

두릅나무 15개체의 체세포배 유도 및 식물체 재분화에 미치는 유전자형의 효과

문홍규* · 홍용표¹ · 김용욱 · 이재순
임업연구원 생물공학과, ¹유전생리과

Genotype Effect on Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of 15 *Aralia elata*

MOON, Heung Kyu* · HONG, Yong-Pyo¹ · KIM, Yong Wook · LEE, Jae Soon
Biotechnology Div., and ¹Genetics and Physiology Div., Korea Foest Research Institute,
Suwon, Omokdong 44-3, Kyonggido, 441-350, Korea

ABSTRACT Winter bud explants from 15 individual angelica tree (*Aralia elata*) were cultured *in vitro* to find out optimal conditions for somatic embryo induction as well as plant regeneration. Calli are induced and grown on MS medium supplemented with 1.0 mg/L 2,4-D for 4 weeks and subcultured on a half-strength MS medium without phytohormones to induce somatic embryos. Inter-simple sequence repeat (I-SSR) markers were analyzed with total DNAs extracted from the trees. Genotype effects on somatic embryo induction were examined by cluster analysis. Callus induction rate varied from 58.5 to 100% among the genotypes. Somatic embryo induction rate also greatly varied from 0 to 100% among the genotypes. There was a significant difference in somatic embryo induction rate even among the individual trees that showed close genetic relationships each other. This suggested that somatic embryo induction rate in *Aralia elata* be influenced by a few major specific genes rather than whole genomic similarity among individual trees. Four individuals of Ulneong-7, Cheju-1, Shingu and China, which are recalcitrant to somatic embryo induction, turned out to have a close genetic relationship, suggesting that both physiological and genetic factors affect somatic embryo induction. The results suggest that genotype selection be the most important factor to achieve an efficient propagation, although cultural optimization through medium and explant manipulation may also play crucial roles in somatic embryogenesis as well as plant regeneration of these species.

Key words: Angelica tree, genotype effect, I-SSR marker analysis

서 론

두릅나무의 순은 맛과 향기가 뛰어난 봄철의 고급산채이며 근삼을 통하여 일반적으로 번식시키고 있다. 그러나 삼목 시기가 봄철에 국한되고 근삼수 채취를 위해서는 다량의 묘목

이 필요하여 단기간에 대량번식이 어렵다. 더욱이 삼목시 뿌리의 절단면이 두릅나무 활착에 치명적인 입고역병의 발생 원인이 되어 (Amemiya et al. 1990), 번식의 문제점이 되기도 한다.

조직배양법은 배양기술이 적정화되면 기존의 방법보다 경제적이고 효율적인 번식법이 될 수 있다. 체세포배 유도에 의한 식물체 생산기술은 기타의 배양법보다 여러 장점이 있으며 몇 가지 침엽수종에서는 초저온저장 기술과 연계하여 개량효과를 제고할 수 있는 새로운 기술로 평가되고 있다

*Corresponding author. Tel 031-290-1199 Fax 031-290-1020
E-mail jesumhk@hanmail.net

(Park et al. 1998). 또한 대량생산의 측면에서도 효율적인 번식법으로 나타나 독일가문비나무 등 몇 가지 침엽수종에서는 이미 실용화가 시도되고 있다 (Sutton and Polonenko 1999).

체세포배 유도에는 배양 절편, 배지 및 생장호르몬 등이 크게 영향을 미치며 (Chalupa 1990), 기타 배지 질소원의 농도, 염류농도 및 배양환경 등이 영향을 미친다 (Brown et al. 1995). 또한 모수에 따른 유전자형의 차이, 절편의 발달단계 및 생리적 상태가 체세포배 유도 및 식물체 재분화의 중요 요소로 알려져 있다 (Krishnaraj and Vasil 1995; Trigiano et al. 1999). 두릅나무의 체세포배 유도는 최근 여러 결과가 발표된 바 있고 (Jhang et al. 1993, 1994; Park et al. 1994; Moon et al. 1999; Moon and Youn 1999), 기존 번식법의 대안이 될 수 있음이 시사되고 있으나 유전자형에 따른 체세포배 유도는 연구가 미진한 상태이다. 본 시험은 우량한 두릅나무의 효율적인 기내 번식기술 개발을 목적으로 국내에서 선발하거나 일본과 중국에서 도입한 두릅나무를 대상으로 체세포배 유도에 미치는 유전자형의 효과를 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

전국 10개소에서 1999년 4월 중순에서 5월 초에 걸쳐 두릅나무 15개체를 임의 선발하였다. 개체목은 모두 맹아로 갱신된 것으로 1~2.5 m의 수고를 보였다. 개체목은 선발장소의 이름을 붙여 오대 1, 2 등으로 명명하였다 (Table 1). 일본에서 도입한 '신구'는 충북 제천시 청풍면 소재 농장에서, '중국'은 중국 길림성에서 도입한 것으로 경기도 안성시 소재 농원에서 채취하였다. 채취 당시 두릅순의 상태는 지역에

Table 1. Genotype effect on callus and somatic embryo induction in 15 *Aralia elata* species.

Individual trees	No. explants cultured	No. explants forming callus (%)	No. explants forming somatic embryos (%)
Odae-1	146	146 (100.0)	9 (6.2)
Odae-2	123	113 (91.9)	0 (0.0)
Wonduck-1	299	293 (97.9)	93 (31.7)
Seokhyun-1	276	271 (98.2)	17 (6.3)
Yangku-10	106	62 (58.5)	62 (100.0)
Seokhyun-2	89	68 (76.4)	0 (0.0)
Nonsan-1	101	97 (96.0)	2 (2.1)
Ulneung-7	60	57 (95.0)	2 (3.5)
Cheju-1	21	21 (100.0)	0 (0.0)
Shingu	88	85 (96.6)	0 (0.0)
China	68	65 (95.6)	1 (1.5)
Yangku-12	40	40 (100.0)	15 (37.5)
Yangpyung-3	125	124 (100.0)	21 (16.9)
Osan-1	190	183 (96.3)	31 (16.9)
Namhae-1	120	120 (100.0)	0 (0.0)

따라 다소 차이는 있으나 동아가 막 터져 나오거나 나오기 직전의 것으로서 당년생 정아지를 약 20 cm로 절취하여 젖은 종이로 싸서 비닐팩에 넣어 운반하고, 4 °C의 냉장고에 저장하여 1주 이내에 배양하였다. 한편 DNA 분석에 사용한 재료는 개체별로 구분하여 온실에서 수경 삼목한 다음 새순이 10 cm 내외로 자랐을 때 절취하여 분석에 사용하였다.

표면살균

정아지를 약 3 cm로 절단하고 가시가 있는 것은 가시를 제거하였다. 500 mL 삼각플라스크에 서너 개씩 넣어 tween 20 액을 1~2방울 첨가하여 수돗물로 거품을 내어 여러 번 씻어 내었다. 다음 무균상에서 70% 에탄올에 1분, 2% NaClO에 15분간 각각 표면살균하고 멸균수로 5회 씻어 내었다.

캘러스 및 체세포배 유도

표면살균 후 동아의 인편을 핀셋으로 조심스럽게 벗겨낸 다음 어린 싹을 절편으로 캘러스를 유도하였다. 해부용 칼로 2~4 mm 크기의 절편을 만들어 샤페당 10~20개씩 치상하여 3반복에서 10반복으로 배양하였다. 배지는 캘러스 유도배지와 체세포배 유도배지로 나누어 사용하였다. 캘러스의 유도는 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에 1.0 mg/L 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), 2% sucrose를 첨가하고, 0.3% gelrite로 경화하여 사용하였고, 체세포배의 유도는 1/2 MS 기본배지를 사용하였다. 배지는 멸균소독 후 1회용 petri dish (87×15 mm, YongIn, GCM Inc., Korea)에 25 mL씩 분주하여 사용하였다. 모든 배양은 24±2°C, 1일 16시간 조명 (40 μmol m⁻² s⁻¹의 냉백색 형광등)이 되는 배양실에서 실시하였다. 캘러스 유도는 4주간, 체세포배 유도는 계대배양 후 5주간 실시하였다.

식물체 유도 및 포트묘 육성

캘러스 유도배지에서 4주간 배양한 다음 1/2 MS 기본배지에 계대하여 체세포배를 유도하였다. 체세포배는 계대배양 후 2주부터 형성되었는데 어뢰형 단계까지 자랐을 때 0.05% 활성탄이 첨가된 1/2 MS 배지에 계대배양하여 발아 및 식물체 재분화를 도모하였다. 재분화된 식물체는 동일한 배지가 담긴 플라스틱 배양용기 (15×5 cm, YongIn, TongYang Mool San Co. Ltd., Korea)에 옮겨 4주간 성장시킨 다음 인공배양토 (피트모스 (1) : 펄라이트 (1) v/v)로 옮겨 간헐적인 관수로 습도를 높게 유지하여 활착시킨 후 포트묘로 육성하였다. 순화된 묘목은 포지에 이식하여 생장을 관찰하였다.

I-SSR 표지자를 이용한 UPGMA 법에 의한 유집분석

잎을 재료로 CTAB 방법을 이용하여 genomic DNA를 추출하였다 (Hong et al. 2000). I-SSR PCR 분석을 위하여 20 ng의 주형 DNA, 0.6 μ M의 primer, 0.5 μ g의 BSA (Bovine Serum Albumin, Takara, Japan), 1.5 mM MgCl₂, 100 μ M의 dNTPs (MBI, Lithuania), 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH, 8.3, 0.6 unit의 Taq DNA polymerase (AB gene, UK)를 섞어서 PTC-200 PCR 기기 (MJ Research, USA)를 사용해서 반응시켰다. PCR의 온도순환 조건은 94°C에서 5분간 전처리를 하고, 94°C에서 30초간 열변성, 52°C에서 30초간 primer 결합, 72°C에서 1분간 DNA 합성의 세 과정을 45회 반복 수행하고, 72°C에서 10분간 DNA 합성을 완료시켰다. PCR 증폭산물은 1X TBE 용액을 이용해서 제조한 2% agarose gel을 이용하여 분획하였으며, 증폭산물의 크기를 계산하기 위하여 100 bp ladder DNA size marker (ABgene, UK)를 별도의 lane에서 동시에 전기영동을 수행한 후 EtBr로 염색하여 자외선 분광기 상에서 사진 촬영하여 관찰하였다. 증폭산물 변이체는 gel상의 동일한 위치에 증폭산물이 있고 없음을 기준으로 증폭산물이 있을 경우 1, 없을 경우 0으로 기록하여 실험을 통해서 분석된 전 개체에 대하여 조사표를 작성하였다.

개체별로 정리된 자료를 이용해서 I-SSR 증폭산물 변이체의 공유 정도에 의해 계산되는 개체간 유전적 거리를 컴퓨터 프로그램 RAPDDIST v1.0 (Black 1996)을 이용해서 Manhattan Distances (Prevosti distance, Wright 1978) 공식에 의거해서 계산했으며, 개체간 유전적 유연관계를 UPGMA (phylip v3.5c; Felsenstein, 1993)법으로 분석하였다.

결 과

캘러스 유도

캘러스는 절단면에서 주로 유도되었다. 절편에 따라 백색, 엷은 녹색 혹은 노란색 계통으로 유도되었으며, 캘러스의 형성 없이 절편이 부풀어오르거나 갈변화되는 것도 나타났다. 캘러스 형성률은 대체로 90% 이상이었으나 양구 10호와 석현 2호는 58.5%, 76.4%로 저조하였다 (Table 1). 캘러스의 생장은 유전자형에 따른 차이 없이 절편에 따라 직경 2~5 mm까지 성장하였으며 대체로 생장이 저조하였다.

체세포배 유도

캘러스는 1/2 MS 기본배지로 계대배양 후 비교적 빠르게 성장하여 배양 4 주 후에는 직경 0.8~1.5 cm까지 성장되었다 (Figure 1A). 체세포배 유도율은 유전자형 및 절편에 따른

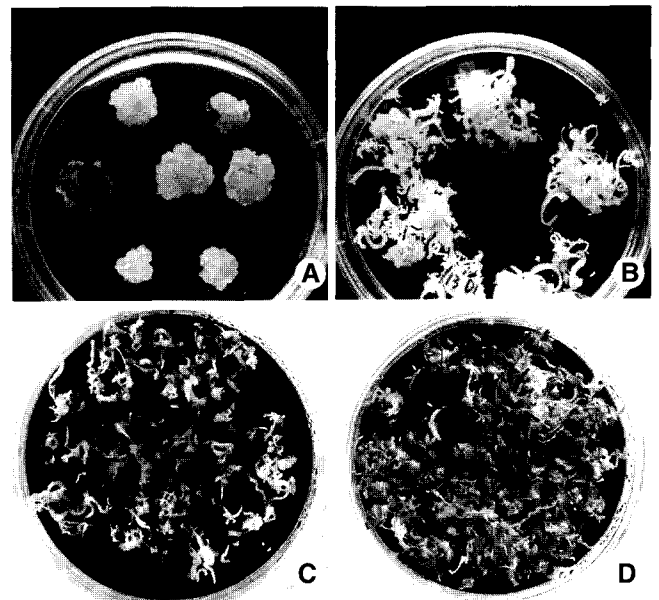


Figure 1. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Aralia elata*. A, Embryogenic callus induced from winter bud explants cultured on MS medium with 1.0 mg/L 2,4-D; B, Somatic embryo induction and their development from embryogenic calli cultured on half-strength MS medium without phytohormones; C, Somatic embryo germination on half-strength MS medium containing 0.05% activated charcoal; D, Regenerated plantlets from somatic embryos.

차이가 심하여 전혀 체세포배가 형성되지 않는 것에서 100% 까지 차이를 보였다 (Table 1). 체세포배 유도는 이식 2주 후 부터 관찰되었고, 캘러스 표면에서 유도되기도 하였으나 주로 배지와의 접촉 부위에서 유도되었다 (Figure 1B). 절편에 따라서는 캘러스가 유도되지 않고 부풀어오른 부분에서 직접 체세포배가 유도되기도 하였다. 체세포배 수는 절편 당 10개 내외로 나타났으나 배발생이 양호한 유전자형에서는 절편당 수십 개의 체세포배가 유도되었다 (Figure 1B). 체세포배는 자엽이 붙어 있거나 배축이 도장하는 등 대개 기형으로 유도되었다. 체세포배를 형성하는 캘러스는 거의 노란색 계통이 많았으나 적색으로 착색된 캘러스에서도 배발생이 이루어졌다. 캘러스 유도율과 체세포배 유도율 그리고 캘러스의 성장과 체세포배 유도 간에는 어떤 상관관계도 보이지 않았다. 생장이 양호한 연녹색 혹은 수분을 다량 함유한 백색의 캘러스에서는 오히려 체세포배 유도빈도가 낮은 것으로 나타났다.

I-SSR 표지자를 이용한 UPGMA 법에 의한 유집분석

I-SSR 표지자 분석을 기초로 UPGMA 법에 의한 유집분석 결과, 체세포배 유도는 유전자형에 따라 어느 정도 영향을 받는 것으로 나타났다 (Table 1, Figure 3). 동일한 분지군에 속하여 다른 개체들에 비해 유전적으로 가까운 것으로 나타난 울릉도-7, 제주도-1, 신구 및 중국 개체들은 공히 체세포배의 유도가 매우 어려운 개체들로서 이들은 상대적으로 나머지 개체들과는 비교적 유전적 차이가 큰 개체들로 생각되었다.

나머지 2개의 분지군에 산재하여 있는 것으로 나타난 국내 선발개체들은 각 분지군 내에서 비교적 유전적 거리가 유사하게 나타난 개체에 있어서도 체세포배 유도율의 차이가 크게 나타났다. 따라서 본 연구에서 분석된 유전적 차이가 두릅나무의 체세포배 유도능력을 결정짓는 직접적인 유전적 요인은 아닐지라도 최소한 울릉도-7 등이 속한 분지군의 개체들은 나머지 국내 선발개체들과는 유전적으로 차이가 있음을 알 수 있었다.

체세포배의 발아 및 재분화

0.05% 활성탄이 첨가된 1/2 MS 기본배지에서 체세포배는 90% 이상 식물체 재분화가 가능하였으며 유전자형에 따른 차이는 나타나지 않았다 (자료 미제시, Figure 1C). 자엽수의 변이 등 형태적으로 변이가 있었음에도 불구하고 발아 및 재분화에는 어려움이 없었다 (Figure 1D). 일단 재분화된 식물체는 생장이 빠르게 이루어졌고 1/2 MS 기본배지에 계대배양하여 3~4주 정도 더 성장시킨 다음 (Figure 2A), 인공배양토에 이식하였을 때 90% 이상 활착이 가능하였다 (Figure 2 B). 환경순화 된 식물체는 비닐 포트에 이식하였을 때 2개월 후에는 20 cm 내외로 자랐고 (Figure 2C), 포장이식 후 정상적으로 성장하였다 (Figure 2D). 이상의 과정에서 유전자형에 따른 차이는 거의 나타나지 않았으며 두릅나무의 경우 일단 체세포배가 유도되면 그 이후의 식물체의 재분화 및 순화는 큰 문제가 없을 것으로 생각되었다.

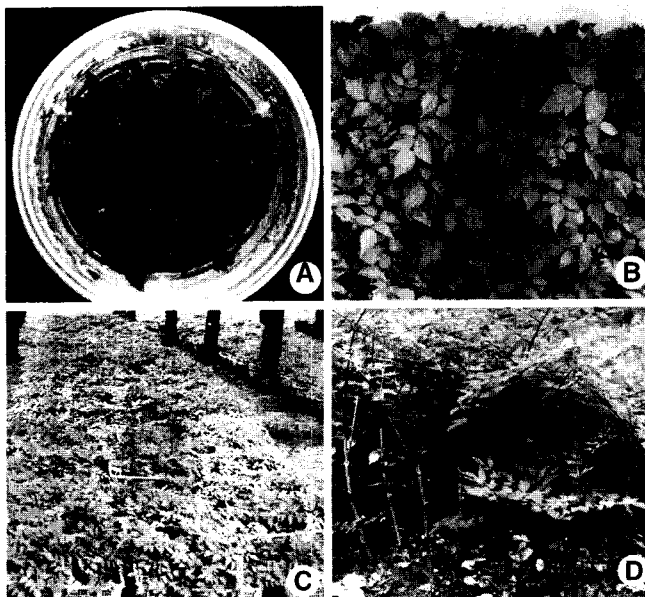


Figure 2. Plant development, acclimatization and transplantation to field of *Aralia elata* somatic embryo plantlets. A, Plantlets growing in a culture vessel; B, Acclimatization of plantlets in artificial soil mixture; C, Two-month-old plants in pots; D, Six-month-old plants in field after transplanting.

고찰

본 실험에서 나타난 체세포배 발생 빈도의 차이는 ISSR 분석 결과 유전자형의 차이로 나타났으나 모수의 연령이나 생리적 차이에 따른 요인이 체세포배의 발생에 영향을 주었을 가능성도 완전히 배제하기 어렵다. 본 실험에 사용한 재료는 모두 맹아로 갱신된 당년생 줄기임에도 불구하고 그 나무가 지닌 모수령은 다를 수 있으며, 선발지역의 입지적, 기후적인 차이와 겨울철 해빙 이후 수액이동 등 나무의 생리적 상태가 매우 다를 수 있기 때문이다. 울릉도-7, 제주도-1, 신구 및 중국의 개체 모두 체세포배 유도 빈도가 매우 낮거나 유도가 되지 않았는데 (Table 1), 이들 개체들이 유전적으로 매우 유사한 양상을 보였으나 (Figure 2) 이러한 결과가 체세포배 유도에 직접적으로 관여하는 유전자들의 차이에 기인한 것으로 단정하기는 어렵다. 그러나 두릅나무의 체세포배 유도에 관한 최근의 연구에 의하면 유전자형에 따라 체세포배 유도율에 차이가 큰 것으로 보고된 바 있다. Bae (2001)는 1년 이상 동일한 배지에서 계대배양한 두릅나무 5개체의 시험에서 개체 및 부위에 따라 캘러스 유도율은 차이가 거의 없으나 체세포배 유도율은 개체간에 0~90%까지 차이를 나타내고, 특히 논산 1호의 경우는 부위에 따라 5~60%까지 체세포배 유도율의 차이를 나타내었다고 하였다. 이러한 결과는 생리적 요인 이외의 유전적인 요소가 체세포배 유도에 크게 영향하고 있다는 사실을 간접적으로 시사하는 결과이다.

몇몇 초본식물의 체세포배 유도에 있어서도 유전자형에 따른 차이가 보고되고 있다. 알팔파의 체세포배로부터 식물체의

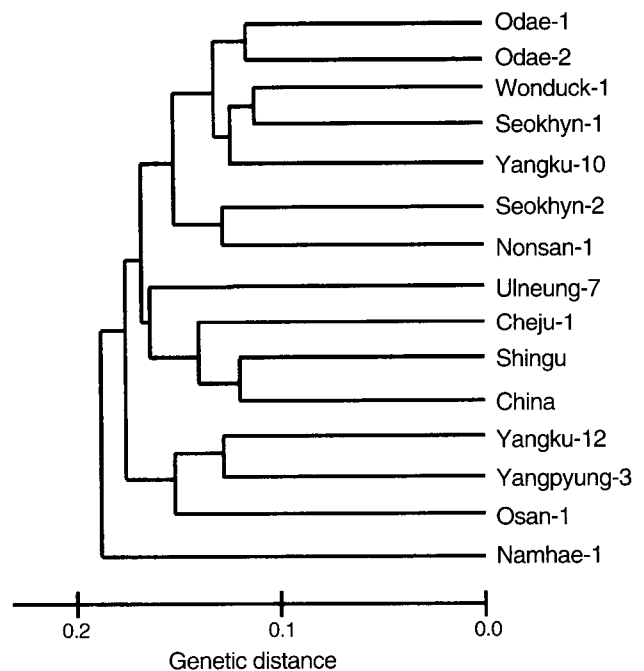


Figure 3. Genetic relationships among 15 individuals of *Aralia elata* reconstructed by UPGMA.

재분화는 유전적인 지배를 받으며 두 개의 유전자에 의하여 주로 지배되는 것으로 보고되며 (Keyes and Bingham 1979), 페튜니아는 원형질체의 발달에 있어서도 유전적인 지배를 받는다고 하였다 (Izhar and Power 1977). 그러나 옥수수의 체세포배 유도에서는 유전적 요인은 물론 환경적인 요인이 배발생에 크게 영향을 하는 바, 토양비옥도, 관수, 강수량, 온도, 빛 등이 접합자배 발달의 생리적 변화를 가져와 결국 체세포배 발생 능력을 지배한다고 하여 (Lu et al. 1983) 유전자형의 차이는 물론 생리적 요인도 배발생에 크게 관여함을 보여주었다. 옥수수에서 체세포배의 재분화는 배지에 따른 차이, 즉 배지에 따라 재분화 유전자의 발현이 조절되며, 특히 질소원의 형태에 따라서 재분화에 관련된 유전자의 발현이 달라지는 것으로 보고되어 (Hodges et al. 1986) 유전자형의 발현이 배지에 따라 서로 다르게 나타남을 시사하였다.

일반작물에서 관찰된 체세포배 유도 및 재분화에 영향을 미치는 유전자형의 효과는 목본식물에서도 비슷하게 관찰되고 있다. *Cladrastis lutea*의 체세포배 유도에서 배 발생률은 5개 종자산지에 따라 차이가 없는 것으로 나타난 반면 (Weaver and Trigiano 1991), 아카시나무의 종자 유래 배발생 능력은 배발생이 잘되는 것에서 전혀 안 되는 것까지 차이를 나타냈다 (Trigiano et al. 1988). 그들은 또한 8개 모수의 배주(ovules)를 배양한 결과 절편의 약 30%만이 배발생을 보여 유전자형에 따른 차이를 보고했다. 최근 Pijut (1999)는 호도나무에서 성숙 체세포배의 유도 빈도와 발아 및 재분화에 있어 유전자형의 차이를 보고하며 동일한 유전자형에 있어서도 배지에 따라서 배발생 빈도가 차이를 관찰하였다. 그리고 이러한 결과는 체세포배에 관련된 유전자의 발현이 배지에 따라 다르게 나타나기 때문이라고 추정하였다. 그러나 Trigiano 등 (1999)은 시료의 발달단계 및 생리적 상태가 체세포배 유도를 위한 결정적인 요인임을 밝히면서 체세포배 유도의 최적 'time window'는 지리적 조건, 생장입지 및 기후조건에 따라 다르다고 하였다. 따라서 유전자형에 따른 체세포배 발생 능력의 차이는 배양조건의 최적화를 통해 어느 정도 극복될 수 있는 요인임을 나타내었다.

본 실험에서 I-SSR 표지자 분석에 근거해 볼 때 동일 수종 내에서도 배양조건에 잘 반응하는 유전자형의 선발이 필요함은 물론 배양시기나 시료의 선택 등도 고려해야 될 내용임을 시사해 준다. 이러한 유전자형의 차이는 기내반응이 양호하여 목본식물 조직배양의 모델이 되어 있는 포플러류에서도 심한 것으로 보고된 바 있다 (Ahuja 1983). 또한 배지 및 생장조절제의 선택, 시료의 선택 등 최적 배양조건의 확립이 효율적인 기내번식의 관건이 되는 만큼 (Brown et al. 1995) 체세포배 유도 빈도가 낮거나 유도가 되지 않은 개체에 대해서는 배양조건의 최적화에 대한 실험이 요구된다. 아울러 유전적 요소가 배양에 미치는 영향을 정확히 평가하기 위해서는 배양이 잘되는 개체와 그렇지 못한 개체의 교배를 통해서 차대 가계를 확보하여 체세포 배발생에 관여하는 유전자의 탐색연구가

필요하다.

결 론

두릅나무 15개체의 동아(冬芽)를 절편으로 체세포배 유도에 미치는 유전자형의 효과를 검토하였다. 켈러스는 MS 기본 배지에 1.0 mg/L 2,4-D를 처리하여 4주간 배양하여 유도하였고, 1/2 MS 기본배지로 옮겨 5주간 배양하여 체세포배를 유도하였다. 또한 동일한 개체의 잎을 재료로 CTAB 방법으로 genomic DNA를 추출하여 I-SSR 표지자 분석을 수행하였다. 관찰된 I-SSR 표지자 변이체에 근거하여 UPGMA법에 의해 유집분석을 실시한 결과, 체세포배 유도에 미치는 유전자형의 효과가 관찰되었다. 켈러스 유도는 유전자형에 따라 58.5~100%까지, 체세포배 유도는 0~100%까지 차이를 나타냈다. I-SSR 표지자 유집분석 결과 유전적으로 유사한 개체에 있어서도 체세포배 유도에 차이를 보여 개체목 간의 전반적인 유전적 유사성보다는 특정 유전자에 의한 영향을 많이 받는 것으로 추정되었다. 체세포배 유도율이 저조하거나 유도가 되지 않았던 울릉도-7, 제주도-1, 신구 및 중국 등 4개체는 다른 개체들에 비해서 비교적 유전적 유사성이 높은 것으로 나타나 이들 개체의 체세포배 유도를 통한 식물체 생산은 비효율적인 것으로 보이며, 기타 개체들에 대해서는 유전적 유사성 이외의 생리적 요인에 관여하는 유전자의 탐색 및 활용이 필요할 것으로 생각된다. 따라서 두릅나무의 효율적인 기내번식을 위해서는 일차적으로 배양이 잘되는 개체의 선발이 필요하지만 배지, 시료의 선택 등 배양조건의 최적화 역시 필요함을 시사해 준다.

인용문헌

- Amemiya K, Fujiki T, Hyuga S (1990) Mass propagation by tissue culture in Japanese angelica tree (*Aralia elata*). Ann Rep Yamanashi Agri Exp Sta 5:11-22
- Ahuja MR (1983) Somatic cell differentiation and rapid clonal propagation of aspen. Silvae Genet 32:3-4
- Bae CH (2001) Several factors affecting on somatic embryo induction and plant regeneration in *Aralia elata* Seem. MS Thesis, KangWon Nat'l Univ
- Brown DCW, Finstad KI, Watson EM (1995) Somatic embryogenesis in herbaceous dicots. In : Thorpe TA, (ed), In Vitro Embryogenesis in plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 345-415
- Black WCIV (1996) RAPDDIST 1.0. Department of Microbiology, Colorado State University, Fort Collins, CO. USA
- Chalupa V (1990) Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured immature embryos of oak (*Quercus robur* L.) and

- linden (*Tilia cordata* M.). Plant Cell Rep **9**:398-401
- Felsenstein J** (1993) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics. University of Washington, Seattle, WA. USA
- Hodges TK, Kamo KK, Imbrie CW, Becwar MR** (1986) Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. Bio/Tech **4**:219-223
- Hong YP, Cho KJ, Kim YY, Shin EM, Pyo SK** (2000) Diversity of I-SSR variants in the populations of *Torreya nucifera*. J Kor For Soc **89**:167-172
- Izhar S, Power JB** (1977) Genetical studies with petunia leaf protoplasts. I. genetic variation to specific growth hormones and possible genetic control on stages of protoplast development in culture. Plant Sci Lett **8**:375-383
- Jhang HH, Park CH, Cho DH, Shin YB** (1993) Callus induction and plant regeneration from leaf tissue culture of *Aralia elata* S. Kor J Crop Sci **38**:366-370
- Jhang HH, Park CH, Lee YS, Shin YB** (1994) Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of *Aralia elata* S. Kor J Plant Tiss Cult **21**:167-171
- Keyes GJ, Bingham ET** (1979) Heterosis and ploidy effects on the growth of alfalfa callus. Crop Sci **19**:473-476
- Krishnaraz S, Vasil IK** (1995) Somatic embryogenesis in herbaceous monocots. In : TA Thorpe, (ed), In Vitro Embryogenesis in Plants, Kluwer Acad Pub pp 417-470
- Lu C, Vasil V, Vasil IK** (1983) Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of maize (*Zea mays* L.). Theor Appl Genet **66**:285-289
- Moon HK, Oh KE, Son SH** (1999) Factors influencing somatic embryo induction and plant regeneration in *Aralia elata* Seem. Kor J Plant Tiss Cult **26**:275-280
- Moon HK, Youn Y** (1999) Somatic embryogenesis from winter buds of 10-year-old *Aralia elata*. In : Jain SM, Gupta PK and Newton RZ, (eds), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Vol **5**:129-134
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant **15**:473-497
- Park CH, Lee YS, Jhang HH, Kim NS, Shin YB** (1994) Effect of media and plant growth regulators on germination of somatic embryos of *Aralia elata* S. Kor J Med Crop Sci **2**:241-245
- Park YS, Barrett JD, Bonga JM** (1998) Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. In Vitro Cell Dev Biol-Plant **34**:231-239
- Pijut PM** (1999) Somatic embryogenesis from immature fruit of *Juglans cinerea*. In : Jain SM, Gupta PK and Newton RZ, (eds), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Vol **4**:415-429
- Sutton BCS, Polonenko** (1999) Commercialization of plant somatic embryogenesis. In : Jain SM, Gupta PK and Newton RZ, (eds), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Vol **4**:263-291
- Trigiano RN, Beaty RM, Graham ET** (1988) Somatic embryogenesis from immature embryos of redbud (*Cercis canadensis*). Plant Cell Rep **7**:148-150
- Trigiano RN, Buckley LG, Merkle SA** (1999) Somatic embryogenesis in woody legumes. In : Jain SM, Gupta PK and Newton RZ, (eds), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Vol **4**:189-208
- Weaver EG, Trigiano RN** (1991) Regeneration of *Cladastris lutea* (Fabaceae) via somatic embryogenesis. Plant Cell Rep **10**:183-186
- Wright S** (1978) Evolution and genetics of populations. Vol 4. Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago, USA

(접수일자 2001년 4월 20일)