

낙엽송의 체세포배 발생 및 발아에 미치는 TIBA, PCIB 및 phloroglucinol의 효과

김용욱 · 문흥규

Effect of TIBA, PCIB and phloroglucinol on somatic embryo maturation and germination in Japanese larch (*Larix leptolepis*)

Yong-Wook Kim · Heung-Kyu Moon

Received: 6 June 2009 / Accepted: 3 July 2009

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract The effect of auxin transport inhibitor (TIBA and PCIB) or auxin synergist (phloroglucinol) on somatic embryo maturation and germination in Japanese larch (*Larix leptolepis*) was examined. The addition of 15.8 mg/L ABA+5.0 mg/L PCIB showed most promoted the maturation of cotyledon-staged somatic embryos (177.7/90 mg ESM). In contrast, with treatment of 5.0 mg/L PCIB or 5.0 mg/L TIBA, no somatic embryos were obtained. Considering from this result, PCIB or TIBA alone could not substitute for exogenously supplied ABA for maturation of somatic embryos. In the test of below concentration of 5.0 mg/L PCIB, the highest results were recorded in 15.8 mg/L ABA+2.0 mg/L PCIB (109.3/90 mg ESM) or 15.8 mg/L ABA+5.0 mg/L PCIB (103.7/90 mg ESM). However, 5.0 mg/L phloroglucinol (0/90 mg ESM) or no ABA addition (3/90 mg ESM) had little influence on somatic embryos maturation. In germination study, the highest frequency of plantlet regeneration obtained from the somatic embryos which had matured on 15.8 mg/L ABA+5.0 mg/L PCIB (67.9%). However, either 5.0 mg/L PCIB nor 5.0 mg/L TIBA resulted in obtained from plantlets.

서론

낙엽송 [*Larix leptolepis* (Sieb. et Zucc.) Gordon]은 낙엽 침엽교목으로 1904년에 일본으로부터 도입되었으며, 수고 30 m, 직경 1 m까지 자라는 주요한 조림 수종중의 하나

나로 유시생장이 빨라 수령이 30년생이면 약 ha 당 259 m³의 목재를 생산하는 우리나라의 주요 용재수종중의 하나이다 (임업연구원, 1992).

낙엽송의 클론증식은 삽목방법이 가장 널리 이용되고 있으나 삽목에 사용되는 삽수는 모수의 연령이 높아질수록 발근율은 현저히 감소하며, 유령목 (幼齡木)의 삽수를 이용할 경우 그 삽목묘는 몇 년 간 사향성 (斜向性)생장을 보이는 단점이 있다 (구영본, 1995). 또한 클론간에 따라 발근율 차이를 크게 보여 일정한 양의 클론묘를 지속적으로 생산할 수 없다. 이러한 단점을 극복하기 위해 조직배양 기술을 통한 우량개체의 대량번식이 제시되고 있는데 그중 체세포배 발생방법을 이용한 식물체 생산이 현재 가장 널리 이용되는 기술이다.

*Larix*속 수종의 체세포배 유도에 관한 연구는 Nagmani와 Bonga (1985)가 유럽낙엽송 (*L. decidua*)의 배유 (female gametophyte)조직으로부터 배발생조직을 처음으로 유도한 이후로 *L. laricina* (Klimaszewska et al. 1997), *L. leptoeuropaea* (Lelu et al. 1994), *L. occidentalis* (Thompson and von Aderkas, 1992) 등의 수종에서 이루어졌으며 낙엽송의 경우 Kim 등 (1999; 2007)의 체세포배 유도 및 식물체 재분화에 관한 연구가 있다.

체세포배 발생의 재료가 되는 배발생조직을 증식하고 생장을 지속하기 위해선 2,4-D와 같은 옥신류 첨가가 필수적이다. 그리고 배발생조직으로부터 체세포배 발생시에는 옥신류를 제거하고 대신에 abscisic acid (ABA) 첨가하여 체세포배 발생을 촉진하게 된다. 그러나 배발생조직을 2,4-D 및 NAA와 같은 옥신류 첨가배지에서 오랫동안 증식하게 되면 더 이상 배지에 옥신류를 첨가하지 않아도 배발생조직 자체내에서 내생 (endogenous) 옥신류 생산이 가능하게 되는데 이러한 배발생조직내의 옥신류 잔존은 ABA 활성을 저해하여 체세포배 발생이 잘 이루어지지 않

Y.-W. Kim (✉) · H.-K. Moon
국립산림과학원 산림생명공학과
(Division of Biotechnology, Korea Forest Research Institute,
Suwon, Gyeonggi-do 441-350, Korea)
e-mail: dragonkim@forest.go.kr

는 주요 요인이 된다 (Find et al. 2002). 따라서 배발생조직 내의 이러한 내생 옥신류 활성을 억제시키는 항옥신류를 첨가하여 체세포배 발생을 더욱 용이하게 할 필요가 있다.

항옥신류중 하나인 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA)는 Nordmanns 전나무의 체세포배 발생시에 유효하였으며 (Find et al. 2002), Chen 등 (2004)은 *Oncidium*의 엽조직 절편체로부터 체세포배 발생에 효과가 있음을 보고하고 있다. 한편 다른 종류의 항옥신류인 2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic acid (PCIB)는 *Brassica juncea*의 소포자배양시 배발달 촉진을 보고하고 있고 (Agarwal et al. 2006), 또한 Liao 등 (2008)에 따르면 가문비나무류인 *Picea morrisonicola*의 체세포배 유도 시에도 PCIB 및 TIBA 처리로 발달단계 2의 체세포배 생산에 효과적임을 보고하고 있어 항옥신류와 체세포배 발생과의 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다. 반면에 옥신synergist로 알려진 phloroglucinol의 경우 Find 등 (2002)에 의하면 이 물질을 Nordmanns 전나무의 배발생조직에 첨가 시 조직증식율은 증가하였으나 체세포배 발생은 전혀 이루어지지 않음을 보고하고 있어 PCIB와 같은 항옥신류의 첨가가 절대적으로 필요함을 증명하였다.

따라서 본 연구의 목적은 낙엽송 체세포배 유도 시 항옥신류인 TIBA 및 PCIB 농도별 첨가 및 옥신상승제 (synergist)인 phloroglucinol을 첨가하여 체세포배 발생효과를 비교 및 조사하였으며 또한 항옥신류 첨가배지에서 유래된 체세포배를 발아시켜 신초 등의 기관분화 및 식물체 전환율에 관한 데이터를 얻고자 본 실험이 수행되었다.

재료 및 방법

식물재료

낙엽송의 배발생조직 획득을 위해 충북 충주에 위치한 국립품종관리센터 내의 낙엽송 클론 채종원에서 7월 초 미숙구과를 채취하였다. 채취한 구과로부터 종자분리는 인편을 뒤로 젖힌 후 상처가 나지 않도록 종자를 조심스럽게 분리하였으며, 분리한 종자표면 살균은 먼저 70% 에탄올로 1분간 처리 후 2% NaClO로 10분정도 침적한

다음 멸균증류수로 수차례 세척하였다.

배발생조직 유도

배발생조직 유도를 위해 LM (Litvay et al. 1985)배지를 기본으로 하였으며 2.0 mg/L 2,4-D, 1.0 mg/L BA, 1,000 mg/L L-glutamine (배지 열소독 후 첨가) 및 3.0% sucrose를 첨가하였고 0.4% gellan gum (Sigma)을 첨가시켜 반고형배지로 만들어 사용했다. 종자내의 미숙배 적출은 수술용 메스 (Feather, No 11)를 이용하여 종자를 양분 후 이루어졌으며 배양은 25±1℃, 암소에서 8주 동안 새로운 배지교환 없이 수행되었다.

배발생조직 증식

미숙배로부터 유도한 배발생조직의 증식은 염류의 양을 반으로 줄인 ½LM 배지에 2.0 mg/L 2,4-D, 1.0 mg/L BA, 1,000 mg/L L-glutamine 및 2.0% sucrose를 첨가한 배지에 2주 간격으로 계대배양 하여 체세포배 유도에 필요한 조직을 25±1℃, 암소에서 증식이 이루어졌다.

체세포배 유도

배발생조직을 ½LM 배지에 250 mg/L L-glutamine, 250 mg/L casein, 0.2 M sucrose, 15.8 mg/L ABA (배지 열소독 후 따로 첨가) 가 첨가된 액체배지에 현탁배양 한 후 5.5 cm 크기의 종이필터 (Whatman)위로 90mg 세포가 포함된 3 ml 정도의 세포현탁액을 깔아준 후 진공펌프를 이용하여 약 5초간 액체배지만을 제거한 다음 배발생조직이 포함된 종이필터를 0.6 % gellan gum을 첨가한 배지에 치상하는 식으로 체세포배를 발생시켰다. 배양조건은 25±1℃, 암소에서 8주간 새로운 배지로의 교환 없이 연속배양법으로 이루어졌다. 항옥신류인 PCIB, TIBA 및 옥신상승제 phloroglucinol의 농도별 처리에 의한 체세포배 유도 효과를 비교하기 위해 15.8 mg/L ABA를 대조구로 설정하고 5.0, 20.0 mg/L 각각의 PCIB 및 TIBA를 ABA와 혼합 혹은 단독으로 첨가하였으며 (Table 1) 또한 옥신 synergist

Table 1. Effect of PCIB and TIBA on the maturation of somatic embryo in *L. leptolepis*

Treatments (mg/L)	Cotyledon-staged somatic embryo production (no./90 mg FW)
1. 15.8 ABA	62.7±4.5*
2. 15.8 ABA+5.0 PCIB	177.7±10.5
3. 15.8 ABA+20.0 PCIB	30.7±6.7
4. 5.0 PCIB	0
5. 15.8 ABA+5.0 TIBA	40.7±10.4
6. 15.8 ABA+20.0 TIBA	27.3±4.8
7. 5.0 TIBA	0

* Mean±Standard error

Table 2. Effect of various PCIB concentrations, phloroglucinol (auxin synergist) and on the maturation of somatic embryo in *L. leptolepis*

Treatments (mg/L)	Cotyledon-staged somatic embryo production (no./90 mg FW)
1. 15.8 ABA	83.0±10.2
2. 15.8 ABA+1.0 PCIB	60.0±15.1
3. 15.8 ABA+2.0 PCIB	109.3±13.0
4. 15.8 ABA+5.0 PCIB	103.7±16.5
5. 15.8 ABA+5.0 phloroglucinol	40.7±2.3
6. 5.0 phloroglucinol	0
7. -ABA	3.0±1.7

* Mean±Standard error

Table 3. Effect of various PCIB or TIBA concentrations on the germination of somatic embryo in *L. leptolepis*

Treatments (mg/L)	Shoot (%)	Hypocotyl (%)	Root (%)	Plantlets (%)
1. 15.8 ABA	56.3±5.5	86.2±5.7	61.8±1.9	48.8±2.8
2. 15.8 ABA+5.0 PCIB	88.2±3.4	93.5±4.5	79.2±6.3	67.9±6.5
3. 15.8 ABA+20.0 PCIB	46.8±18.2	97.5±2.5	75.9±9.2	39.7±14.1
4. 5.0 PCIB	0	0	0	0
5. 15.8 ABA+5.0 TIBA	53.5±5.6	93.2±6.8	20.1±2.7	12.3±0.8
6. 15.8 ABA+20.0 TIBA	61.3±17.6	97.4±2.7	71.3±2.5	51.3±17.1
7. 5.0 TIBA	0	0	0	0

* Mean±Standard error

인 phloroglucinol를 5.0mg/L농도로 ABA와 공조처리하거나 혹은 단독으로 처리 (Table 2) 하여 체세포배 발생 시 항옥신류 혹은 옥신 synergist의 첨가효과를 배양 8주 후 자엽단계 체세포배의 발생정도를 비교 및 조사하였다.

체세포배 발아

PCIB 등의 항옥신류 처리 유래의 체세포배 발아 정도를 조사하기 위해 각 처리구의 배발생조직으로부터 유도된 자엽단계 체세포배만을 분리하여 ½LM 배지에 2.0% sucrose 및 0.4%의 gellan gum을 첨가한 발아배지 위로 평행으로 배양하였고 발아조건은 25±1°C, 18/6 광주기를 가진 광조건 (50 μEm⁻²s⁻¹, Philips, F40 CW, 40 watt) 하에서 6주 배양 후 싹 등 기관 분화율 및 식물체 전환율을 조사하였다 (Table 3).

결과 및 고찰

항옥신류 (auxin antagonist)처리에 의한 체세포배 유도 효과

표 1은 PCIB 및 TIBA처리에 따른 체세포배 유도 효과에 관한 것으로 최대의 체세포배 유도는 15.8 mg/L ABA+

5.0 mg/L PCIB 처리구 (177.7개/90 mg ESM)에서 나타났으며 15.8 mg/L ABA+5.0 mg/L TIBA 처리구 (40.7개) 보다도 훨씬 높아 PCIB 첨가 시 TIBA보다는 더욱 효과적인 것으로 나타났다 (Table 1). 그러나 5.0 mg/L PCIB 혹은 TIBA 단독 처리구에서는 자엽단계의 체세포배는 전혀 유도되지 않아 ABA 첨가 없이는 그 효과가 전혀 나타나지 않았지만 15.8 mg/L ABA와 함께 첨가 시 체세포배 발생효과는 높은 것으로 보여 낙엽송의 체세포배 발생에는 ABA 첨가가 필수적임을 알 수 있다. 테다소나무 (Pullman 등, 2003), 리기테다소나무 (Kim et al. 2007) 및 낙엽송 (Kim et al. 2007) 등의 침엽수종 체세포배 유도 시에도 ABA 첨가는 필수적인 것으로 보고되고 있는데 본 실험에서도 PCIB 혹은 TIBA 첨가보다는 ABA첨가가 이루어진 처리구에서만 체세포배 유도되었다. 체세포배 발생을 위한 항옥신류인 PCIB 및 TIBA 효과에 대한 보고는 다양한데 *Oncidium*의 엽조직으로부터 체세포배 유도 시에는 0.05와 0.25 mg/L TIBA 첨가로 가장 높은 체세포배 발생율을 보고하고 있고 (Chen and Chang, 2004), Agarwal 등 (2006)은 *Brassica juncea*의 미소포자로부터 체세포배 발생시에도 10 mg/L PCIB 첨가로 가장 높은 발생율을 보고하고 있어 체세포배 유도를 위한 항옥신류의 첨가효과를 증명하고 있다. 또한 Nordmanns전나무의 체세포배 유도 시에도 TIBA 및 PCIB 첨가로 높은 유도율을 보고하고 있어

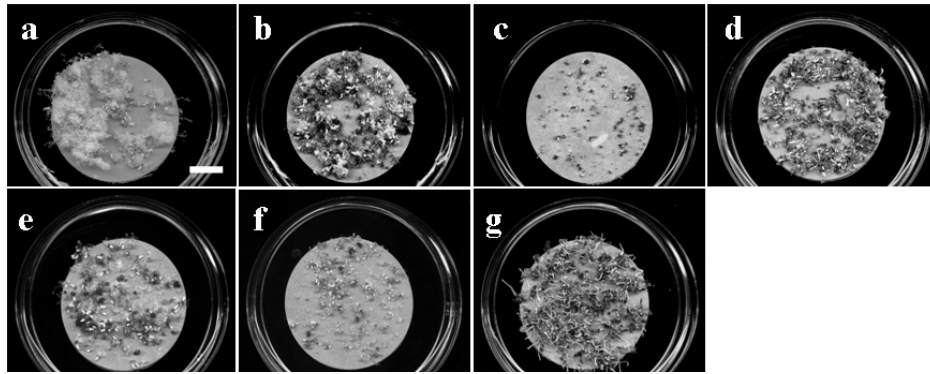


Fig. 1 Comparison of effect of TIBA and PCIB on somatic embryo maturation in *L. leptolepis*. These pictures were taken after 8 weeks in culture. a: 15.8 mg/L ABA; b: 15.8 mg/L ABA+5.0 mg/L PCIB; c: 15.8 mg/L ABA+20.0 mg/L PCIB; d: 5.0 mg/L PCIB; e: 15.8 mg/L ABA+5.0 mg/L TIBA; f: 15.8 mg/L ABA+20.0 mg/L TIBA; g: 5.0 mg/L TIBA; bar=1.4 cm

(Find et al. 2002) 수중에 따라 다소 차이는 보이나 항옥신류의 첨가가 유리한 것은 분명한 것으로 보인다. 반면 항옥신제 첨가 시 억제현상 또한 보고되는데 Choi 등 (2001)은 가시오갈피의 체세포배 유도 및 유도된 체세포배의 싹/뿌리 분화를 억제하며, 또한 인삼의 자엽절편체로부터 체세포배 유도 시 10 mg/L TIBA첨가 시에는 그 형성이 완전히 억제되었고 2.5-5.0 mg/L의 농도에서는 체세포배가 자엽절편체 표면에 산발적으로 발생이 되었으나 그 형태는 항아리형태를 보이는 다소 기형적임을 보고하고 있어 TIBA첨가로 모든 수종의 체세포배 발생이 유리한 것 만은 아닌 것으로 보인다.

본 실험의 경우에서도 15.8 mg/L ABA+20.0 mg/L PCIB 혹은 TIBA의 첨가로 발생하는 체세포배의 형태는 대체로 하배축 길이가 짧고 그 크기가 작으며 5.0 mg/L PCIB 혹은 TIBA 첨가구에서는 자엽단계의 체세포배 유도 대신에 하배축이 길게 신장되며 자엽은 발달되지 않고 대신 뿌리만 짧게 발생하는 비정상적인 체세포배의 발아형태를 보였다 (Fig. 1)

항옥신 류 및 옥신 상승제 처리에 의한 체세포배 유도 효과

표 1의 결과를 토대로 15.8 mg/L ABA+5.0 mg/L PCIB 처리가 체세포배 유도에 효과적인 것으로 확인이 되어 PCIB를 1.0, 2.0 및 5.0 mg/L 농도별, 그리고 옥신상승제인 5.0 mg/L phloroglucinol를 단독 혹은 15.8 mg/L ABA와 혼합 처리하여 PCIB와 비교하였다 (Table 2). 표 2에서 보는 바와 같이 최대 체세포배 유도는 109.3개의 체세포배 유도를 보인 15.8 mg ABA+2.0 mg/L PCIB에서 가장 높았으며 15.8 mg ABA+5.0 mg/L PCIB (103.7개)의 처리구와 비슷한 결과를 보였다. 그러나 옥신상승제인 phloroglucinol를 ABA와 혼합처리 경우 40.7개로 저조하게 나타났으며 5.0 mg/L phloroglucinol 처리 시에는 자엽단계의 체세포배는 전혀 발생되지 않았다. 또한 ABA의 첨가 유무에 따라

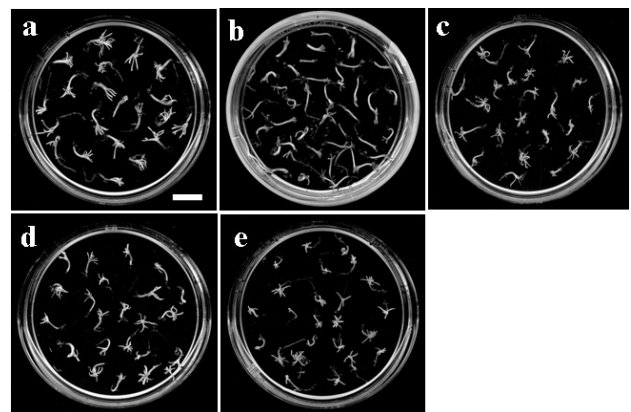


Fig. 2 Comparison of effect of TIBA and PCIB on somatic embryo germination in *L. leptolepis*. These pictures were taken after 6 weeks in culture. a: 15.8 mg/L ABA; b: 15.8 mg/L ABA +5.0 mg/L PCIB; c: 15.8 mg/L ABA+20.0 mg/L PCIB; d: 15.8 mg/L ABA+5.0 mg/L TIBA; e: 15.8 mg/L ABA+20.0 mg/L TIBA; bar=1.4 cm

그 유도수는 큰 차이를 보였는데 ABA 무첨가 인 경우 3.0개의 체세포배 유도로 15.8 mg/L ABA 처리구보다 훨씬 저조한 결과를 보여 (Table 2) 표 1에서와 마찬가지로 ABA 첨가는 낙엽송의 체세포배 유도 시에는 필수적이라는 것을 보여준다. 옥신상승제인 phloroglucinol첨가 효과에 대한 연구보고는 매우 드문데 대개 배발생조직 유도 및 증식의 경우 2,4-D 및 NAA와 같은 옥신첨가가 필요하지만 장기간의 옥신 첨가는 배발생조직의 증식 단계에서 체세포배 성숙단계로의 전환 시에는 외래공급(exogenous)의 옥신은 더 이상 필요치 않으며 배발생조직내에 존재하고 있는 내생(endogenous) 옥신으로 인해 오히려 체세포배 발생에 억제효과를 보인다. 이것은 표 1의 15.8 mg ABA+5.0 mg/L PCIB (177.7개)와 표 2의 15.8 mg ABA+5.0 mg/L phloroglucinol (40.7개)의 비교에서 옥신상승제가 체세포배 발생을 억제하는 이유이다. 특히 5.0 mg/L 농도의 단독 PCIB, TIBA 및 phloroglucinol를 첨가 시에는 자엽단

계의 체세포배는 전혀 유도되지 않았는데 아마도 5.0 mg/L 이상의 농도에서는 체세포배 발생에 오히려 억제 효과가 있음을 알 수 있다 (Table 1,2).

항옥신류 처리 유래 체세포배의 발아

표 3은 PCIB 및 TIBA 첨가로 유도된 체세포배를 발아시켰을 때 싹, 하배축, 발근유도 및 식물체전환율 등의 기관발생 정도를 조사한 것으로 15.8 mg/L ABA+5.0 mg/L PCIB 처리구에서 각각 88.2, 93.5, 79.2 및 67.9%로 가장 높은 기관유도율을 보였으며 이는 표 1의 최대 체세포배 유도수를 보인 처리구와 일치한다. 또한 대조구인 15.8 mg/L ABA 단독처리구의 식물체 재분화율 (48.8%) 비교 시 보다 높은 수치를 보여 5.0 mg/L PCIB 첨가로 건전한 자엽단계의 체세포배 유도뿐 만 아니라 차후 식물체 전환과 같은 체세포배 발아 형성까지 영향을 미치는 것을 알 수 있다. 체세포배 발아에 영향을 미치는 항옥신류에 대한 보고는 Choi 등 (2001)은 TIBA를 처리하여 항옥신류가 첨가된 배지에서 발생된 체세포배로부터 유래한 발아 식물체에서는 싹 및 뿌리의 정단분열조직 및 유관속 발달을 억제하여 비정상적으로 발달되는 형상을 보였으며 결국에는 싹 및 뿌리가 없는 식물체의 발생으로 기인된다고 보고하고 있어 항옥신류 첨가에 부정적인 견해를 보였다.

배발생조직으로부터 체세포배 유도에는 항옥신류의 처리로 더욱 체세포배 형성이 촉진됨을 확인하였으며 이에 관한 연구는 이미 몇몇 수준에서 확인되었다 (Chen et al. 2004; Finf et al. 2002). 특히 낙엽송의 경우 15.8 mg/L ABA+5.0 mg/L PCIB에서 가장 높은 자엽단계 체세포배의 유도가 가능하였으며 (Table 1,2) 대조구인 ABA 단독처리구보다 효과적인 것으로 보아 식물체내의 옥신수송을 억제함으로써 체세포배 유도가 더욱 촉진됨을 알 수 있고, PCIB 농도는 2.0 혹은 5.0 mg/L 정도가 적당한 것으로 나타났다. 한편 TIBA의 경우 ABA와 함께 첨가 시에는 체세포배 발생 수가 그리 높지 않아 PCIB 가 TIBA 보다 훨씬 효과적임을 알 수 있다. 옥신상승제인 phloroglucinol을 첨가 시에도 저조한 체세포배 유도 수를 보여 낙엽송의 체세포배 발생에는 옥신생성을 저해하는 PCIB가 필요한 것으로 결론지을 수 있다. 또한 체세포배 발아 시에도 15.8 mg/L ABA+5.0 mg/L PCIB 처리구에서 유래된 체세포배에서 가장 높은 기관 형성을 및 식물체 전환율을 보여 초기 건전한 체세포배 유도가 차후 식물체 전환과도 매우 밀접한 상관관계가 있음을 보여준다.

이상의 결과는 항옥신제 처리로 고빈도의 체세포배 발생을 달성하고 나아가 클론식물체 대량생산뿐만 아니라 신품종의 개발연구에도 널리 활용될 수 있을 것이다.

적 요

낙엽송의 체세포배 발생 및 발아에 미치는 항옥신제 (auxin antagonist) (TIBA 및 PCIB) 혹은 옥신상승제 (auxin synergist) (phloroglucinol)의 효과를 조사하였다. 체세포배 발생 비교에는 15.8 mg/L ABA+5.0 mg/L PCIB의 첨가시 가장 많은 자엽단계의 체세포배 (177.7/90 mg ESM) 유도가 가능하였으나 5.0 mg/L PCIB or 5.0 mg/L TIBA 첨가시에는 체세포배가 전혀 발생되지 않았다. 이 결과는 체세포배 발생을 위해서는 PCIB 혹은 TIBA의 단독처리만으로는 안되고 ABA첨가 또한 필수적이라는 것을 암시한다. 5.0 mg/L PCIB 이하의 농도 비교실험에서는 15.8 mg/L ABA+2.0 mg/L PCIB (109.3/90 mg ESM) 혹은 15.8 mg/L ABA+5.0 mg/L PCIB (103.7/90 mg ESM)의 처리구에서 가장 높은 체세포배 유도수를 보였다. 그러나 5.0 mg/L phloroglucinol (0/90 mg ESM) 혹은 ABA 무첨가구 (3/90 mg ESM)에서는 체세포배 발생효과가 거의 없었다. 체세포배의 발아실험에서는 가장 높은 식물체 전환율은 15.8 mg/L ABA+5.0 mg/L PCIB (67.9%)의 처리구에서 나타난 반면 5.0 mg/L PCIB 혹은 5.0 mg/L TIBA 처리구 유래 체세포배로부터는 식물체로 전혀 전환되지 않았다.

인용문헌

- 구영본, 1995. 낙엽송의 삽목에 의한 대량증식과 발근 기구 구명. 서울대학교 박사학위논문 pp 53-54
- 임업연구원, 1992. 한국수목도감 pp 14
- Agarwal PK, Agarwal PA, Custers JBM, Liu C, Bhojwani SS (2006) PCIB an antiauxin enhances microspore embryogenesis in microspore culture of *Brassica juncea*. Plant Cell Tiss Org Cult 86:201-210
- Chen JT, Chang WC (2004) TIBA affects the induction of direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Oncidium*. Plant Cell Tiss Org Cult 79:315-320
- Find J, Grace L, Krogstrup P (2002) Effect of anti-auxins on maturation of embryogenic tissue cultures of Nordmanns fir (*Abies nordmanniana*). Physiol Plant 116:231-237
- Kim YW, Youn Y, Noh ER, Kim JC (1999) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of Japanese larch (*Larix leptolepis*). Plant Cell Tiss Org Cult 55:95-101
- Kim YW, Moon HK (2007) Enhancement of somatic embryogenesis and plant regeneration in Japanese larch (*Larix leptolepis*). - Plant Tiss Org Cult 88:241-245
- Klimaszewska K, Devantier Y, Lanchance D, Lelu MA, Charest RJ (1997) *Larix laricina* (tamarack) : somatic embryogenesis and genetic transformation. Can J For Res 27:538-550
- Lelu MA, Bastien C, Klimaszewska K, Charest PJ (1994) An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix × leptoeuropaea*) : Part 2. Control of germination

- and plantlet development. *Plant Cell Tiss Org Cult* 36:117-127
- Liao YK, Liao CK, Ho YL (2008) Maturation of somatic embryos in two embryogenic cultures of *Picea morrissonicola* Hayata as affected by alternation of endogenous IAA content. *Plant Cell Tiss Org Cult* 93:257-268
- Litvay JD, Verma DC, Johnson MA (1985) Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Rep* 4:325-328
- Pullman GS, Namjoshi K, Zhang Y (2003) Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): improving culture initiation with abscisic acid and silver nitrate. *Plant Cell Rep* 22:85-95
- Nagmani R, Bonga JM (1985) Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua*. *Can J For Res* 15:1088-1091
- Thompson RG, von Aderkas P (1992) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of western larch. *Plant Cell Rep* 11:379-385.