2	20	35.4	1.2±0.3
	2,4-D	1	20	C*	0.0±0.0
		2	20	C*	0.0±0.0
		3	20	C*	0.0±0.0
BA 1	NAA	1	20	35.6	1.6±0.1
		2	20	41.3	1.2±0.1
		3	20	ND**	0.0±0.0
	IAA	1	20	7.2	0.4±0.1
		2	20	93.4	11.3±0.5
		3	20	63.1	4.1±0.5
2,4-D	1	20	C*	0.0±0.0	
	2	20	C*	0.0±0.0	
	3	20	C*	0.0±0.0	

Data were collected after 6 weeks in culture  
 Explants were performed twice  
 \*C: callus production; \*\*ND: not detected

cytokinins의 단독 처리는 유묘로부터 신초를 기내 대량증식하고자 할 때 이용된다 (Rai, 2002; Fraguas *et al.*, 2004; Hosoki and Nojima, 2004).

Cytokinins인 BA와 auxins인 IAA, NAA, 그리고 2,4-D를 농도별로 혼합하여 처리하였을 때 절취부에서 다양한 분화 양상을 보여주었다 (Table 2). 0.5 mg/l BA를 NAA (1-3 mg/l)와 농도별로 혼합하여 처리할 경우 서로 차이는 있었으나 낮은 효율로 부정근과 부정아의 형성이 동시에 이루어졌으며, IAA를 같은 농도로 BA와 혼합하여 처리할 경우에는 잎절편으로부터 35% 이내의 범위에서 부정아가 형성되었으나, 대부분 캘러스 형성과정을 통해 신초가 유기되어지고 5주 후부터 기저부에서 부정근이 유기되는 특징을 보였다. 이와같은 결과는 Misra와 Datta (2001)가 *T. erecta*의 잎절편으로부터 신초를 재분화 시키는 과정에서 BA와 IAA를 혼합하여 처리한 실험구에서 캘러스 단계를 거쳐 이루어졌다는 사실과 일치한다. 한편, 0.5 mg/L BA와 auxins인 2,4-D를 혼합하여 처리한 실험구에서는 절취부에서 모두 캘러스가 형성되었다. 그러나, 2,4-D의 농도가 높아질 경우에는 캘러스의 형성율이 떨어지고 유기된 캘러스를 새로운 배지로 옮기기 전에 대부분 괴사하였다. BA의 농도를 1 mg/L로 높이고 IAA를 농도별 (1-3 mg/l)로 혼합하여 처리하였을 경우 높은 효율의 부정아 형성을 확



**Fig. 1.** Adventitious shoot organogenesis on *R. glutinosa* leaf explants on MS medium containing 1 mg/l BA and 2 mg/l IAA after 8 weeks culture.

인할 수 있었다. 신초의 형성율은 1 mg/l BA와 2 mg/l IAA 처리구에서 93.4%로 가장 높게 나타났다 (Fig. 1). 지금까지 지황의 조직으로부터 신초의 형성에 관련된 연구 (Ham, 1984; Jiang and Mao, 1979; Lee and Chae, 1996) 대부분이 캘러스 형성을 거쳐 이루어지거나 낮은 재분화율로 인해 신품종의 대량증식이나 형질전환등에 활용하기에는 적절치 않다고 볼 수 있다.

식물체를 대부분의 경우 유전학적 특성이나 조직의 상태에 상관없이 cytokinins과 auxins을 혼합하되 cytokinins의 농도를 auxins보다 높게하여 조직절편으로부터 신초를 직접 유기하고 있다 (Shinha *et al.*, 2000; Kantia and Kothari, 2002; Van Altvorst *et al.*, 1992, 1994, 1995). Guofeng 등 (2002)은 *P. acerifolia*의 하배축으로부터 신초를 직접 유기하는 과정에서 반드시 auxins과 cytokinins의 혼합 처리가 필요하며, 캘러스 단계를 거치지 않기 위해서는 cytokinins의 농도를 상대적으로 높여줄 필요가 있다고 보고한 바 있다.

## 2. 부정아의 형성에 있어서 leaf age의 영향

식물조직 절편으로부터 배발생 캘러스를 유기해 내거나 기관형성을 통한 재분화된 개체를 생산하는 경우 식물생장조절 물질의 종류와 함께 시료의 상태가 매우 중요한 영향을 미치게 된다. 특히, 식물조직절편으로부터 직접 부정아를 유도할 때 성숙한 조직보다는 미성숙 조직이 보다 효과적일 경우가 많다 (Geier, 1986; Nagmani *et al.*, 1991; Nugent *et al.*, 1991). 성숙한 잎의 경우 기관형성 능력이 급격히 떨어지기 때문에 재료로써 적절치 못한 경우가 많다. 그러나, 너무 어린 조직일 경우에도 신초의 형성율이 낮을 수가 있다. 따라서, 적당한 성장기의 식물 잎의 선택이 무엇보다도 신초의 재분화율을 높일 수 있다. 지황의 경우 기내에서 발아 후 4주부터 10주까지 배양하면서 2주 간격으로 잎을 채취하여 재분화율을

**Table 3.** Effects of leaf age on adventitious shoots regeneration from leaf explants of *R. glutinosa*

Culture periods after seeds germination (weeks)	No. of explants	Explants producing shoot (%)	No. of shoots per explant (Mean±S.E)
4	20	78.9	8.3±0.3
6	20	93.4	11.3±0.5
8	20	61.4	6.5±0.5
10	20	ND*	0.0±0.0

Data were collected after 6 weeks in culture  
Explants were performed twice  
\*ND: not detected

최대로 높일 수 있는 시료 채취 시기를 조사 하였다. 1 mg/ℓ BA와 2 mg/ℓ IAA가 첨가된 MS배지에 시기별 채취한 잎조직 절편을 치상하였을 때 기내에서 발아 후 6주 가량 배양된 유묘가 가장 적절하였으며, 이 후 채취한 잎은 재분화율이 감소하는 경향을 보였다 (Table 3). 동일 조건에서 10주 이상 배양된 식물체의 잎을 사용할 경우 치상한 leaf discs의 대부분에서 노화현상이 심하게 나타났으며, 4주 이내의 식물체의 잎을 사용할 경우 부정아의 형성능이 낮게 나타났다. Lo 등 (1997)은 African violet의 잎절편의 배양에서 엽령이 낮을수록 재분화율은 높게 나타났으나 잎조직의 성숙도와 직접적인 비례하는 것은 아니라고 한 바 있다. 한편, 잎의 위치에 따른 영향을 조사하기 위해 8주 정도 자란 지황의 식물체의 정단 부위로부터 기저부까지의 잎을 채취하여 leaf discs를 만들고 이를 동일 배양조건하에서 배양 하였을 때 3번째 잎이 가장 적절한 것으로 사료되었다.

### 3. 발근

조직 절편으로부터 재분화된 유식물체나 유묘로부터 증식된 신초의 경우 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 기본배지에서 발근이 이루어지는 기간이나 발근율의 차이는 있으나 대부분 내재된 auxins의 작용에 의해 50% 이상 발근이 이루어진다 (Hosoki and Nojima, 2004; Qu *et al.*, 2002; Agarwal and Ranu, 2000; Phippen and Simon, 2000). 그러나, 유식물체의 유전적인 영향 또는 해부생리학적 차이, 그리고 장기간 cytokinins이 첨가된 배지에서 적응된 유묘의 경우 발근이 쉽게 이루어지지 않은 경우가 많은데 이 때는 발근 효율을 높이기 위해서는 배지에 저농도의 auxins을 처리해야만 한다. 지황의 경우 IAA와 IBA를 농도별로 첨가한 1/2MS배지에 치상하여 신초로부터 발근을 확인한 결과 0.1 mg/ℓ IBA와 0.1 mg/ℓ IAA가 첨가된 1/2MS배지에서 2주 후부터 부정근이 형성되기 시작하여 3주 후 97%와 94%의 발근율을 보여주었다 (Table 4). 이와 유사한 연구결과로는 Liu 등 (2002)이 *P. acerifolia*의 하배축 조직절편으로부터 유도한 신초를 0.1 mg/ℓ IBA가 첨가된 1/2MS에 치상하여 92%의 발근율을 이끌어 낸 경우와,

**Table 4.** Effects of BA and IAA concentration on adventitious rooting of *in vitro* regenerated shoots of *R. glutinosa*

	Auxins (mg/ℓ)	Rooting frequency (%)
BA	0.1	94.2 (25)
	1	28.6 (23)
	2	7.1C* (23)
IAA	0.1	97.4 (25)
	1	31.4 (23)
	2	14.3C (24)

Data were collected after 4 weeks in culture  
The number of explants are given in parentheses  
\*C: callus production

Liu 등 (2003)이 약용식물인 *A. judaica*의 하배축으로부터 재분화된 신초 약 67%가 1 μM IBA 처리에 의해 발근이 이루어진 연구결과를 들 수 있다.

지황의 경우 식물생장조절물질이 전혀 첨가되지 않은 배지에 치상한 유묘에서도 78%의 발근율을 나타내었으며, auxins의 농도가 높을수록 신초의 기저부에서 캘러스화 현상이 나타났다. 한편, MS배지에서는 초기 발근이 늦은 반면 4주 이상 배양 하였을 때 뿌리의 직경과 신초의 생육상태가 무기염을 절반으로 낮춘 1/2MS배지에서 보다 좋게 보였다 (data not shown). 따라서, 무기염의 농도가 낮은 1/2MS배지에서 신초로부터 발근을 유도한 후 MS배지로 옮겨주는 것이 효과적일 것으로 사료되었다.

## 적 요

지황 (*R. glutinosa*)의 조직절편으로부터 고효율의 식물체 재분화 시스템을 확립하기 위하여 기내에서 발아된 유묘의 잎을 절취하여 auxins과 cytokinins을 농도별로 단독 또는 혼합하여 MS배지에 치상한 후 신초의 형성율을 조사하였다. 잎 절편으로부터 부정아의 형성율은 1 mg/ℓ BA와 2 mg/ℓ IAA가 첨가된 MS배지에서 93.4%로 가장 높았다. 한편, 엽령에 따른 부정아의 형성율을 조사한 결과 기내에서 발아 후 6주가 지난 유식물체의 정단부위로부터 3번째의 잎을 사용함으로써 신초의 형성율을 98.4%까지 높일 수 있었다. 형성된 신초는 0.1 mg/ℓ IBA가 첨가된 1/2MS배지로 옮겨졌을 때 4주 후 최대 발근율을 보여주었다.

## LITERATURE CITED

- Agarwal PK, Ranu RS (2000) Regeneration of plantlet from leaf and petiole explants of *P. horticorum*. *In vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 36: 392-397.
- Bajaj YPS, Furmanowa M, Olszowska O (1988) Biotechnology of micropropagation of medicinal and aromatic plants. *In Biotechnology in agriculture and forestry*. Springer & Verlag,

- NY pp. 60-103.
- Bhojwani SS, Razdan MK** (1996) Plant tissue culture : theory and practice. Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, The Netherlands. pp. 483-536.
- Fraguas CB, Pasqual M, Dutra LF, Cazetta JO** (2004) Micropropagation of *F. carica*. In vitro Cell Dev. Biol.-Plant 40:471-474.
- Geier T** (1986) Factors affecting plant regeneration from leaf segments of *A. scherzerianum* cultured *in vitro*. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 6:115-125.
- George EF** (1993) In Plant propagation by tissue culture. part I. The technology. Exegetics Ltd. Edington, England.
- Gorge EF, Sherrington PD** (1984) In Plant propagation by tissue culture. Edington : Exegetics Ltd., Eversley, England, pp. 39-71.
- Guofeng L, Haung J, Chen L, Bao M** (2002) Plant regeneration from excised hypocotyl explants of *P. acerifolia*. In vitro Cell Dev. Biol.-Plant 38:558-563.
- Han CY** (1984) Fundamental studies on plant breeding. RDA Res. Bull. pp. 245-356.
- Hosoki T, Nojima S** (2004) Micropropagation of *S. caucasica*. In vitro Cell Dev. Biol.-Plant 40:482-484.
- Jiang LC, Mao WY** (1979) Callus formation and plantlet regeneration of *R. glutinosa*. Chinese Med. Herb. Lett. 2:462-465.
- Kantia A, Kothari SL** (2002) High efficiency adventitious shoot bud formation and plant regeneration from leaf explants of *D. chinensis*. Sci. Hort. 96:205-212.
- Larkin J, Scowcroft WR** (1983) Somaclonal variation-a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. App. Genet. 60:197-214.
- Lee ST, Chae YA** (1996) Cultivation of medicinal crops. Physiol. Plant 15:473-479.
- Li Z, Liu Z** (2005) Plant regeneration from leaf petiole in *C. acuminata*. In vitro Cell Dev. Biol.-Plant 41:261-265.
- Liu G, Huang J, Chen L, Bao M** (2002) Plant regeneration from excised hypocotyl explants of *P. acerifolia*. In vitro Cell Dev. Biol.-Plant 38:558-563.
- Liu CZ, Murch SJ, Demerdash MEL** (2003) Regeneration of the Egyptian medicinal plant *A. judaica*. Plant Cell Rep. 21:525-530.
- Lo KH** (1997) Factors affecting shoot organogenesis in leaf disc culture of African violet. Sci. Hort. 72:49-57.
- Mandal AKA, Gupta SD** (2001) Direct shoot organogenesis and plant regeneration in safflower. In vitro Cell Dev. Biol.-Plant 37:50-54.
- Marcotrigiano M, Jagannathan L** (1988) *Paulownia tomentosa* "Somaclonal Snowstorm". Hort. Sci. 23:226-227.
- Misra P, Datta SK** (2001) Direct differentiation of shoot buds in leaf segments of *T. erecta*. In vitro Cell Dev. Biol.-Plant 37:466-470.
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Plant Physiol. 15:473-479.
- Nagmani R, Johnson MA, Dinus RJ** (1991) Effect of explant and media on initiation, maintenance, and maturation of somatic embryos in *P. menziesii*. NATO ASI series 210:171-178.
- Nugent G, Wardely-richardson T, Lu CY** (1991) Plant regeneration from stem and petal of carnation. Plant Cell Rep. 10:477-480.
- Park SU, Kim HH, Yu CY, Park CH, Chae YA** (2002) Agrobacterium mediated genetic transformation of *R. glutinosa*. Biotech. Lett. 24:547-550.
- Phippen WB, Simon JE** (2000) Shoot regeneration of young leaf explants from *O. basilicum*. In vitro Cell Dev. Biol.-Plant 36:250-254
- Qu L, Chen J, Henny RJ, Haung Y, Caldwell RD, Robinson CA** (2002) Thidiazuron promotes adventitious shoot regeneration from *E. aureum* leaf and petiole explants. In vitro Cell Dev. Biol.-Plant 38:268-271.
- Rai VR** (2002) Rapid clonal propagation of *N. foetida*. In vitro Cell Dev. Biol.-Plant 38:347-351.
- Sinha RK, Majumdar K, Sinha S** (2000) *In vitro* differentiation and plant regeneration of *A. chinensis*. In vitro Cell Dev. Biol.-Plant 36:370-373.
- Von Alvorst AC, Koehorst HJJ, Bruinsma T, Jansen J, Custer JBM, Jong J, Dons JJJ** (1992) Adventitious shoot formation from *in vitro* leaf explants of *D. caryophyllus*. Sci. Hort. 51:223-235.
- Von Alvorst AC, Koehorst HJJ, Bruinsma T, Dons JJJ** (1994) Improvement of adventitious shoot formation from carnation leaf explants. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 37:87-90.
- Von Alvorst AC, Riksen T, Koehorst HJJ, Dons JJJ** (1995) Transgenic carnations obtained by *A. tumefaciens* mediated transformation of leaf explants. Transgenic Res. 4:105-113.