ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 24 : 332 - 338 (2533)

การเกิดเอมบริออยด์ และเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลือง

Embryogenesis and Plant Regeneration from Immature Cotyledon Culture Soybean

สนธิชัย จันทร์เปรม รัชนี ธีระพจนารถ และ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ [1]

Sontichai Chanprame, Rachanee Therapotchanart and Peerasak Srinives

ABSTRACT

Young soybean cotyledons of various sizes were cultured on MS basic medium added with B-5, vitamins, NAA and other growth regulators at various concentrations. It was found that modified MS medium plus 7.5 to 10.0 mg/l NAA and 15 gm/l sucrose induced best embryoid formation. No effect was detected from other growth promoters or amino acids (such as casein hydrolysate) used in the experiment. Culture growth responses were also varietal dependent. It was observed that culture of ' SJ4 ' cotyledon had the highest frequency of embryoid formation.

บทคัดย่อ

การนำใบเลี้ยงอ่อนของเมล็ดถั่วเหลืองขนาดต่าง ๆ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS พื้นฐาน ที่เติมไวตามินสูตร B-5, NAA และสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่น ๆ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อศึกษาถึงผลของชนิดและความเข้มข้นของสารเหล่านั้น ต่อการชักนำให้เกิด embryoid พบว่า อาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม NAA 7.5 ถึง 10.0 มก./ล. น้ำตาล 15 ก./ล. สามารถชักนำให้เกิด embryoid ได้ดีที่สุด โดยไม่จำเป็นต้องเพิ่มสารอื่น (เช่น casein hydrolysate) ลงในอาหาร ทั้งยังพบว่าการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงนั้น ส่วนหนึ่งเกิดจากพันธุกรรมด้วย โดยถั่วเหลืองพันธุ์ ' สจ.4 ' ให้ความถี่ในการเกิด embryoid สูงสุด

คำนำ

ถั่วเหลืองได้ชื่อว่าเป็นพืชที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและบังคับให้เกิดต้นใหม่ได้ยากที่สุดพืชหนึ่ง จึงมีนักวิทยาศาสตร์จำนวนมากพยายามศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลือง จนสามารถทำได้สำเร็จ โดยพบว่ามีปัจจัยหลายประการที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ (1) ชนิดและความเข้มข้นของสารเร่งการเจริญเติบโต ซึ่งส่วนใหญ่เป็น NAA หรือ 2,4-D (Barwale *et al,* 1986; Lazzeri *et al,* 1987 a; Li *et al,* 1985; Lippmann and Lippmann 1984) (2) พันธุกรรม (Komat-

[1] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

Dept. of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

suda and Ohyama, 1988) (3) ธาตุอาหาร ปัจจัยทางกายภาพและเคมี (Lazzeri *et al,* 1987 a และ b) (4) ลักษณะการวางชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อบนอาหารเพาะเลี้ยง (Hartweck *et al,* 1988) จนถึงปัจจุบันมีรายงานจำนวนมากในต่างประเทศแสดงถึงความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลืองและการชักนำให้เกิดต้น โดยผ่านแคลลัสทั้ง organogenesis และ embryogenesis (Barwale *et al,* 1986; Ghazi *et al,* 1986; Lazzeri *et al,* 1985; Ranch *et al,* 1985)

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้ เพื่อศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งเสริมให้เกิด embryogenesis จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อน และการชักนำให้เป็นต้นของถั่วเหลือง

อุปกรณ์และวิธีการ

พืชทดลอง ใช้เมล็ดถั่วเหลือง 4 พันธุ์ คือ พันธุ์ส่งเสริมของไทย 3 พันธุ์ ได้แก่ ' สจ.4 ' ' สจ.5 ' ' นว.1 ' และพันธุ์จากประเทศเวียดนาม 1 พันธุ์ คือ ' MTD 22 ' ปลูกในแปลงทดลองจนกระทั่งติดฝักอ่อน จึงเก็บฝักมาใช้ในการทดลอง

การเพาะเลี้ยง นำฝักอ่อนของถั่วเหลืองทั้ง 4 พันธุ์ มาล้างน้ำที่ใส่ผงซักฟอกลงไปเล็กน้อย เพื่อขจัดเศษดินและสิ่งสกปรกอื่น ๆ ที่ติดอยู่ตามเปลือกของฝักให้หมดไป หลังจากล้างน้ำสะอาดแล้วจึงแกะเอาเมล็ดที่อยู่ภายในออก แยกเป็น 2 พวก พวกแรกเป็นเมล็ดอ่อนที่มีขนาด 3 ถึง 5 มม. อีกพวกมีขนาด 5 ถึง 8 มม. นำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 10% นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อ 3 ครั้ง จึงนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่มีองค์ประกอบของสารอนินทรีย์ตามสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) และไวตามินตามสูตร B-5 (Gamborg *et al,* 1968) โดยเติม NAA ความเข้มข้นตั้งแต่ 5 ถึง 25 มก./ล. น้ำตาล 10 ถึง 30 ก./ล. และ casein hydrolysate 0 ถึง 1,000 มก./ล. เนื้อเยื่อที่ใช้เพาะเลี้ยงคือ ส่วนใบเลี้ยงอ่อนที่แยกเอาเปลือกหุ้มเมล็ดและ embryonic axis ออกแล้ว

เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงถูกเก็บไว้บนชั้นที่ได้รับแสงจากหลอดฟลูออเรสเซน ความเข้มประมาณ 1,000 lux เป็นเวลา 23 ชม. ต่อวัน และอุณหภูมิห้อง 27 ± 1 องศาเซลเซียส เก็บข้อมูลหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ผล

ขนาดของใบเลี้ยงและความเข้มข้นของ NAA ที่มีผลต่อการเกิด embryoid ใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 ทั้ง 2 กลุ่มขนาดที่ถูกเพาะเลี้ยงเริ่มเจริญเติบโตเป็น embryoid ขึ้นรอบ ๆ บริเวณขอบของใบเลี้ยง 7 ถึง 10 วัน หลังการเพาะเลี้ยง embryoid มีลักษณะเป็นก้อนกลม ๆ สีเขียวในระยะแรก และจะยาวขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงนานขึ้น ใบเลี้ยงที่มีขนาด 3 ถึง 5 มม. สามารถเจริญขึ้นเป็น embryoid ได้มากกว่าใบเลี้ยงขนาด 5 ถึง 8 มม. ในทุกความเข้มข้นของ NAA ดังแสดงใน Table 1 ความเข้มข้นของ NAA ที่สามารถชักนำให้เกิด embryoid ได้มากที่สุดคือ 10 มก./ล. เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NAA ขึ้นจะเกิด embryoid น้อยลง ขนาดเล็กลง และใบเลี้ยงอ่อนมีแนวโน้มจะเกิดเป็นแคลลัสมากขึ้น

จากการทดลองนี้พบว่า NAA ความเข้มข้นต่ำที่สุดคือ 10 มก./ล. และใบเลี้ยงขนาด 3 ถึง 5 มม. เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยง จึงทำการทดลองเพิ่มเติมโดยใช้ความเข้มข้นของ NAA 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 และ 15.0 มก./ล. มาเพาะเลี้ยง โดยใช้ใบเลี้ยงขนาด 3 ถึง 5 มม. ได้ผลดังแสดงไว้ใน Table 2 ซึ่งพบว่า NAA ความเข้มข้น 5.0 มก./ล. ชักนำให้เกิด embryoid ได้สูงสุด แต่ embryoid ส่วน

ใหญ่มีขนาดเล็กมาก (เล็กกว่า 1 มม.) ในขณะที่ NAA ความเข้มข้น 7.5 มก./ล. ชักนำให้เกิด embryoid จำนวนน้อยกว่าความเข้มข้น 5.0 และ 10.0 มก./ล. แต่ embryoid มีลักษณะสมบูรณ์ดี โดย embryoid ที่ได้จะมีขนาดใหญ่ สีเขียวสด มีรูปร่างค่อนข้างยาว และยังสามารถเกิดเป็นต้นใหม่ได้มากที่สุดด้วย ส่วน embryoid ที่เกิดจาก NAA ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 มก./ล. ขึ้นไปจะไม่สามารถเจริญเป็นต้นได้ และมักเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หรือเกิดรากขึ้นในสัปดาห์หลัง ๆ ของการเพาะเลี้ยง

Table 1 Callus and embryoid formation after immature soybean SJ5 cotyledons cultured under 4 concentrations of NAA for 4 weeks.

Conc. of NAA (mg/l)	10		15		20		25	
Cot. diam. (mm)	3-5	5-8	3-5	5-8	3-5	5-8	3-5	5-8
No. of cotyledons	32	74	59	48	35	61	20	88
No. of embryoids	23	-	21	7	1	1	1	-
# Embryoids/cot.	0.72	0	0.36	0.15	0.03	0.02	0.05	0
Callus formation[1]	+ +	+	+ +	+	+ + +	+ +	+ + + +	+ +

[1] +, + +, + + +, + + + + represent little, moderate, good, and very good callus formation, respectively.

Table 2 Effect of NAA concentration on embryoid production of soybean SJ5-immature cotyledons.

Characters observed	NAA concentration (mg/l)				
	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0
No. of cotyledons	109	130	112	103	115
No. of embryoids	238	211	224	117	3
# Embryoids/cot.	2.18	1.62	2.00	1.14	0.03
No. of plantlets	4	12	-	-	-
Callus formation[1]	+	+	+	+ +	+
Root formation[1]	+	+	+	+	+
Embryoid segregation[2]	+ + + +	+ + +	+ +	+ +	+

[1] +, + + represent little and moderate callus or root formation.

[2] +, + +, + + +, + + + + indicate that the cultured explants produced embryoids at the rate < 40%, 40-60%, 60-80% and > 80%, respectively.

ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเกิด embryoid ใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA 7.5 มก./ล. กับน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 10, 15, 20, 25 และ 30 ก./ล. พบว่า น้ำตาลที่ความเข้มข้น 15 ก./ล. สามารถชักนำให้เกิด embryoid ได้มากที่สุด (Table 3) และมีลักษณะสมบูรณ์กว่าที่ความเข้มข้นอื่น embryoid ที่ได้จากอาหารที่เติมซูโครส 10 ก./ล. นั้นจะให้ผลใกล้เคียงกับที่ 15 ก./ล. แต่จะมีความสมบูรณ์น้อยกว่า และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลให้สูงขึ้นอีก จำนวน embryoid ที่เกิดขึ้นจะลดลง และมักจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในภายหลัง และที่ความเข้มข้น 30 ก./ล. พบว่า embryoid จำนวนมากที่เกิดขึ้นเจริญไปเป็นแคลลัส การย้าย embryoid ลงเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดการพัฒนา เป็นต้น จึงควรทำก่อนสัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง

ผลของ casein hydrolysate ต่อการเกิด embryoid ในการศึกษาสารบางชนิดที่สามารถส่งเสริมการเกิด embryoid ให้มากขึ้น ได้ทดลองใส่ casein hydrolysate ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนลงในอาหารเพาะเลี้ยง ในปริมาณ 0 ถึง 1,000 มก./ล. โดยใช้ใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลืองพันธุ์ นว.1 และ สจ.4 ขนาด 3–5 มม. ดัง Table 4 พบว่า การตอบสนองต่อความเข้มข้นของ casein hydrolysate อัตราต่าง ๆ ของถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ มีแนวโน้มเหมือนกันคือ เมื่อใส่ casein hydrolysate มากขึ้น การเกิด embryoid มีแนวโน้มลดลง มีขนาดเล็กลง และมีการพัฒนาได้ช้ามาก ขณะที่อาหารสูตรที่ไม่มี casein hydrolysate จะให้ embryoid ขนาดใหญ่และแข็งแรงกว่า อย่างไรก็ตามพันธุ์ นว.1 ที่เลี้ยงในอาหารที่มี casein hydrolysate 200 และ 400 มก./ล. มีต้นใหม่พัฒนาขึ้น

ผลของพันธุกรรมที่มีต่อการเกิด embryoid ใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลือง 4 พันธุ์ พบว่า ถั่วเหลืองทั้ง 4 พันธุ์ ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงคล้ายคลึงกันในแง่ของจำนวน embryoid เฉลี่ย โดยพันธุ์ สจ.5 มีแนวโน้มให้ค่าเฉลี่ยต่ำกว่าพันธุ์อื่น (Table 5) ในขณะที่พันธุ์ สจ.4 มีแนวโน้มให้จำนวน embryoid สูงสุด แต่ embryoid ที่ได้มีขนาดเล็ก และมักจะพัฒนาไปเป็นรากในที่สุด ส่วนพันธุ์ MTD 22 นั้นให้ embryoid ที่มีขนาดเล็กมาก และมีแนวโน้มจะพัฒนาไปเป็นแคลลัสมากที่สุดด้วย อย่างไรก็ตาม พันธุ์ สจ.4 สจ.5 และ นว.1 มีความสามารถในการพัฒนาเป็นต้น ไม่ต่างกันนัก

Table 3 Effect of sucrose concentration on embryoid formation of soybean SJ5 after 4 weeks of culturing.

Characters observed	Sucrose concentration (g/l)				
	10	15	20	25	30
No. of cotyledons	126	116	121	126	126
No. of embryoids	110	126	89	86	65
# Embryoids/cot.	0.87	1.09	0.74	0.68	0.52
Callus formation[1]	+ +	+ +	+ +	+ +	+ + +

[1] + + and + + + represent moderate and good callus formation.

Table 4 Effect of casein hydrolysate (CH) concentration on promotion of embryoid production in soybean NW1 and SJ4.

Conc. of CH (mg/l)	0		200		400		600		800		1,000	
Cultivars	NW1	SJ4	NW1	SJ4	NW1	SJ4	NW1	SJ4	NW1	SJ4	NW1	SJ4
No. of cotyledons	72	54	54	123	72	129	54	165	48	138	93	159
No. of embryoids	75	30	72	63	57	90	69	54	36	57	36	99
# Embryoids/cot.	1.04	0.56	1.33	0.51	0.79	0.70	1.28	0.33	0.75	0.41	0.39	0.62
No. of planlets	-	-	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Callus formation [1]	+ +	+ +	+ +	+ + +	+ +	+ +	+	+	+	+	+	+
Size of embryoid [2]	b	b	b	b	d	c	e	e	f	f	f	f

[1] +, + +, + + + represent little, moderate, and good callus formation, respectively.

[2] a,b,c,d,e represent more than 80%, 60-80%, 40-60%, 20-40%, of embryoids are equal to or larger than 2 mm in diameter, respectively.

f represents all of embryoids are smaller than 2 mm.

Table 5 Embryoid formation of 4 soybean genotypes on MS culture medium having Gamborg's B-5 vitamins, 7.5 g/l NAA and 15 g/l sucrose.

Characters observed	Soybean genotypes			
	SJ4	SJ5	NW1	MTD22
No. of cotyledons	188	148	128	86
No. of embryoids	135	78	80	57
# Embryoids/cot.	0.72	0.52	0.67	0.66
No. of plantlets	2	3	1	-
Callus formation[1]	+ +	+	+	+
Size of embryoid[2]	c	a	c	d

[1] + and + + represent little and moderate callus formation.

[2] a,b,c,d,e represent more than 80%, 60-80%, 40-60%, 20-40% of embryoids are equal to or larger than 2 mm in diameter, respectively.

วิจารณ์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลืองซึ่งประสบความสำเร็จในระยะหลัง ๆ นี้ มีรายงานว่าใช้เนื้อเยื่อเริ่มต้นจากใบเลี้ยงอ่อนเป็นส่วนใหญ่ แต่ขนาดเมล็ดที่ใช้ยังแตกต่างกันอยู่บ้าง เช่น Barwale *et al* (1986) ใช้ขนาด 5 ถึง 10 มม. ในขณะที่ TCCP (1987) แนะนำให้ใช้ 2 ถึง 10 มม. การใช้ขนาดของใบเลี้ยงหรือ embryo เป็นเกณฑ์ในการเลือกเนื้อเยื่อ อาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนได้ ทั้งนี้เนื่องจากถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์มีขนาดของเมล็ดไม่เท่ากัน การพัฒนาของเมล็ดในเวลาเท่า ๆ กัน ถั่วที่มีขนาดเมล็ดใหญ่กว่าย่อมมีขนาดของใบเลี้ยงใหญ่กว่าถั่วที่มีขนาดเล็ก การใช้อายุของเมล็ดหลังดอกบาน เป็นเกณฑ์กำหนดความเหมาะสมของเนื้อเยื่อถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ อาจจะได้ผลดีกว่า

สำหรับการทดลองครั้งนี้ ใบเลี้ยงที่มีขนาดเล็ก (3 ถึง 5 มม.) ตอบสนองได้ดีกว่าขนาดใหญ่ (5 ถึง 8 มม.) ซึ่งเมื่อเทียบกับของ Barwale *et al* (1986) และ TCCP (1987) แล้ว ใบเลี้ยงในการทดลองนี้มีขนาดค่อนข้างเล็ก แต่ถ้าใช้ใบเลี้ยงขนาดใหญ่ขึ้น พบว่าใบเลี้ยงมีขนาดเพิ่มขึ้นในขวดเพาะเลี้ยงโดยไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างอื่น ในทางกลับกัน ถ้าใบเลี้ยงที่ใช้มีขนาดเล็กเกินไป มักเกิดเป็นแคลลัสขึ้นแทน หรืออาจไม่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงเลย (ไม่ได้แสดงข้อมูลไว้) จึงเป็นไปได้ว่าขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของพันธุ์ที่ใช้ด้วย ดังเช่นการทดลองของ Komatsuda and Ohyama (1988) ซึ่งใช้ถั่วเหลือง 2 พันธุ์จาก *Glycine max* และ 4 พันธุ์จาก *G. gracilis* พบความแตกต่างระหว่าง genotype ในความสามารถของการ regenerate อย่างชัดเจน

สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงถั่วเหลืองกันมากมีอยู่ 2 ชนิด คือ 2,4-D และ NAA สำหรับ 2,4-D นั้น ความเข้มข้นที่ใช้อยู่ในช่วง 2 ถึง 5 มก./ล. แต่ embryoid ที่ได้มักมีความผิดปกติมาก (Lazzeri *et al*, 1985) ส่วน NAA มักใช้ที่ความเข้มข้น 8 ถึง 10 มก./ล. และได้ embryoid ที่ปกติมากกว่า การทดลองนี้จึงเลือกใช้ NAA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้น 10 มก./ล. นั้น สามารถชักนำให้เกิด embryoid ได้มากที่สุด แต่ embryoid มักเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอย่างรวดเร็ว และเกิดต้นน้อยกว่าเมื่อเทียบกับที่ NAA ความเข้มข้น 7.5 มก./ล. ซึ่งที่ความเข้มข้นนี้ได้ต้นมากกว่า แต่เกิด embryoid น้อยกว่าที่ 10 มก./ล. อย่างไรก็ตาม NAA ความเข้มข้น 7.5 มก./ล. นี้ เป็นความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกับผลการทดลองของ Barwale *et al* (1986) ซึ่งใช้ NAA 43 uM (ประมาณ 8 มก./ล.)

การเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสขึ้น การเกิด embryoid จะมีแนวโน้มลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของ osmotic pressure ภายในอาหารเพาะเลี้ยงนั่นเอง ซึ่งทำให้เนื้อเยื่อดูดซับธาตุอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตเข้าไปใช้ได้น้อยลง และเนื้อเยื่ออาจสูญเสียสารบางอย่างภายในเซลไปเนื่องจากผลของ plasmolysis ด้วย และความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 15 ก./ล.

จากการทดลอง ทำให้ทราบถึงวิธีการและปัจจัยที่จำเป็นสำหรับการชักนำให้เกิด embryogenesis จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของถั่วเหลือง พันธุ์ สจ.4 สจ.5 และ นว.1 คือ การใช้อาหารพื้นฐานที่มีสารอนินทรีย์ตามสูตร MS ผสมกับไวตามินตามสูตร B-5 และเติม NAA ความเข้มข้น 7.5 ถึง 10.0 มก./ล. ร่วมกับซูโครส 15 ก./ล. โดยใช้ใบเลี้ยงที่มีขนาดไม่เกิน 5 มม. แต่ต้นที่ได้มักอ่อนแอโดยใบจะเหลืองและร่วงหลุดไป ถ้าเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมที่ไม่มีสารเร่ง

การเจริญเติบโต การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของ embryoid และต้นกล้าจึงเป็นสิ่งที่ต้องกระทำต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Barwale, U.B., H.R. Kerns and J.M. Widholm. 1986. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. Planta 167 : 473 - 481.

Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirement of suspension culture of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50 : 151 - 158.

Ghazi, T.D., H.V. Cheema and M.W. Nabors. 1986. Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryogenic callus of soybean, *Glycine max* L. Plant Cell Rep. 5 : 452 - 456.

Hartweck, L.M., P.A. Lazzeri, D. Cui, G.B. Collins and E.G. Williams. 1988. Auxin-orientation effects on somatic embryogenesis from immature soybean cotyledon. *In Vitro* Cell. & Develop. Biol. 24 : 821 - 828.

Komatsuda, T. and K. Ohyama. 1988. Genotype of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean *Glycine max*. Theor. Appl. Genet. 75 : 695 - 700.

Lazzeri, P.A., D.F. Hildebrand and G.B. Collins. 1985. A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. Plant Mol. Biol. Rep. 3 : 160 - 168.

Lazzeri, P.A., D.F. Hildebrand and G.B. Collins. 1987a. Soybean somatic embryogenesis : Effects of hormones and culture manipulation. Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 10 : 197 - 208.

Lazzeri, P.A., D.F. Hildebrand and G.B. Collins. 1987b. Soybean somatic embryogenesis : Effects of nutritional, physical and chemical factors. Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 10 : 209 - 220.

Li, B.J., W.H.R. Langridge and A.A. Szalay. 1985. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in the soybean *Glycine max*. Plant Cell Rep. 4 : 344 - 347.

Lippmann, B. and G. Lippmann. 1984. Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean *Glycine max*. Plant Cell Rep. 3 : 215 - 218.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 : 473 - 497.

Ranch, J.P., L. Oglesby and A.C. Zielinski. 1985. Plant regeneration from embryo derived tissue cultures of soybeans. *In Vitro* Cell. & Develop. Biol. 21 : 653-658.

TCCP (Tissue Culture for Crops Project). 1987. Progress Report. Colorado State University. 87 p.