J Plant Biotechnol (2011) 38:186-190
DOI:10.5010/JPB.2011.38.2.186

Research Article

백합나무의 체세포배 유도에 미치는 ABA, 환원질소원 및 삼투압제 효과

김용욱 · 한무석 · 문흥규 · 박소영

Effects of ABA, reduced nitrogen source and osmoticum for somatic embryogenesis in *Liriodendron tulipifera*

Yong Wook Kim · Mu Seok Han · Heung Kyu Moon · So Young Park

Received: 16 June 2011 / Accepted: 20 June 2011
ⓒ Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract This study was conducted to evaluate effects of various kinds or concentrations in abscisic acid (ABA), reduced nitrogen sources (casein hydrolysate, casamino acid and L-glutamine) and osmoticum for production of somatic embryos (SEs) from pro-embryogenic mass (PEM) in yellow poplar (*Liriodendron tulipifera*). In comparison of various concentrations of ABA, the highest number (640/10 mg PEM) of SEs was marked in the treatment of 0.5 mg/L. With higher concentration than 0.5 mg/L ABA, number of induced SEs were decreased. And the lowest number of SEs were obtained from the treatment of 20 mg/L ABA. Differences of 8 treatments of the nitrogen sources in the medium were also compared. In the experiment of 8 treatments for SEs production, the highest result showed in the treatment of 500 mg/L casamino acid (223/5 mg PEM). In comparison of different kinds/concentrations of osmotica for SEs induction, the best response was obtained from the treatment of 4% sucrose (317/5 mg PEM). In contrast, no SEs were found from the treatments supplemented with any concentrations of maltose.

Keywords abscisic acid, nitrogen sources, osmotica, somatic embryo, yellow poplar

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

서 론

백합나무는 목 (木)백합 혹은 튤립나무로 불리우며, 영어 이름으로는 yellow poplar, whitewood 라고도 한다. 목재는 가구재, 합판 패널 등의 용도로 사용되는데 특히 병충해에 강하고 밀원나무로도 유용하다. 또한 백합나무는 최근 산림바이오 순환림 뿐만 아니라 환경정화수로도 유용하여 많은 관심을 끌고 있는 수종 중 하나이다. 특히 벌채까지의 긴 세월을 요하는 다른 수종과는 달리 비교적 짧은 시간에 재적생장이 우수한 수종으로서 미래의 목재 수급에 중요한 위치를 점할 수 있는 수종이기도 하다. 묘목생산은 주로 종자발아로 이루어지며 묘목의 대량 생산 및 보급을 위한 종자는 거의 수입에 의존하고 있으나, 최근 백합나무의 조림물량 증가와 원산지에서 종자 물량확보가 어려워 조림용 종자의 안정적 수급에 다소 어려움이 있다.

이러한 문제점을 극복하기 위하여 체세포배 발생 기술을 이용한 묘목생산으로 종자수급에 다소 기여할 수 있으며 신품종개발을 위한 클론증식 및 유전 형질전환 등의 다양한 생물공학 연구로의 적용이 가능하다. 특히 제한 없는 연중 클론증식이 가능하여 궁극적으로는 클론임업 달성을 이룰 수도 있다.

백합나무 체세포배 연구의 첫 사례는 1986년 Merkle과 Sommer가 미숙배를 2,4-D 및 BA 등이 첨가된 Blaydes 배지에 배양하여 연노란색의 구형상태의 배발생조직을 유도한 후 그로부터 체세포배를 발생시켜 식물체까지 재분화 한 것이 처음이다. 그 후 Merkle 등 (1990)은 액체배양을 실시하여 sieving 과정을 통해 60-70%의 동조화 (synchronization)된 체세포배 유도를 보고하였으며, 또한 미숙종자 채취시기에 따른 적정 배발생조직 유도와의 관계를 보고하기도 했다 (Merkle et al. 1991). 그리고 Dai 등

(2004)은 *L. tulipifera* × *chinese*의 인공교배된 종자의 미숙배를 배양하여 배발생조직을 유도 후 이 조직으로부터 다량의 체세포배 유도를 보고하여 이 기술을 통한 백합나무의 대량생산 및 실용화의 가능성을 더욱 높였다. 반면 백합나무의 생물공학의 국내연구는 미진한데 이 등 (2003)의 배발생조직 유도를 위한 백합나무의 미숙종자 채취시기에 관한 연구가 있고, 손 등 (2005)은 배발생조직 발생을 위한 모수 유전자형 및 배양 시 영향하는 빛(light)의 상호관계를 조사하였으나 체세포배 발생을 위한 구체적인 실험 프로토콜 개발은 보고되지 않아 차후 체세포배 발생을 통한 묘목의 대량생산을 위한 기술개발에는 크게 미흡한 실정이다.

따라서 본 실험은 증식된 백합나무의 배발생조직으로부터 체세포배 유도에 영향하는 ABA, 환원질소원 및 삼투압제 종류 및 농도에 따른 체세포배 유도의 기술 개발로 차후 백합나무 클론대량생산이 가능한 프로토콜 개발을 위해 수행되었다.

재료 및 방법

식물재료

배발생조직 유도를 위한 재료인 미숙종자는 경기도 수원에 위치한 국립산림과학원 산림자원 육성부 내에 자생중인 약 40년생 성숙목으로부터 7월초 풍매 미숙구과를 채취하여 종자를 분리한 다음 배양하였다. 종자표면 살균은 70% 에탄올로 1분간 처리 후 2% NaClO로 10분정도 침적한 다음 멸균증류수로 수차례 세척 후 배양에 이용하였다.

배발생조직 유도 및 증식

배발생조직 유도는 LM (Litvay et al. 1985) 배지에 2.0 mg/L 2,4-D, 0.25 mg/L BA, 1,000 mg/L L-glutamine (열소독 후 첨가) 및 3.0% sucrose를 첨가하였고 0.4% gellan gum (Sigma)을 첨가시켜 반고형 배지로 만들어 사용했다. 종자내의 미숙배분리 배양은 힘들기 때문에 종자를 양분하여 절단면을 배지에 직접 접하는 식으로 배양하였고, 배양환경은 25±1℃, 암소에서 8주 동안 새로운 배지교환 없이 이루어졌다. 배발생조직 유도 후 증식은 유도배지 조성과 동일하였고 약 0.5 cm 정도 크기 이상으로 자라면 새로운 배지로 이식하여 증식시켰다.

체세포배 유도

체세포배 유도를 위한 기본배지 조성은 염류의 반을 줄인 ½LM 배지에 4% sucrose가 첨가된 액체배지에 배발생조직을 현탁시킨 후 직경 5.5 cm 크기의 종이필터 (Whatman) 위로 세포농도가 ml 당 2.5 혹은 5 mg이 포함된 2 ml의 세포현탁액을 깔아준 후 진공펌프를 이용하여 약 5초간 액체배지만을 제거하였다. 그 후 배발생조직이 포함된 종이필터를 4% sucrose 및 0.4% gellan gum이 첨가한 반고형 배지에 치상하여 체세포배를 발생시켰다. 배양조건은 25±1℃, 암소에서 8주간 새로운 배지로의 교환 없이 연속배양법으로 이루어졌다.

ABA 농도 별 체세포배 유도 효과

ABA 농도 별 최적 체세포배 유도 효과를 알아보기 위하여 수행하였다. ABA농도는 0～20 mg/L 범위로 총 9조합이며 ½LM 배지에 4.0% sucrose 및 0.4% gellan gum을 첨가한 반고형 배지에 치상하여 체세포배를 발생시켰으며 체세포배 유도효과는 배양 8주 후에 조사하였다. 배지로의 ABA 용액 첨가는 배지 열소독 후 50℃ 정도 식혀서 필터멸균 후 이루어졌으며 각 처리구 (농도 별) 당 20반복 (페트리디시) 배양하였다.

환원질소원 조합 및 농도 별 체세포배 유도 효과

환원질소원 종류 및 농도에 따른 최적 체세포배 유도 효과를 알아보기 위하여 수행되었다. 본 실험에 사용된 질소원은 L-glutamine, casein hydrolysate (CH) 및 casamino acid (CA)이다. 총 8종류의 조합으로 실험이 이루어졌으며 ½LM 배지에 4.0% sucrose 및 0.4% gellan gum이 첨가한 반고형 배지에 치상하여 체세포배를 발생시켰으며 체세포배 유도효과는 배양 8주 후에 조사하였다. 배지로의 환원질소원 용액 첨가는 배지 열소독 후 50℃ 정도 식혀서 필터멸균 후 이루어졌고 각 처리구 (조직라인 별) 당 20반복 (페트리디시) 배양하였다.

삼투압제 종류 및 농도 별 체세포배 유도 효과

본 실험은 최적 체세포배 유도를 위한 삼투압제 종류 및 농도효과를 알아보기 위하여 수행되었다. 본 실험에 비교된 삼투압제는 sucrose 및 maltose이며 sucrose는 0～8% 까지, maltose는 4～8% 등의 조합으로 이루어졌으며 ½LM 배지에 0.4% gellan gum이 첨가한 반고형 배지에 치상하였다. 삼투압제 종류 및 농도 효과에 따른 체세포배 유도 효과는 배양 8주 후에 조사하였으며 각 처리구 (농도 별) 당 20반복 (페트리디시) 배양하였다.

결과 및 고찰

ABA 농도 별 체세포배 유도 효과

ABA 농도에 따른 백합나무 체세포배 유도 효과를 비교

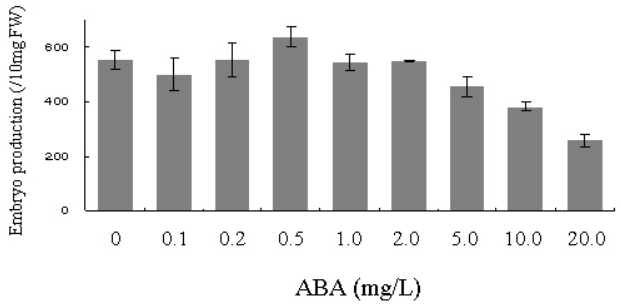

Fig. 1 Comparison of somatic embryo productions with 9 ABA concentrations in *L. tulipifera*. (±: standard error)

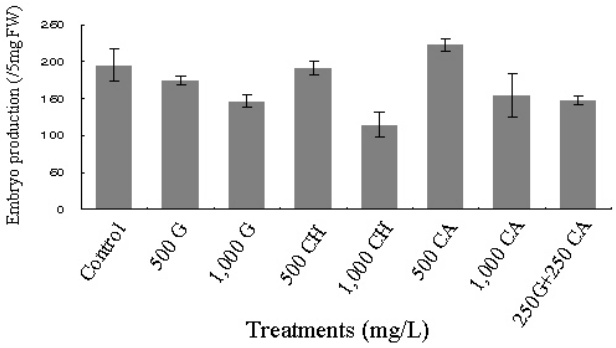

Fig. 2 Comparison of somatic embryo productions with 8 different reduced nitrogen sources in *L. tulipifera*. (±: standard error), CA: casamino acid, CH: casein hydrolysate, G: L-glutamine

한 결과는 Figure 1과 같다. 최대 체세포배 유도는 0.5 mg/L ABA 농도에서 가장 높은 640개/10 mg 조직를 보였으며 (Fig. 1), ABA 무첨가 시에도 556개의 높은 유도 수를 보여 백합나무 체세포배 유도에는 ABA 첨가로 인한 효과는 그다지 높지 않게 나타났다. ABA농도에 따른 체세포배 유도 수는 0.5 mg/L 이후로 점차 다소 감소하는 경향을 보였으며, 특히 20.0 mg/L 농도에서는 257개로 가장 저조한 유도 수를 보여 고농도 ABA 첨가 시에는 체세포배 유도가 현저히 억제됨을 알 수 있다 (Fig. 1). Dai 등 (2004)은 잡종 백합나무 (*L. tulipifera* × *L. chinense*) 체세포배 유도 시 4.0 mg/L 첨가는 무첨가에 비해 약 4.2배가 많은 현저한 체세포배 유도 수 차이를 보여 ABA 첨가 효과를 보고하고 있다. 반면 Merkle 등 (1990)은 백합나무 체세포배의 동조화 (synchronization) 발달 촉진을 위해 ABA 첨가로 차후 발아단계에서 저조한 발아율을 보여 체세포배 발생을 위한 ABA처리 효과가 뚜렷하지 않다고 하였다. 본 실험의 경우 고농도 ABA (5 mg/L이상)로 처리로 유도된 체세포배의 경우 발아단계에서는 정상적인 식물체 재분화가 이루어지지 않아 체세포배내에 어느 정도 잔존한 ABA로 인해 정상적인 발아가 제대로 이루어지지 않음을 알 수 있었다. Lee 등 (2002)은 두릅나무에서 1.0 mg/L ABA 첨가로 유도한 심장형 체세포배에서 가장 높은 60.7%의 식물체 재분화율을 보고하였고, Sharma 등 (2004) 또한 동백나무 심장형 체세포배에 5.0 mg/L ABA 첨가 할 경우 전분, 단백질 함량 증가 및 발아율 또한 증진됨을 보고한 바 있어 ABA 첨가로 인한 체세포배 발달 및 차후 발아율에 미치는 긍정적인 영향을 보고하였다. 침엽수종의 경우 체세포배 유도에는 ABA첨가가 필수적인데 그 효과로서는 ABA 첨가로 유도된 체세포배의 조기발아 억제 및 체세포배 발달촉진, 또한 저온에 견딜 수 있는 Late Embryogenesis Abundant (LEA) 단백질 합성 (Beardmore and Charest, 1995), triglycerides 및 lipids (Attree et al. 1992) 축적을 위한 자극 등을 가장 큰 효과로 들 수 있다. 그러나 활엽수종의 체세포배 발달의 경우 단지 조직증식을 위해 첨가되었던 2,4-D 및 NAA 등의 제거만으로도 침엽수종과는 달리 쉽게 이루어지는 경우 (Kim et al. 2006)도 있어 수종에 따라 최적조건을 구명하는 것이 필수적이다.

환원질소원 조합 및 농도 별 체세포배 유도 효과

백합나무 체세포배 발생에 있어 8종류의 환원질소원 첨가 효과를 알아본 결과는 Figure 2와 같다. 500 mg/L casamino acid (CA) 첨가 시 최대의 체세포배 발생 수인 223개(/5 mg조직)로 나타났으며, 1,000 mg/L casein hydrolysate (CH) 첨가구 (115개)에서 최저치를 보였다. 질소원 무첨가구인 대조구에서는 195개의 체세포배를 유도하여 다른 종류의 환원질소원 첨가구보다 높은 유도 수를 보여 백합나무의 체세포배 유도 시 환원질소원의 효과는 그리 크지 않음을 알 수 있었다 (Fig. 2). 또한 환원질소원 종류에 관계없이 500 mg/L 첨가구가 1,000 mg/L 첨가구보다 높은 체세포배 유도 수를 보여 500 mg/L 이상의 고농도에서는 체세포배 유도에 역효과가 있음을 알 수 있었다 (Fig. 2).

Casein hydrlysate (CH)는 18종 이상의 아미노산과 알려지지 않은 혼합물로 이루어진 환원질소원의 한 종류로서 체세포배 유도 시에 종종 첨가되기도 하는데 (Hristoforoglu et al. 1995; Kim et al. 2009), Dai 등 (2004)은 잡종 백합나무 체세포배 유도의 경우 무첨가에 비해 CH첨가 시 현저하게 체세포배 유도 수가 감소하였으며, 발아된 체세포배 수 또한 CH 무첨가구에서만 아주 높게 나타났음을 보고하였다. 또한 Merkle 등 (1990)도 일반 백합나무의 체세포배로부터 발아유도 때 CH를 무첨가 할 경우 72%의 가장 높은 식물체 전환율을 보여 백합나무의 경우 CH첨가는 체세포배 발생 및 발아에는 그다지 효과적이지 않음을 알 수 있다. 반면 sweetgum 수종의 체세포배 유도 시에는 CH 대신에 L-glutamine, asparagine 및 arginine을 첨가할 경우 최대의 체세포배 유도 및 식물체 전환율을 보고 (Dai et al. 2004) 한 바 있어 수종 및 세포라인 간 다양한 결과를 비교하는 실험으로 최적조건을 구명할 필요가 있다. 그러나 sweetgum 수종의 경우에서와 같이 CH 등과

같은 유기질소원 첨가로 NH_4NO_3와 같은 무기질소원보다 대사과정에 이용될 시 훨씬 낮은 에너지만을 필요로 하기 때문에 에너지 효율면에서 유리함을 보고하기도 하였다 (Nørgaard and Krogstrup 1991).

L-glutamine 첨가효과 또한 침엽수종에서 많이 보고되고 있는데 그중 *Picea mariana* (Khlifi and Tremblay 1995)와 낙엽송 (Kim et al. 2007a) 체세포배 유도 시 첨가된 L-glutamine로 증진된 효과를 보고하고 있으나, von Arnold (1987)는 독일가문비의 체세포배 유도 시 L-glutamine, L-arginine 및 L-asparagine 첨가로 강한 억제효과를, Kirby 등 (1987)은 *Picea menziesii*의 세포현탁 배양 시 CH첨가로 세포증식이 억제됨을 보고하고 있어 임목수종의 체세포배 유도를 위한 환원질소원의 첨가효과는 수종에 따라 그 효과는 매우 다양하게 나타남을 알 수 있다

삼투압제 종류 및 농도 별 체세포배 유도 효과

백합나무의 체세포배 유도 시 적정 삼투압제 종류 및 농도를 구명한 결과는 Figure 3과 같다. 배발생조직으로부터 체세포배 유도과정에는 다양한 배양요인들을 필요로 하지만 그중 특히 활엽수종 체세포배 유도의 경우 삼투압제 종류 및 농도가 큰 영향을 미친다. 최대 체세포배 유도 수는 4% sucrose 처리구 (317/5 mg 조직)에서 였으나 (Fig. 3) sucrose 농도가 점차 증가할수록 체세포배 유도 수가 감소하는 경향을 보였으며, 8% sucrose에서는 단지 58개의 체세포배 유도 수를 보여 1% sucrose 처리구 (56개)와 유사한 저조한 유도효과를 보였다. Maltose 첨가의 경우 농도에 관계없이 체세포배는 전혀 유도가 되지 않아 sucrose 처리구와는 완전히 상반된 결과를 보였는데, 이는 백합나무의 체세포배 유도에는 maltose 삼투압제의 사용은 전혀 효과 없음을 보였다 (Fig. 3, 4). Dai 등 (2004)은 잡종백합나무 체세포배 유도의 경우 4% sucrose를 첨가하여 다량의 체세포배 유도를 보고하였으나 Tomaz 등 (2001)은 *Citrus* 속 수종 (sweet orange, Rangpur lime 및 Cleopatra mandarin)의 체세포배 유도에는 galactose, lactose 및 maltose 가 혼합처리된 삼투압제 첨가로 최대의 체세포배 유도가 가능하였다. 또한 Troch 등 (2009)은 *Aesculus hippocastanum* (horse chestnut)의 체세포배 유도의 경우 3 혹은 6%의 glucose, fructose, sucrose 및 maltose 등 모든 처리구에서 체세포배 유도가 가능하였다. 특히 3% fructose 처리구 유래 체세포배가 차후 식물체 전환율이 88.8%로 가장 높게 나타나 체세포배 유도 수 보다는 식물체 전환율에 보다 더 큰 영향을 끼치는 것으로 나타나 삼투압제 농도 및 종류 선택은 체세포배 유도 및 식물체 재분화 과정에도 큰 영향을 끼침을 알 수 있었다.

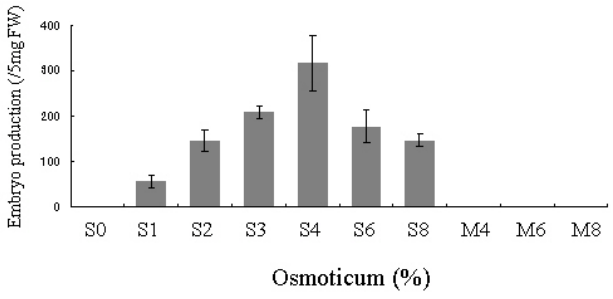

Fig. 3 Comparison of somatic embryo productions with 7 sucrose and 3 maltose concentrations as osmotium in *L. tulipifera*. (±: standard error), S: Sucrose, M: Maltose

반면 침엽수종의 체세포배 유도에는 maltose 첨가가 매우 효과적인 것으로 알려져 있는데 낙엽송 (Kim et al. 2007a) 및 리키테다소나무 (Kim et al. 2007b)에서는 0.2M maltose가 최적이었으며, 소나무의 경우 10% Polyethylene glycol (PEG, MW8,000)에서 가장 많은 수의 체세포배 유도를 보고 (Shoji et al. 2006)하고 있어 활엽수종과는 달리 maltose 혹은 PEG 첨가가 더욱 효과적인 것으로 보고되는 경우가 많다. 이것은 일반적으로 maltose첨가 시 sucrose 보다 대사 분해속도가 서서히 이루어져 오랫동안 배지 내 삼투압 유지가 보다 유리하며, 또한 sucrose 첨가로 야기되는 저산소증 (hypoxia)과 세포내 에탄올 침적이 덜한 것으로 보고하고 있으나 (Scott et al. 1995) 백합나무의 경우에는 상반된 결과를 보여주고 있다.

이상의 결과는 적정 ABA, 환원질소원, 삼투압제 종류 및 농도의 구명으로 고빈도의 체세포배 발생을 달성하고 나아가 클론식물체 대량생산뿐만 아니라 신품종의 개발 연구에도 널리 활용될 수 있을 것이다.

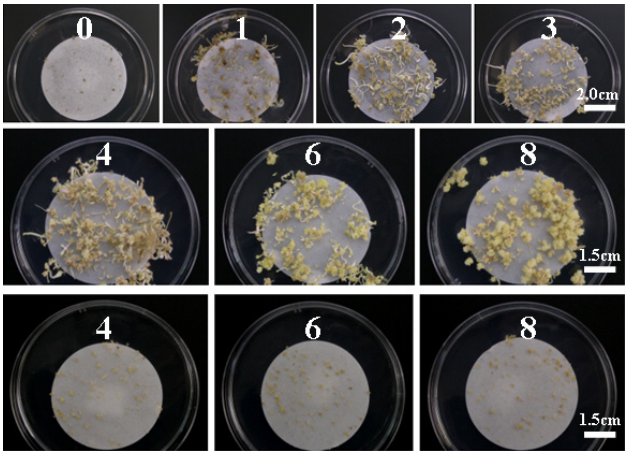

Fig. 4 Comparison of somatic embryo maturation with different concentrations of sucrose and maltose as osmoticum after 8 weeks of culture in *L. tulipifera*

*Upper row: Sucrose 0, 1, 2, 3%
Middle row: Sucrose 4, 6, 8%
Lower row: Maltose 4, 6, 8%

적 요

본 연구는 백합나무 배발생조직으로부터 체세포배 유도에 영향하는 ABA (abscisic acid)의 농도, 환원질소원 및 삼투압제의 종류 및 농도 효과를 조사하기 위해 수행되었다. ABA농도 비교에서는 0.5 mg/L 첨가구에서 가장 높은 체세포배 유도 수 (640/10 mg 조직)를 보였으나 0.5 mg/L 이상의 농도에서는 점차 체세포배 발생 수는 감소하는 경향을 보였으며, 20 mg/L 농도에서 가장 낮은 유도 수 (250/5 mg 조직)를 나타냈다. 8종류 환원질소원 종류 및 농도에 대한 체세포배 유도 효과를 비교한 결과 최대 체세포배 유도는 500 mg/L casamino acid (223/5 mg 조직) 첨가구에서 나타났으나, 그 외 환원질소원 종류 및 농도에 따라 매우 다양하게 나타났다. 삼투압제 종류 및 농도 비교에서는 최고의 체세포배 발생 수 (317/5 mg 조직)는 4% sucrose 첨가 시 나타났으나 maltose 첨가배지에서는 농도에 상관없이 체세포배가 전혀 유도되지 않아 삼투압제 종류에 따라 큰 차이를 보였다.

인용문헌

Attree SM, Pomeroy MK, Fowke LC (1992) Manipulation of conditions for the culture of somatic embryos of white spruce for improved triacylglycerol biosynthesis and desiccation tolerance. Planta 187:395-404

Beardmore T, Charest PJ (1995) Black spruce somatic embryo germination and desiccation tolerance II. Effect of an abscisic acid treatment on protein synthesis. Can J For Res 25: 1773-1782

Dai J, Vendrame WA, Merkle SA (2004) Enhancing the productivity of hybrid yellow-poplar and hybrid sweetgum embryogenic cultures. In Vitro Cell Dev Bio.-Plant 40: 376-383

Hristoforoglu K, Schmidt J, Bolhar-Nordenkampf H (1995) Development and germination of *Abies alba* somatic embryos. Plant Cell Tiss Org Cult 40:277-284

Kirby EG, Leustek T, Lee MS (1987) Nitrogen nutrition. In: Bonga JM, Durzan DJ (eds.) General Principles and Biotechnology, Cell and Tissue Culture in Forestry, vol. 1 (pp. 67-88), Nijhoff, Dordrecht

Khlifi S, Tremblay FM (1995) Maturation of black spruce somatic embryos. I. Effect of L-glutamine on the number and germinability of somatic embryos. Plant Cell Tiss Org Cult 41:23-32

Kim YW, Newton R, Frampton J, Han KH (2009) Embryogenic tissue initiation and somatic embryogenesis in Fraseir fir (*Abies fraseir* [Pursh] Poir.). In Vitro Cell Dev Biol-Plant 45:400-406

Kim YW, Moon HK (2007a) Enhancement of somatic embryogenesis and plant regeneration in Japanese larch (*Larix leptolepis*). Plant Cell Tiss Org Cult 88:241-245

Kim YW, Moon HK (2007b) Regeneration of plant by somatic embryogenesis in *Pinus rigida* × *P. taeda*. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 43:335-342

Kim YW, Moon HK, Son SG (2006) Repetitive somatic embryogenesis and plant regeneration in *Zizyphus jujuba* Mill. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 42:247-251

Lee JS, Moon HK, Kim YW (2003) Mass propagation of *Liriodendron tulipifera* L. via somatic embryogenesis. Kor J Plant Biotech 30:359-363

Lee KS, Lee JC, Soh WY (2002) High frequency palnt regeneration from *Aralia cordata* somatic embryos. Plant Cell Tiss Org Cul 68:241-246

Litvay JD, Verma DC, Johnson MA (1985) Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Darcus carota* L.). Plant Cell Rep 4:325-328

Merkle SA, Sommer HE (1986) Somatic embryogenesis in tissue cultures of *Liriodendron tulipifera*. Can J For Res 16:420-422

Merkle SA, Sotak RJ, Wieeko AT, Dommer HE (1990) Maturation and conversion of *Liriodendron tulipifera* somatic embryos. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 26: 1086-1093

Nørgaard JV, Krogstrup P (1991) Cytokinin induced somatic embryogenesis from immature embryos of *Abies nordmanniana* LK. Plant Cell Rep 9:509-513

Scott P, Lyne RL, Rees TA (1995) Metabolism of maltose and sucrose by microspores isolated from barley (*Hordeum vulgare)*. Planta 197:435-441

Sharma P, Pandey S, Bhattacharya A, Nagar PK and Ahuja PS. 2004. ABA associated biochemical changes during somatic embryo development in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. J. Plant Physiol. 161: 1269-1276

Shoji M, Sato H, Nakagawa R, Funada R, Kubo T, Ogita S (2006) Influence of osmotic pressure on somatic embryo maturation in *Pinus densiflora.* J For Res 11:449-453

Son SG, Moon HK, Kim YW, Kim JA (2005) Effect of mother trees and dark culture condition affecting on somatic embryogenesis of *Liriodendron tulipifera* L. J Kor For Soc 94:39-44

Tomaz ML, Januzzi Mendes BM, Mourao Filho FD, Demetrio CGB, Jansakul N, Martinelli Rodriguez AP (2001). Somatic embryogenesis in *Citrus* Spp.: Carbohydrate stimulation and histodifferentiation. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 37:446-452

Troch V, Werbrouck S, Geelen D, Labeke MV (2009) Optimization of horse chesnut (*Aesculus hippocastanum* L.) somatic embryo conversion. Plant Cell Tiss Organ Cult 98:115-123

von Arnold S (1987) Improved efficiency of somatic embryogenesis in mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. J Plant Physiol 128:233-244