무스카리 ‘Early Giant’ 잎 절편 유래 캘러스 배양을 통한 고빈도 체세포배 발생

이향분 · 전수민 · 정미영 · 한중술 · 김창길 · 임기병 · 정재동

High frequency somatic embryogenesis through leaf explant-derived callus culture in *Muscari armeniacum* cv. ‘Early Giant’

Hyang Bun Lee · Su Min Jeon · Mi-Young Chung · Jeung Sul Han · Chang Kil Kim · Ki Byung Lim · Jae Dong Chung

Received: 5 October 2011 / Accepted: 15 October 2011
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Using calli of *Muscari armeniacum* cv. ‘Early Giant’ that is monocotyledonous ornamental bulb crop with increasing demand in Korea, we carried out current studies to establish an in vitro multiple propagation protocol via somatic embryogenesis. We found that soft pale yellow green calli were induced from leaf explants cultured on all media containing 0.1–3.0 mg·L⁻¹ auxins such as 1-naphthalene acetic acid (NAA) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). However, induced calli showed vigorous growth only when they further transferred on same media containing 2,4-D, 4-amino-3,5,6-tri-chloropicolinic acid (picloram), or 3,6-dichloro-o-anisic acid (dicamba). Although frequency of somatic embryo induction depended on callus source and PGR composition in somatic embryo induction media, somatic embryogenesis was initiated on surface of proliferated calli after transferring on media with no PGR or 0.01 mg·L⁻¹ NAA co-supplemented with various cytokinins such as N⁶-benzylaminopurine (BAP). Highest number of embryo at 9.3 per callus clump was obtained when calli which were

grown under 0.1 mg·L⁻¹ picloram supplementation were sub-cultured on medium with 0.01 mg·L⁻¹ NAA and 0.5 mg·L⁻¹ BAP. In addition, morphological characteristics of somatic embryo were categorized into following nine phases: globular, biased heart, biased torpedo, early cotyledonary, middle cotyledonary, late cotyledonary, early sprouting, middle sprouting, and late sprouting embryos.

Keywords monocotyledon, plant growth regulator, regeneration, somatic embryogenesis, sprouting embryo

서 론

백합과 구근식물의 하나인 무스카리 (*Muscari*) 속은 지중해 지방과 서남아시아를 원산지라고 있으며 *armeniacum*, *botryoides*, *comosum* 등 50여종이 주로 온대지역에 걸쳐 분포하고 있다. 그 중 *armeniacum*은 화색이 보라색, 청색, 황록색 및 백색 등으로 다양하고 향기가 좋아 분화용 또는 화단용으로 재배되는데, 최근 우리나라에서도 인기가 높아 수요가 증가하고 있다.

무스카리 (*M. armeniacum* Leichtl. ex Bak.)의 번식은 주로 자연분구법을 활용하거나 모구를 노칭 (notching) 또는 스쿠핑 (scooping) 한 후 새로 형성되는 자구를 이용 (Hartmann et al. 1990; Peck and Cumming 1986)하며 드물게는 종자번식, 엽삽번식 및 인편번식도 시도되지만 (Bae et al. 2000; Choi et al. 2000; Park et al. 2000) 번식 효율이 높지 않고 전통적 영양번식인 경우 치명적인 병원체인 *Muscari mosaic potyvirus* (MMV)의 전염 위험성에 노출되어 있다 (Navalinskienė and Samuitienė 2001). 최근에는 무스카리 일부 유전자형의 잎, 화경, 인편, 뿌리 및 원형질체 등을 재료로 이용하여 기내 재분화 체계를 개발하고 이를 모구 대량

H. B. Lee · S. M. Jeon · C. K. Kim · K. B. Lim · J. D. Chung
경북대학교 원예학과
(Department of Horticultural Science, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea)

M. Y. Chung (✉)
순천대학교 농업교육과
(Department of Agricultural Education, Suncheon National University, Suncheon, 540-742, Republic of Korea)
e-mail: queen@sunchon.ac.kr

J. S. Han
경북대학교 생태자원응용학부
(School of Ecological Environment, Kyungpook National University, Sangju 742-711, Korea)

증식 또는 외래 유전자 도입을 위한 수단으로 활용하기 위한 노력이 이루어지고 있다 (Nakano et al. 2005; Suzuki and Nakano 2001, 2002, 2003).

생명공학적인 기법을 채택하는 대부분의 상업적 대량증식뿐 아니라 특성개량을 위한 형질전환 기법을 적용하기 전에 대상 종의 고빈도 기내재분화 체계는 확립하여야 할 필요조건으로 인식 (Li et al. 2003)되고 있지만 각 종 또는 유전자형에 따라 고빈도 재분화에 적합한 배양조건의 스펙트럼 폭에 큰 차이가 있는 것으로 알려져 있어 (Han and Kim 2009; Park et al. 2003) 새롭게 선택한 유전자형을 대상으로 기 개발된 재분화 체계를 수정 없이 곧바로 적용하는 것은 무리가 있다고 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 우리나라 무스카리 우점품종인 'Early Giant'의 대량증식을 위한 선행연구로서 고빈도 체세포배발생 체계를 구축하기 위하여 잎 절편으로부터 캘러스 유도과 증식에 적합한 식물생장조절제를 선발하는 한편 캘러스 기원별로 체세포배 발생능을 검증하였다.

재료 및 방법

잎 절편으로부터 캘러스의 유도와 증식

개화기에 도달한 무스카리 (*M. armeniacum*) 'Early Giant' 품종의 잎 (10~12 cm)을 채취하여 흐르는 수돗물로 세척하고 증류수로 행군 후 70% 에탄올에 약 10초간 침지하였다. 멸균 증류수로 다시 2회 세척한 후 1% NaOCl 용액에서 15분간 교반하며 살균하였다. 처리된 잎을 멸균 증류수로 3회 세척한 후 멸균 건조된 여과지에서 물기를 제거하였다. 살균된 잎은 가로로 7~8 mm 크기로 자른 후 중륜 부위에 약간의 상처를 내었으며, 잎 뒷면이 위로 향하도록 무작위로 각각의 배지에 치상하였다. 캘러스 유도를 위한 배지는 1/2 Murashige와 Skoog (MS)(1962) 기본배지에 오옥신류인 1-naphthalene acetic acid (NAA), indole-3-propionic acid (IPA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 4-amino-3,5,6-tri-chloropicolinic acid (picloram) 및 3,6-dichloro-o-anisic acid (dicamba)를 0.1, 1.0, 2.0, 3.0 mg·L⁻¹가 되도록 농도를 달리하여 각각 첨가하는 한편 자당 30 g·L⁻¹와 한천 8 g·L⁻¹를 모든 배지에 동일하게 첨가하여 조제하였다. 배지의 pH는 멸균 전에 5.6으로 조정하였으며 멸균된 배지 25 mL를 60 × 15 mm 페트리접시에 분주하여 균한 후 접시당 5개 절편을 치상하였고 처리당 6 반복으로 하였다. 배양은 온도 25℃, 광도 50 μmol·m⁻²·s⁻¹ 하에서 16시간 일장조건으로 실시하였다. 배양 8주 후 캘러스 형성을 조사하였으며 형성된 캘러스 만을 취하여 동일한 조성의 배지로 이식하였다. 이식 6주 후 캘러스의 생장 정도를 조사하였다.

캘러스로부터 체세포배발생 유도

잎 절편으로부터 캘러스 발생율이 높고 증식 또한 양호했던 배지에서 유래된 10종의 캘러스 (Table 1. 캘러스 기호 A~J)를 1/2 MS를 기본배지로 하고 식물생장조절제 무첨가, NAA 0.01 mg·L⁻¹와 N⁶-benzylaminopurine (BAP), 6-Furfurylaminopurine (kinetin) 및 N-phenyl-N¹,2,3-thiadiazol-5-ylurea (TDZ)를 각각 0.1, 0.5, 1.0 mg·L⁻¹ 농도로 혼용 첨가한 총 10종의 배지에 배양하였다. 캘러스는 직경 5~6 mm 크기로 만들어 페트리접시당 다섯개씩 치상하였으며 처리당 3개 반복을 이용하였고 배양환경은 캘러스 유도시와 동일하게 하였다. 배양 14주 후 동일조성의 액체 배지를 각 페트리접시에 3mL씩 보충하였으며 배양 20주 후에 발생한 체세포배의 수를 조사하였다. 유도된 체세포배는 생장단계에 따라 구형, 편심장형, 편어뢰형, 초기자엽형, 중기자엽형, 후기자엽형, 초기맹아형, 중기맹아형 및 후기맹아형 등 9단계 (Fig. 3)로 구분하였다. 제1엽이 생장하고 유근이 신장한 체세포배는 상토를 채운 32공 플러그에 이식한 후 플라스틱 필름으로 덮어 습도를 유지하면서 생육시켰으며, 생육이 진행됨에 따라 상대습도를 점진적으로 낮추면서 기외 순화시켰다.

결과 및 고찰

무스카리 잎 절편으로부터 캘러스 유도와 생장에 미치는 오옥신의 효과

무스카리 'Early Giant' 잎 절편을 NAA, IPA, 2,4-D, picloram 및 dicamba 등 오옥신의 종류와 농도(0.1~3.0 mg·L⁻¹)를 달리한 총 21종의 배지에 치상하고 8주 후 캘러스 발생율을 조사한 결과 식물생장조절제 무첨가 배지를 제외하고는 근소한 차이가 있기는 했지만 모든 배지에서 85% 이상 높은 빈도로 부드러운 연녹색의 캘러스가 유기되었다 (Table 1, Fig. 1A). Suzuki와 Nakano (2001)는 무스카리 'Blue Pearl'의 잎, 화경, 인편 및 뿌리 절편을 배양했을 때 배지에 첨가한 오옥신 (NAA, 2,4-D, picloram), 배양한 절편의 종류 및 오옥신과 절편종류간 상호작용에 의하여 캘러스의 초기 발생이 영향을 받으며 잎 절편을 배양했을 때 약 75%의 최고 빈도로 캘러스가 유도되었다고 보고하였다. 무스카리 'Early Giant'를 식물재료로 이용하고 IPA와 dicamba를 추가한 본 실험에서도 언급한 'Blue Pearl'의 실험결과와 유사하게 최소 86.7%의 빈도로 캘러스가 유기되었다 (Table 1). 체세포배발생 캘러스 획득을 목표로 하는 기 보고된 많은 경우에 배지에 2,4-D를 첨가하지만 (Han and Kim 2009; Oh et al. 2007) 무스카리와 근연인 툼립 화경조직과 같이 몇몇 사례에서는 2,4-D에 비

Table 1 Effect of auxins on callus induction, somatic embryo formation and subsequent calli growth in leaf explant culture of *Muscari armeniacum* cv. Early Giant

Auxin (mg·L ⁻¹)		Callus induction (%)	Somatic embryo formation (%)	No. of somatic embryo/explant	Calli growth score ^z	Symbol for induced callus
Free		20.0 c ^y	51.3 b ^y	4.3 a ^y	0.3 f ^x	-
NAA	0.1	100.0 a	63.3 ab	3.7 ab	1.7 d	-
	1.0	100.0 a	45.0 d	1.7 cd	2.9 c	-
	2.0	100.0 a	26.7 f	0.5 e	2.9 c	-
	3.0	100.0 a	30.0 e	0.5 e	1.7 d	-
IPA	0.1	86.7 b	66.7 a	4.5 a	0.3 f	-
	1.0	86.7 b	71.0 a	4.3 a	1.0 e	-
	2.0	100.0 a	70.0 a	3.4 b	1.2 de	-
	3.0	100.0 a	56.7 b	3.1 b	1.7 d	-
2,4-D	0.1	93.3 b	53.7 b	2.5 c	0.9 e	-
	1.0	100.0 a	20.0 e	0.6 e	3.8 b	A
	2.0	100.0 a	- ^w	-	3.9 b	B
	3.0	100.0 a	10.0 f	0.2 e	3.9 b	C
picloram	0.1	100.0 a	3.3 g	0.5 e	4.8 a	D
	1.0	100.0 a	-	-	4.2 a	E
	2.0	100.0 a	-	-	3.8 b	F
	3.0	100.0 a	-	-	3.9 b	G
dicamba	0.1	100.0 a	41.4 d	2.2 c	3.1 bc	-
	1.0	100.0 a	-	-	4.2 a	H
	2.0	100.0 a	-	-	4.3 a	I
	3.0	100.0 a	-	-	4.2 a	J

^zScore for callus growth. 0, non; 1, very poor; 2, poor; 3, moderate; 4, vigorous; 5, very vigorous.

^yMean separation within this column by Duncan's multiple range test at $P=0.05$ ($n=6$)

^xMean separation within this column by Duncan's multiple range test at $P=0.05$ ($n=3$)

^wNo somatic embryo formation

해 picloram이 캘러스 유기에 더 효과적이다 (Ptak and Bach 2007). 무스카리 'Blue Pearl' (Suzuki and Nakano 2001) 과 본 연구의 'Early Giant'의 경우도 마찬가지로 picloram 이 2,4-D에 비해 잎 절편으로부터 캘러스 유기 또는 다음 실험에서 보여주는 바와 같이 캘러스의 연속적 성장에 효과적인데 (Table 1), 이러한 picloram의 효과가 *M. armeniacum* 종에 일반적인 현상인지는 다양한 유전자형을 대상으로 검토가 필요할 것으로 사료된다.

잎 절편 배양 8주 후 모조식을 제외한 캘러스 만을 동일한 조성의 배지로 이식하여 지속생장을 도모하였고 캘러스 이식 6주 후에 그 성장 정도를 조사하였다. NAA와 IPA 첨가배지에서 연속적으로 배양된 캘러스는 그 생장이 빈약했던 반면, 2,4-D, picloram 및 dicamba를 첨가한 배지에서 유도하고 성장한 캘러스는 2,4-D 0.1 mg·L⁻¹ 첨가 배지에서 유기 및 이식된 것을 제외하고는 대부분의 배지에서 흰색의 부스러지기 쉬운 캘러스 (white friable callus: WF 캘러스) 형태로 왕성하게 성장하였다 (Table 1,

Fig. 1 Callus induction, growth and somatic embryo development in *M. armeniacum* cv. Early Giant. A, callus induction from leaf explants; B, callus growth after sub-culturing; C, somatic embryo development (arrows) from callus

Fig. 1B). 비록 NAA와 IPA를 첨가한 배지에서 배양된 캘러스도 전형적인 WF 형태를 보였지만 생장이 극히 빈약하여 다음 실험을 위한 재료로 사용하지 않았다. 무스카리 ‘Blue Pearl’의 경우는 NAA 첨가배지에만 유일하게 배발생능이 양호한 WF 캘러스가 획득되어 (Suzuki and Nakano 2001) 본 실험 결과와는 차이를 보였는데, 본 실험에서는 NAA 보다 오히려 2,4-D, picloram 및 dicamba 처리가 WF 캘러스 획득에 효과적이었다. 이러한 차이는 식물 절편의 채취시기, 배양조건 및 식물생장조절제에 대한 유전자형에 따른 차이 (Lucau-Danila et al. 2010; Zeynali et al. 2010) 등 다양한 원인에 기인한 것으로 사료된다.

캘러스의 기원과 식물생장조절제가 무스카리 체세포배발생에 미치는 영향

무스카리 ‘Early Giant’ 품종의 잎 절편 배양에서 캘러스 유기율이 높고 동일한 배지로 이식하였을 때 성장 역시 양호했던 10종의 캘러스 (Table 1. 캘러스 기호 A~J)를 구분하여 식물생장조절제 무첨가, NAA 0.01 mg·L⁻¹와 BAP, kinetin 및 TDZ를 각각 0.1, 0.5, 1.0 mg·L⁻¹ 농도로 혼용 첨가한 총 10종의 배지로 이식 (총 100처리)하였다. 배양 10주경부터 캘러스 표면에서 체세포배가 관찰되기 시작하였으며 배양 14주경에는 체세포배 발생율에 대한 처리간 차이를 구분할 수 있을 정도로 체세포배가 성장하였다 (Fig. 1C). 배양 20주 후 최종적으로 체세포배 발생율을

조사하였는데 (Fig. 2) 고농도 (1.0, 2.0, 3.0 mg·L⁻¹)의 picloram 첨가배지에서 유기 및 성장한 캘러스 (기호 E, F, G)는 모든 배지에서 극히 저조한 빈도로 체세포배가 발생 (0.0~1.5개/캘러스 덩어리)한 반면 저농도 (0.1 mg·L⁻¹) picloram 첨가배지 유래 캘러스 (기호 D)는 TDZ 첨가배지를 제외하고는 상당한 빈도(4.5~9.5개/캘러스 덩어리)로 체세포배가 유기되었다. 또한 캘러스 기원과는 무관하게 TDZ 첨가배지에서의 체세포배 발생율은 극히 저조 (0.0~1.2개/캘러스 덩어리)하였는데 이는 동일 농도에서 다른 시토키닌류에 비해 TDZ가 지나치게 높은 활성을 가짐으로써 체세포배 발생이 억제된 결과로 사료된다. 따라서 급 후 낮은 농도 수준에서 체세포배 발생에 미치는 TDZ의 효과가 검토되어야 할 것으로 판단된다. 무스카리 ‘Blue Pearl’의 잎 절편에서 유래된 WF캘러스의 경우는 BAP 첨가 배지로 이식하였을 때 식물생장조절제 무첨가 배지에 비해 심하게 체세포배 발생이 억제되는 (Suzuki and Nakano 2001) 반면, 본 연구에서의 BAP는 캘러스 기원에 따라 체세포배 발생에 미치는 효과에 다양한 변이를 보였다. 캘러스 기원에 따른 이러한 반응의 차이는 캘러스가 어떠한 배양 환경을 거쳐 성장되어 왔는가 즉, 캘러스 유도 과정 중의 배양환경이 캘러스의 생리적 속성에 영향을 미침으로써 다음 단계의 체세포배 발생 과정에도 역시 영향을 미친다는 것을 시사한다고 할 수 있다 (Han et al. 2008). 따라서 무스카리에 있어 캘러스 단계를 거쳐 체세포배발생을 유도할 경우 초기 캘러스 유도단계에서부터

Fig. 2 Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis of *Muscari armeniacum* cv. Early Giant depending on callus source

Fig. 3 Stereoscopic observation of somatic embryogenesis from callus culture of *Muscari armeniacum* cv. Early Giant. A. globular embryo; B. biased heart embryo; C. biased torpedo embryo; D. early cotyledonary embryo; E. middle cotyledonary embryo; F. late cotyledonary embryo; G. early sprouting embryo; H. middle sprouting embryo; I. late sprouting embryo; J. rooting aspect in acclimatized plantlets

체세포배 발생능의 최적화에 주의를 기울여 배양환경을 조절할 필요가 있다고 판단된다. 본 연구에서는 무스카리 ‘Early Giant’ 품종의 잎 절편을 picloram $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 첨가배지에서 배양하여 캘러스를 유도하고 증식한 후 BAP $0.5 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 첨가배지로 이식하였을 경우 캘러스 덩어리당 8.4–9.3개의 높은 빈도로 체세포배를 획득할 수 있었다.

한편, 쌍자엽식물의 기내 체세포배발생은 전형적으로 구형배, 심장형배, 어뢰형배 및 자엽형배순서를 거쳐 발생하므로 신탁 재분화와는 확연하게 구분이 가능하다 (Chung et al. 1995). 그러나 단자엽 식물, 특히 구근 단자엽류는 경우에 따라 소구근이 형성되므로 해부학적 검증을 하지 않을 경우 육안으로 체세포배발생과 신탁 재분화를 구분하기가 어려운 경우가 종종 있다 (Dodeman et

al. 1997; Suzuki and Nakano 2001). 따라서 본 연구에서는 캘러스의 체세포배 발생 유도 배지 이식 후 10주경부터 캘러스 표면에서 발생하는 체세포배를 추적 관찰함으로써 체세포배 발생을 총 9단계로 구분하였다 (Fig. 3A–3I).

무스카리 체세포배 구형배 (Fig. 3A)는 쌍자엽식물의 경우와 큰 차이를 나타내지 않았지만 발생이 진행됨에 따라 편생장하여 쌍자엽식물과는 차이가 있는 편심장형 (Fig. 3B)과 편어뢰형 (Fig. 3C) 배로 발달하였다. 자엽형배는 자엽의 구부러짐 정도, 녹화 정도 및 자엽기부 홈의 크기 등에 따라 그 발달 단계를 초기, 중기 및 후기 (Fig. 3D–F)로 세분할 수 있었고 자엽형 배가 완전히 발달한 이후, 성장점 부근에서 원통형 잎의 성장 정도에 따라 다시 세가지 단계로 세분할 수 있는 맹아형 배 (Fig. 3G–I)로 발달하였다. 또한 유근의 분화는 대부분 맹아가 뚜렷해지는 시점부터 관찰되었다. 본 연구에서 관찰하고 구분한 무스카리 체세포배의 발달단계는 기 보고된 어뢰형배까지의 해부학적 관찰 결과 (Suzuki and Nakano 2001)와 일치하는 것이고, 자엽형 체세포배와 맹아형 체세포배까지를 포함하여 일련의 체세포배 발달단계를 보다 세분화하여 제시하였다는데 의미가 있을 것으로 사료된다. 한편, 기내에서 유근이 완전히 성장한 맹아형 배는 한천을 완전히 제거한 후 상토가 담긴 플러그 트레이로 이식하고 충분히 관수하였다. 유식물체를 심은 트레이는 플라스틱 필름으로 밀봉한 후 시간이 경과함에 상대습도를 낮추고 광도를 높여줌으로써 순화를 유도하였고 모든 식물체가 어려움 없이 성공적으로 순화되고 성장하였다 (Fig. 3J).

적 요

수요가 증가하고 있는 단자엽 구근 화훼작물인 무스카리 (*Muscari armeniacum* Leichtl. Ex Bak.) ‘Early Giant’ 품종의 캘러스를 재료로 체세포배발생을 통한 기내 대량증식 체계를 확립하기 위하여 본 연구를 수행하였다. 잎 절편을 1-naphthalene acetic acid (NAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 등 오옥신이 $0.1 \sim 3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 첨가된 배지에 배양하여 모든 배지에서 부드러운 옅은 연두색 캘러스를 고빈도로 유기하였지만 유기된 캘러스를 동일한 조성의 배지로 이식하였을 때 2,4-D, 4-amino-3,5,6-tri-chloropicolinic acid (picloram) 및 3,6-dichloro-o-anisic acid (dicamba) 첨가배지에서만 증식이 양호하게 이루어졌다. 비록 체세포배발생의 빈도가 캘러스의 기원과 배발생 유도 배지의 식물생장조절제 구성에 따라 차이가 있기는 했지만 식물생장조절제 무첨가 배지를 비롯하여 N^6 -Benzylaminopurine (BAP) 등 다양한 시토키닌과 NAA $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 가 혼용된 배지에서 체세포배가 유기되었다. 무스카리 잎 절편을 picloram

0.1 mg·L⁻¹ 배지에 치상하여 캘러스를 유기하고 동일한 배지로 이식하여 증식한 후 NAA 0.01 mg·L⁻¹와 BAP 0.5 mg·L⁻¹ 혼용배지로 이식했을 때 최고빈도인 캘러스 덩어리당 9.3개의 체세포배를 획득할 수 있었다. 또한 무스카리 체세포배는 구형, 편심장형, 편어뢰형, 초기 자엽형, 중기 자엽형, 후기 자엽형, 초기 맹아형, 중기 맹아형 및 후기 맹아형배 등 총 9단계로 그 외형이 뚜렷이 구분되었다.

인용문헌

- Bae HC, Ahn HG, Park SK, Yue WM, Jung WY, Chang YD, Choi ST (2000) Effect of scaling time and scale position on bulblet formation in scaling of *Muscari armeniacum* 'Early Giant'. J Kor Soc Hort Sci 41:93-95
- Choi ST, Park SK, Jung WY, Ahn HG, Park IH, Chang YD, Kim ST (2000) Effect of leaf cutting time and leaf part on bulblet formation of *Muscari armeniacum* 'Early Giant'. J Kor Soc Hort Sci 41:87-89
- Chung JD, Han JS, Sohn JK (1995) Somatic embryogenesis from filament-derived callus of *Paeonia lactiflora* Pall. Korean J Plant Tissue Culture 22:47-51
- Dodeman VL, Ducreux G, Kreis M (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. J Experiment Bot 48:1493-1509
- Han JS, Kim JH (2009) Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from plumules of hot pepper seedlings. Kor J Hort Sci & Technol 27:482-488
- Han JS, Yoon MK, Jeong M (2008) Effects of a variety of treatments affecting Chinese cabbage protoplast culture, and plant regeneration from protoplast-derived callus. Korean J Plant Biotechnol 35:235-243
- Hartmann HT, Kester DE, Davies FTJ (1990) Plant propagation, principles and practices. Prentice Hall pp 205-206
- Li D, Zhao K, Xie B, Zhang B, Luo K (2003) Establishment of a highly efficient transformation system for pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Rep 21:785-788
- Lucau-Danila A, Laborde L, Legrand S, Huot L, Lemoine Y, Hilbert JL, Hawkins S, Quillet MC, Hendriks T, Blervacq AS (2010) Identification of novel genes potentially involved in somatic embryogenesis in chicory (*Cichorium intybus* L.). BMC Plant Biol 10:122
- Murashige T, Skoog FA (1962) Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497
- Nakano M, Tanaka S, Kagami S, Saito H (2005) Plantlet regeneration from protoplasts of *Muscari armeniacum* Leichtl. ex Bak. Plant Biotechnol 22:249-251
- Navalinskienė M, Samuitienė M (2001) Viruses affecting some bulb and corm flower crops. Biologija 4:40-42
- Oh MJ, Min SR, Liu JR, Kim SW (2007) Plant regeneration from floral stem cultures of *Nymphoides indica* (L.) O. Kuntze. via somatic embryogenesis. J Plant Biotechnol 34:7-10
- Park S, Morris JL, Park JE, Hirschi KD, Smith RH (2003) Efficient and genotype-independent *Agrobacterium*-mediated tomato transformation. J Plant Physiol 160:1253-1257
- Park SK, Ahn HG, Jung HY, Chang YD, Kim ST, Park IH, Choi ST (2000) Effect of leaf order and position on bulblet formation in leaf cutting of *Muscari armeniacum* 'Early Giant'. J Kor Soc Hort Sci. 41:90-92
- Peck DE, Cumming BG (1986) Beneficial effects of activated charcoal on bulblet production in tissue cultures of *Muscari armeniacum*. Plant Cell Tiss Org Cult 6:9-14
- Ptak A, Bach A (2007) Somatic embryogenesis in tulip (*Tulipa gesneriana* L.) flower stem cultures. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 43:35-39
- Suzuki S, Nakano M (2001) Organogenesis and somatic embryogenesis from callus cultures in *Muscari armeniacum* Leichtl. ex Bak. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 37:382-387
- Suzuki S, Nakano M (2002) *Agrobacterium*-mediated production of transgenic plants of *Muscari armeniacum* Leichtl. ex Bak. Plant Cell Rep 20:835-841
- Suzuki S, Nakano M (2003) Effect of antibiotics and bioglyphos on the growth and development of embryogenic callus cultures of *Muscari armeniacum*. Biol Plantarum 47:425-427
- Zeynali M, Zanjani BM, Amiri ME, Noruzian M, Aghajari SM (2010) Influence of genotype and plant growth regulator on somatic embryogenesis in rapeseed (*Brassica napus* L.). African J Biotechnol 9:4050-4055