

헛개나무의 현탁배양세포로부터 체세포배발생과 식물체 재생

이성호* · Zhao Bo* · 김나영** · 김명조*** · 조동하*** · 이동욱*** · 이재근*** · 임정대**** · 유창연***†

*중국 동북임업대학 임목유전육종학과, **경희대학교 식품영양학과,
강원대학교 한방바이오연구소, *강원대학교 생약자원개발학과

Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Embryogenic Cell Suspension Cultures of *Hovenia dulcis* Thunb.

Cheng Hao Li*, Bo Zhao*, Na Young Kim**, Myong Jo Kim***, Dong Ha Cho***, Dong Wook Lee***, Jae Geun Lee***, Jung Dae Lim****, and Chang Yeon Yu***†

*Key Laboratory of Forest Genetics and Tree Breeding, Northeast Forestry University, Harbin, 150040, China.

**Department of Food & Nutrition, Kyunghee University, Seoul 130-701, Korea.

***Bioherb Research Institute, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea.

****Department of Pharmacognosy Material development, Kangwon National University, Samcheok 245-711, Korea.

ABSTRACT : Culture conditions for high frequency plant regeneration via somatic embryogenesis from embryogenic cell suspension cultures of *Hovenia dulci* are described. Germinated somatic embryos were selected for induction of secondary embryogenesis. Friable embryogenic cells were induced directly from somatic embryos when transfer to 1/3 MS solid or liquid medium lacking plant growth regulators. The temperature strongly effected on induction of secondary embryogenesis than other conditions in culture. All somatic embryos produced friable embryogenic cell clumps within 10 days when germinated somatic embryos cultured in 1/3 MS medium at 30 °C in suspension culture. No somatic embryos formed from embryogenic cell suspension cultures at 18 °C. Numerous somatic embryos were induced and subsequently developed uniformly into germination stage from suspended cell clumps after 4 weeks of culture on 18 °C. Plantlets conversion were observed on 18 °C when germinated somatic embryos were transferred to 1/3 MS solid medium without plant growth regulators or supplemented with 0.1-0.5 mg/l benzyladenine.

Key Word : *Hovenia dulci*, secondary somatic embryogenesis, liquid medium, plantlet regeneration

서 언

헛개나무 (*Hovenia dulcis* Thunb)는 갈매나무과 (Rhamnaceae)의 낙엽교목으로 강원도, 황해도 이남에 자생한다. 헛개나무의 종자는 지구자라 하여 예로부터 주독 해독, 피로회복, 변열, 목마름, 구토증 등의 치료와 대소변을 잘 통하게 한다고 알려져 있다. 최근에 헛개나무의 껍질, 목부, 열매, 그리고 열매의 껍질에서 간 해독작용과 항암활성이 있음이 보고되면서 (이 등, 1999; 김 등, 2000) 국내에서는 기능성 식품으로의 산업화에 관심이 높아지고 있으며 수요량이 급증하였다. 이것은 자생지에서의 무차별한 남벌로 이어졌으며 특히 수피 및 목질에서도 효과가 있음이 밝혀지면서 (이 등, 1999) 식물체 전체가 훼손되어짐으로써 자생지에서는 헛개나무를 찾아볼 수 힘들 정도로 감소하였고 그 수요를 따르지 못해 상당량이 중국에서 수

입되고 있다. 그러므로 헛개나무의 안정적인 공급을 위해서는 종묘의 대량번식이 이루어져야 한다. 헛개나무의 실생번식을 위하여 종자의 발아율 향상과 발아기간을 단축하기 위한 연구가 최근에 보고된 바 있다 (이, 2001). 조직배양기술도 번식수단의 한가지 대안으로 실용화가 가능하다면 우량개체의 대량 증식에 가장 효율적인 번식방법이라고 세계적으로 인정되고 있다. 하지만 헛개나무의 조직배양에 관한 연구는 엄 등 (2002)이 캘러스 형성과 기관분화, 체세포배발생에 관한 연구가 보고되었을 뿐 매우 미흡하다. 위의 실험에서는 체세포배 유도에 관한 일련의 기초실험을 수행하여 헛개나무의 체세포배 발생효율이 높다는 사실을 밝혔으나 체세포배는 자엽기까지만 발달하였고 완전한 식물체를 얻지는 못하였다. 체세포배를 이용한 대량증식 체계의 확립을 위해서는 균일하게 성숙된 체세포배의 유기, 동조화, 발아 및 발근 등이 안정적으로 확실하게

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6411 (E-mail) cyyu@kangwon.ac.kr
Received July 14, 2006 / Accepted July 28, 2006

이루어질 수 있는 체계가 확립되어야 한다.

본 실험에서는 헛개나무의 체세포를 이용한 배발생세포의 유도, 및 현탁배양을 통해 균일한 체세포배를 연속적으로 대량 생산할 수 있는 단순하고 효율적인 체세포배 생산체계를 확립하였다. 한편 체세포배의 식물체재분화에 관여하는 온도, 성장조절물질, 배지조성 등 배양조건을 검토하였다. 본 연구에서 제시된 헛개나무의 식물체재분화방법은 우량종묘의 대량생산 및 돌연변이와 형질전환을 통한 신품종육성연구에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

재료와 방법

1. 실험재료 및 배발생캘러스의 유도

헛개나무의 종자는 강원도 양양군 자생지에서 채취하여 실험재료로 사용하였다. 종자의 종피를 벗긴 후 70% 에탄올에 30분, 2% 차아염소산나트륨용액에 20분 소독하고 멸균수로 5회 세척하였다. 종자에서 배를 분리하여 무기염의 농도를 1/3로 줄인 MS (Murashige and Skoog, 1962)배지에 치상하여 발아시켰다. 발아 2주후의 유식물체를 3-5 mm 길이로 잘라 MS 무기염에 0.5 mg/l 2,4-D, 3 g/l sucrose, 2.5 g/l Gelrite (DUCHEFA)를 첨가한 배지에 치상하여 배발생 캘러스를 유도하였다. 배발생캘러스의 증식과 체세포배의 배양은 엄 등 (2002)의 방법을 따랐다.

2. 고체배지에서의 2차체세포배발생

배양온도가 2차체세포배발생에 주는 영향을 조사하기 위하여 체세포배를 구형과심장형 및 발아단계로 구분하여 배양온도를 18°C, 25°C와 30°C로 조절한 성장상에서 배양온도를 달리하여 암배양하였다. 배양배지는 성장조절물질을 첨가하지 않은 1/3MS 배지에 10 g/l 설탕, 2.5 g/l Gelrite를 첨가한 고체배지를 사용하였으며 1개월 후 2차체세포배 유도율을 조사하였다.

3. 액체배지에서의 배발생세포의 유도 및 체세포배발생

고체배지에서 배양한 발아단계의 체세포배를 선별하여 액체배지에 옮겨 배양하여 현탁배양 배발생세포의 유도실험을 수행하였다. 배양온도가 배발생세포 유도에 주는 영향을 조사하기 위하여 배양온도를 18°C, 25°C와 30°C로 달리하였으며 매 삼각플라스크에 40개의 발아단계의 체세포배를 접종하였다. 배양 6주 후 배발생세포 형성율과 매 삼각플라스크에서 증식된 배발생세포의 생체중을 측정하였다. 배발생세포의 형성율은 전체 삼각플라스크 중 배발생캘러스가 유도된 삼각플라스크수의 비율로 계산하였다.

배발생세포가 형성된 후 계대할 때에 200 μm의 강철체로 배발생세포괴를 걸러 체를 통과하는 배발생세포괴만 새로운 배

지로 옮겨 배양하는 방법으로 균일한 크기의 배발생세포괴를 증식할 수 있었다. 증식시킨 배발생세포를 식물성장조절물질이 첨가되지 않은 1/3MS 액체배지에 옮겨 배양하여 체세포배를 유도하였다. 체세포배 유도시 배발생세포의 적정 접종밀도를 조사하기 위하여 매 삼각플라스크에 50 mg, 200 mg, 800 mg의 배발생세포를 접종하여 배양온도를 18°C로 조절한 진탕배양기 (HK-S125, Korea)에서 배양하였다. 배양 4주 후 형성된 체세포배수와 체세포배의 생체중을 조사하였다. 배양배지는 고체배양에서의 2차배 유기배지와 같은 조성으로 하고 10일에 한번 계대하였다. 배양은 50 ml의 액체배지가 들어있는 250 ml 삼각플라스크에서 진행하였고 교반속도는 100 rpm으로 조절하여 암배양하였다. 매 처리구당 20개의 삼각플라스크를 사용하였으며 2번 반복실험을 하였다.

4. 식물체 재분화

액체배지에서 배양한 발아단계의 체세포배를 고체배지에 옮겨 식물체 재분화를 유도하였다. 배양온도는 각각 10°C, 18°C, 25°C와 30°C로 조절하여 각 배양온도에서의 식물체 재분화율을 조사하였다. 동시에 성장조절물질의 식물체 재분화에 주는 영향을 조사하기 위하여 체세포배를 0.1, 0.5, 1, 2 mg/l BA를 첨가한 배지에 옮겨 배양하였다. 배양 4주 후 경엽의 분화가 시작된 유식물체를 선별하여 1/3MS와 MS배지에 옮겨 배양 8주 후 식물체 재분화율과 재분화 식물체의 줄기와 뿌리 생장에 미치는 무기염의 영향을 조사하였다. 식물체 재분화배지는 10 g/l 설탕과 2.5 g/l Gelrite를 첨가한 고체배지를 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 고체배지에서의 2차 체세포배발생

구형, 심장형 및 발아단계의 체세포배를 배양온도를 18°C, 25°C와 30°C로 조절한 성장상에서 배양한 결과 배양온도와 체세포배 발달단계에 따라 2차배발생율은 큰 차이를 보였다. 18°C의 배양온도에서는 2차배발생이 관찰되지 않았다. 배양온도를 25°C와 30°C로 조절할 경우 배양 7일 후부터 체세포배의 배지접촉부위에서 직접 배발생캘러스와 체세포배가 발생하였다. 2차 체세포배발생율은 발아단계의 체세포배가 초기단계의 체세포배보다 높았다 (Fig. 1A). 일반적인 배양실온도인 25°C에서도 체세포배단계에 따라 23.2%에서 46.9%의 2차체세포배가 발생하였으며 30°C에서는 거의 모든 체세포배에서 2차체세포배가 유도되었다.

2. 액체배지에서의 배발생세포의 유도 및 체세포배발생

고체배지에서 배양한 발아단계의 체세포배를 18°C, 25°C와 30°C의 배양환경에서 현탁배양하여 배발생캘러스의 유도에 대한 온도의 영향을 비교한 결과를 Table 1에 나타내었다. 매병

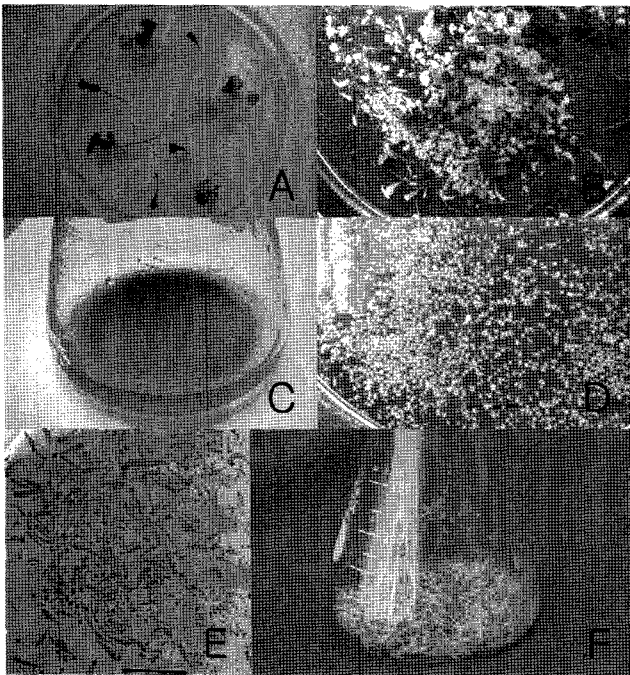


Fig. 1. Somatic embryogenesis in *H. dulcis* cultured in liquid medium A, B: secondary somatic embryogenesis in solid culture (A) and in suspension culture (B); C: friable embryogenic cell clumps; D: early stage (globular and heart shape) somatic embryos; E, F: germinated somatic embryos.

Table 1. Effect of temperature on induction and growth of embryogenic cells of *H. dulcis* after 4 weeks in suspension culture.

Temperature (°C)	Embryogenic cell induction frequency (%)	FW of embryogenic cells (mg/flask)
18	0	-
25	65	97.3 ± 39.4
30	100	894.6 ± 108.7

에 고체배양한 발아단계의 체세포배 40개를 액체배지에 옮겨 배양할 경우 18°C에서는 체세포배 혹은 배발생캘러스가 전혀 형성되지 않았으며 25°C와 30°C의 온도에서는 배양 10일후부터 많은 연노란색의 배발생세포가 유기됨이 관찰되었다. 이런 배발생세포는 액체배지에서 쉽게 현탁되어 증식하였다. 배발생세포의 유도 및 유도된 배발생세포의 증식에는 모두 30°C의 고온이 더욱 효과적이었는데 30°C에서의 배발생캘러스 유도율과 배발생캘러스의 증식율은 각각 25°C의 1.53배와 9.2배로 높게 나타났다. 현탁배양에서 하층부의 현탁액을 분리하여 18°C에서 배양하면 모든 세포가 체세포배로 전환되었고 4주 경과 후 발아단계의 체세포배로 발달하였으며 (Fig. 1B) 25°C 이상의 배양온도에서는 배발생세포는 증식만 할뿐 체세포배는 형성되지 않았다 (Fig. 1C). 발아단계의 체세포배는 액체배지에서 더이상 줄기와 잎 재분화가 이루어지지 않고 시간이 경

Table 2. Effect of initial cell density on somatic embryo formation number of *H. dulcis*.

Initial Cell Density (mg/flask)	Number of somatic embryos formed	FW of somatic embryos (g/flask)
50	424.2 ± 45.7	5.97 ± 0.21
200	2363.9 ± 619.5	15.65 ± 1.13
800	4081.1 ± 825.0	16.13 ± 0.94

과하면 결국 갈변하여 고사하였다.

액체배양에서의 체세포배 발달의 동조화를 이루기 위하여 배발생세포가 유도된 후 계대할 때에 200 µm의 강철체로 배발생세포괴를 걸러 체를 통과하는 배발생세포괴만 새로운 배지로 옮겨 배양하는 방법으로 균일한 크기의 배발생세포괴를 증식하였다. 배발생세포의 접종밀도 50 mg, 200 mg, 800 mg으로 달리하여 18°C에서 4주간 액체배지한 결과 모든 처리에서 체세포배가 유도되었으며 순차적으로 구형, 심장형, 어뢰형의 발육단계를 거쳐 정상적으로 발아하였다 (Fig. 1D, E). 형성된 체세포배수와 체세포배의 전체 생체중은 접종밀도가 클수록 큰 경향을 보였다 (Table 2). 접종밀도를 800 mg로 할 경우 체세포배수는 200 mg과 50 mg보다 각각 1.73배와 9.47배 높았으나 전체 체세포배의 생체중은 50 mg보다는 2.7배로 높게 나왔으나 200 mg과는 큰 차이를 보이지 않았다 (Fig. 1F). 그리고 이후의 성장조절물질을 첨가하지 않은 고체배지에 옮겨 배양할 경우 접종밀도를 800 mg로 하여 발아한 체세포배는 식물체 재분화가 이루어지지 않았다.

3. 식물체 재분화

200 mg의 배발생세포를 액체배지에서 4주간 배양하여 발아한 체세포배를 1/3MS 고체배지에 옮겨 배양할 경우에도 배양 온도가 식물체 재생에 큰 영향을 주었다. 배양온도를 10°C, 18°C, 25°C, 그리고 30°C로 각각 처리를 하였을 때 25°C와 30°C의 경우 모든 배양체가 배양 2주부터 갈변하기 시작하면서 고사하면서 배지접촉면으로부터 2차배가 형성되었는데 30°C에서의 유도율은 100%에 달하였다 (Fig. 1A).

배양온도를 18°C로 낮출 경우에도 25°C의 경우와 마찬가지로 배양 3주 정도부터 모든 배양체의 배축이 부풀면서 탈분화하려는 경향을 보였으나 그중 일부는 녹색을 띠면서 자엽이 형성되었다. 녹색으로 변한 모든 배양체도 2차배가 형성되기도 하였지만 동일한 배지에 옮겨주면 전부 신초와 뿌리가 형성되었다 (Fig. 2A). 10°C에서는 2개월 경과후에도 큰 변화를 보이지 않았고 자엽부위가 황녹색으로 조금 변하였다. 10°C에서 배양 2주 후 18°C로 옮긴 경우에는 거의 모든 배양체가 녹색으로 변하였으나 재분화는 이루어지지 않았고 4주 후 새로운 배지에 옮겨준 다음 줄기와 뿌리가 형성되었으나 식물체 재분화율은 17%로 저조하였다 (Fig. 2B).

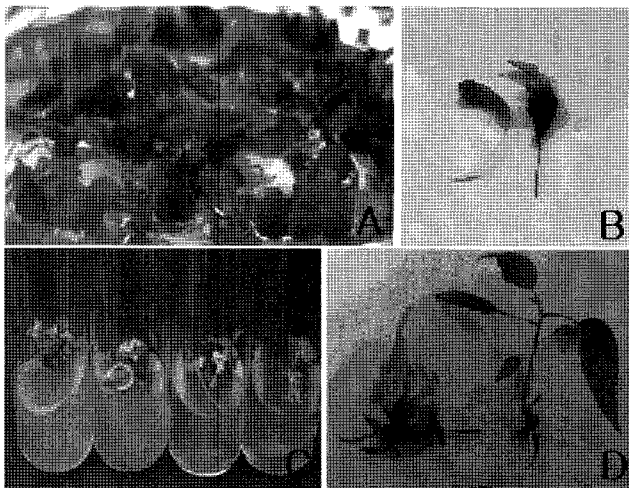


Fig. 2. Plant regeneration from suspension cultured somatic embryos of *H. dulcis*, A,B: suspension cultured somatic embryos after transfer to 1/3 MS solid medium without plant growth regulators; C: somatic embryos cultured in 1/3 MS solid medium supplemented with 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l BA (from right to left), D: regenerated plantlet cultured in MS (left) and 1/3 MS (right) solid medium without plant growth regulators.

Table 3. Effect of temperature and BA concentration on plant regeneration of *H. dulcis* somatic embryos after 8 weeks in solid medium.

Temperature (°C)	BA (mg/l)	Plant regeneration (%)
18	0	17.0
	0.1	37.0
	0.5	28.0
	1.0	0
	2.0	0
25	0	0
	0.1	4.0
	0.5	0
	1.0	0
	2.0	0

체세포배로부터 식물체 재분화에 미치는 사이토키닌의 영향을 조사하기 위하여 발아단계의 체세포배를 여러농도의 BA를 첨가한 MS배지에서 4주간 배양하였다 (Table 3). 그 결과 1 mg/l 과 2 mg/l 의 BA를 처리한 경우 거의 모든 배양체가 갈변하면서 캘러스화되었다. 0.5 mg/l 의 농도에서도 배양체가 비대해지기는 하였지만 자엽유도되면서 배양체가 녹색으로 변

하였고 0.1 mg/l 의 농도에서는 배양체의 형태적인 변화는 없었지만 배양체가 녹색으로 변함을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2C). 0.1과 0.5 mg/l 에서 배양한 발아단계의 체세포배는 동일한 배지로 계대해주면 줄기와 뿌리가 유도되었는데 식물체 재분화율은 성장조절물질을 처리하지 않은 배지보다 각각 2.18 배와 1.65배 높았다. 따라서 헛개나무에서 낮은 농도의 BA는 저온조건에서와 같이 체세포배로부터의 식물체 재생을 촉진함을 알 수 있었다.

재분화된 식물체의 성장에 주는 무기염의 영향을 조사하기 위하여 유식물체를 MS와 1/3MS 고체배지에 옮겨 배양하였다 (Table 4). 그 결과 MS배지에서는 multiple shoot가 유도되고 shoot 성장은 억제되나 1/3MS 배지에서는 줄기신장속도가 MS 배지에 비하여 빨랐으며 새로운 shoot가 유기되기도 하였으나 MS배지에 비하여 수도 적고 성장이 저조하였다. 그리고 MS 배지에서는 뿌리가 유도되지 않았으나 1/3MS배지에서는 개체당 평균 3.3개의 뿌리가 유도되었다 (Fig. 2D).

체세포배는 치상한 절편의 체세포로부터 직접 유도되거나 더 많은 캘러스단계를 거치는 간접체세포배 발생을 통해서 유도되는데 때로는 체세포배 특히 배발생 캘러스의 현탁배양으로 유도된 체세포배의 성숙 및 발아과정에서 직접 2차배가 형성되기도 한다 (Ibaraki & Kurata, 2001; Lee *et al.*, 1998). 2차배발생은 식물체 재생능력의 제고 (Durham & Parrott, 1992), 높은 효율의 대량증식 (Raj *et al.*, 1990), 형질전환 (Raemakers *et al.*, 1997)등 여러 가지로 이용될 수 있다. 또한 많은 식물에서 2차배는 성장조절물질을 첨가하지 않은 배지에서도 자발적으로 유도되어 체세포배의 유지에 유용하게 이용할 수 있다 (Ammirato, 1989).

전보(엄 등, 2002)에서 이미 0.5 혹은 1 mg/l 2,4-D를 첨가한 고체배지에서 헛개나무의 배발생캘러스가 유도됨이 보고된 바 있다. 배발생 캘러스는 1 mg/l GA3을 처리하였을 때에만 배가 발아하였으나 정상적인 형태를 갖추지 못하였으며 식물체 재분화도 이루어지지 않았다. 일반적으로 고농도의 옥신 특히 2,4-D는 배발생세포의 유도에는 효과적이거나 배발생세포의 체세포배로의 전환은 억제하는것으로 알려져있다. 최근 2,4-D 와 GA₃ 같은 성장조절물질이 체세포배의 발달을 억제하거나 기형배의 출현을 촉진한다는 결과가 발표되면서 (Hutchinson *et al.*, 1997; Konan *et al.*, 1994) 성장조절물질의 사용량을 될수록 줄이고 고온, 기아, 삼투압, 그리고 고농도의 무기염 처리로 2,4-D를 대체하려는 연구가 많이 진행되고 있다 (Feher *et al.*, 2003). 본 실험에서도 성장조절물질을 첨가하지 않은

Table 4. Effect of MS medium strength on the growth of plantlet of *H. dulcis* after 4 weeks in solid medium.

Media	Shoot number	Shoot length (cm)	Root number	Root length (cm)
1/3 MS	1.3 ± 0.5	3.8 ± 0.4	3.3 ± 0.8	1.2 ± 0.3
MS	3.7 ± 0.5	0.6 ± 0.1	0	0

배지에서 30°C의 고온조건하에서 2차배발생과정을 통해대량으로 체세포배와 배발생세포를 얻을 수 있었는데 이러한 배발생세포는 적합한 배양환경에서 신속히 체세포배로 전환되고 발달속도도 매우 빨랐으며 액체배지에서 기형배의 출현이 없이 정상적으로 발아하였다.

2차배발생은 위에서 설명한 여러가지 장점이 있는 동시에 많은 경우에는 체세포배의 발아 및 식물체 재분화과정에서 저해요인으로 작용하기도 한다. 본 연구에서 배양과정 중에 헛개나무의 체세포배는 탈분화가 매우 쉽게 이루어짐이 관찰되었는데 정상적인 배양환경에서는 생장조절물질을 첨가하지 않은 배지에서도 헛개나무 체세포배는 쉽게 캘러스화되거나 갈변하면서 배발생캘러스가 유기되었으며 식물체 재분화가 이루어지지 않았다. 비슷한 결과로 고무나무, 호두나무 (Driver & Kuniyuki, 1984)와 다른 많은 목본류에서도 이러한 2차체세포배발생에 의한 식물체 재분화의 억제가 보고되었는데 이는 체세포배를 이용한 종묘생산의 산업화를 제약하는 주요 원인이 라고 볼 수 있다.

일반적으로 체세포배로부터 식물체 전환율이 낮은 식물의 재분화를 촉진하는 방법에는 GA₃처리 (Choi *et al.*, 1999), 저온처리 (Beuno *et al.*, 1992), 건조처리 (Gingas & Lineberger, 1989)등이 보고되어 있는데 본 연구에서 헛개나무 체세포배의 식물체 전환을 위하여는 낮은 배양온도 (18°C)와 낮은 농도의 BA (0.1 mg/l) 처리를 통하여 식물체 전환율을 높일 수 있었다. 엄 등 (2002)의 보고에서도 헛개나무의 마디배양에서 싸이토키닌처리에 의해 multiple shoot가 유도된다고 하였는데 체세포배의 경우에도 재분화된 유식물체를 싸이토키닌첨가 배지에서 오래 배양할 경우 multiple shoot가 형성되었고 뿌리유도가 억제 되었다.

적 요

본 연구를 통해 헛개나무의 기내유묘의 조직절편으로부터 배발생 캘러스의 유기 및 2차 배형성, 그리고 배발생캘러스의 현탁배양계로부터 체세포배를 대량생산하여 식물체로 재분화시키는 시스템을 확립하였다. 현탁배양을 통해 배발생세포의 유도 및 증식에는 모두 30°C의 고온이 효과적이었는데 이와 같은 온도조건에서 배발생캘러스 유도율과 배발생캘러스의 생장량은 각각 100%와 894.6 mg로 25°C에 비해 1.53배와 9.19배로 높게 나타났다. 배발생세포를 18°C에서 배양할 경우 체세포배로 전환되었고 배양 5주후 체세포배로 발달하였으며 25°C 이상의 배양온도에서는 배발생세포는 증식만 할뿐 체세포배는 형성되지 않았다. 체세포배로부터 식물체의 형성은 18°C 저온에서만 가능하였다. 배지에 0.1과 0.5 mg/l BA를 첨가할 경우 식물체 재분화율은 37%와 28%로 생장조절물질을 처리하지 않은 배지에 비해 2.2배와 1.7배로 높게 나타났다. 재분

화된 식물체의 성장에 주는 무기염의 영향을 조사하기 위하여 유식물체를 MS와 1/3MS 고체배지에 옮겨 배양한 결과 1/3MS 배지가 줄기신장과 뿌리의 유도에 적합하였다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 BioGreen21 지원 및 한방바이오연구소 지원에 의한 것으로 이에 감사를 표합니다.

LITERATURE CITED

- Ammirato PV** (1989) Recent progress in somatic embryogenesis. Newsletter IAPTC 57:2-16.
- Bueno MA, Astorgo R, Manzanera JA** (1992) Plant regeneration through somatic embryogenesis in *Quercus suber*. *Physiol. Plant* 85:30-34.
- Choi YE, Kim JW, Yoon ES** (1999) High frequency of plant production via somatic embryogenesis from callus or cell suspension cultures in *Eleutherococcus senticosus*. *Ann of Bot* 83:309-314.
- Durham RE, Parrott WA** (1992) Repetitive somatic embryogenesis from peanut cultures in liquid medium. *Plant Cell Rep* 11:122-125.
- Driver JA, Kuniyuki AH** (1984) In vitro propagation of paradox walnut rootstock. *Hort Science* 19:507-509.
- Fehér A, Pasternak TP, Dudits D** (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tiss Org Cult* 74:201-228.
- Gingas VM, Lineberger RD** (1989) Asexual embryogenesis and plant regeneration in *Quercus*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 17:191-203.
- Huchinson MJ, KrishnaRaj S, Saxena PK** (1997) Inhibitory effect of GA₃ on the development of thidiazuron-induced somatic embryogenesis in *Geranium pelargonium* × *hortorum* Bailey hypocotyl cultures. *Plant Cell Rep* 16:435-438.
- Ibaraki Y, Kurata K** (2001) Automation of somatic embryo production. *Plant Cell Tiss Org Cul* 65:179-199.
- Konan NK, Sanwan RS, Sanwan BS** (1994) Somatic embryogenesis from cultured mature cotyledons of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): Identification of parameters influencing the frequency of embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cul* 37:91-102.
- 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.
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Raemakers CJJM, Soflari E, Jacobsen E, Visser RGF** (1997) Regeneration and transformation of cassava. *Euphytica* 96:153-161.
- Raj Bhansall R, Driver JA, Durzan DJ** (1990) Rapid multiplication of adventitious somatic embryos in peach and nectarine by secondary embryogenesis. *Plant Cell Rep* 9:280-284.
- Roberts DR, Sutton BCS, Flinn BS** (1990) Synchronous and high frequency germination of interior spruce somatic embryos

- following partial drying at high relative humidity. Can J Bot 68:1086-1090.
- 김민희, 정우택, 이진하, 박영식, 신명기, 김호상, 김동훈, 이현용** (2000) 중국산과 국내산 헛개 나무 열매의 체내 알콜 분해능 및 간 해독 작용. 한국약용작물학회지 8:201-208.
- 엄승희, 신동용, 이현용, 김명조, 김종대, 최원철, 허권, 유창연** (2002) 헛개나무의 체세포배 발생 및 식물체 재분화. 한국약용작물학회지 10:41-45.
- 이강수** (2001) 온도 및 황산처리가 헛개나무 종자의 발아에 미치는 영향. 한국약용작물학회지. 9:166-172.
- 이미경, 김영길, 안상욱, 김민희, 이진아, 이현용** (1999) 헛개나무의 생리활성 물질 탐색. 한국약용작물학회지. 7:185-192.