백합나무 5년생 실생묘 및 체세포묘 (체세포배 유래 식물체) 간의 생리적 요인, 기공 및 DNA 함량 비교

김용욱* · 문흥규

국립산림과학원 산림생명공학과

Comparison of Physiological Characteristics, Stomata and DNA Content between Seedling and 5-year-old Somatic Plant (Somatic Embryo Derived-plant) in *Liriodendron tulipifera*

Yong Wook Kim* and Heung Kyu Moon

Division of Forest Biotechnology, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350, Korea

요 약: 본 연구는 백합나무 5년생의 실생묘와 체세포묘 간 생리적 요인, 기공 특성 및 DNA 함량 비교를 위해 수행되었다. 광합성율 비교의 경우 실생묘는 $10.67 \mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 체세포묘는 $9.04 \mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 기공전도율의 경우 실생묘가 $0.2 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 체세포묘가 $0.166 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 또한 증발산을 비교에서는 실생묘가 $1.71 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 체세포묘는 $1.513 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 각각 나타나 별 차이가 없었다. 기공밀도(실생묘, 23.33개/mm^2 ; 체세포묘, 22.43개/mm^2), 기공길이(실생묘, $25.83 \mu\text{m}$; 체세포묘, $23.46 \mu\text{m}$) 및 기공 폭(실생묘, $15.87 \mu\text{m}$; 체세포묘, $15.3 \mu\text{m}$) 비교에서는 모든 실생묘가 체세포묘 보다 수치가 다소 높게 나타났다. Flow cytometry를 이용한 엽조직의 DNA 함량 비교에서도 실생묘와 체세포묘간에는 차이가 없었다.

Abstract: Field performance of somatic plants (somatic embryo derived-plants) of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera*) produced from somatic embryogenesis was compared with that of seedlings at age 5. In comparison of photosynthetic rate (seedling, $10.67 \mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$; somatic plant, $9.04 \mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), stomatal conductance rate (seedling, $0.2 \text{ H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$; somatic plant, $0.166 \text{ H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) and respiration rate (seedling, $1.71 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$; somatic plant, $1.513 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), no significant differences were found between plants. The seedlings were a little higher in comparison of stomatal density (seedling, $23.33/\text{mm}^2$; somatic plant, $22.43/\text{mm}^2$), length (seedling, $25.83 \mu\text{m}$; somatic plant, $23.46 \mu\text{m}$) and width (seedling, $15.87 \mu\text{m}$; somatic plant, $15.3 \mu\text{m}$). In comparison of DNA content of the leaves using flow cytometry, no differences in ploidy level were found between the seedlings and somatic plants.

Key words : flow cytometry, photosynthetic rate, seedling, somatic plant, stomata, yellow poplar

서 론

백합나무는 가구재, 합판 패널 등의 다양한 용도로 사용되며, 또한 산림바이오 순환림 뿐만 아니라 환경정화수로도 유용하여 우리나라의 주요 조림수종중 하나이다. 특히 백합나무는 속성수로 연간 재적생장이 높은 수종으로 미래의 목재수급에 중요한 위치를 점할 수 있는 수종으로 평가되고 있다(Ryu et al., 2008a; 2008b). 묘목생산은 거의 실생묘로 이루어지며 최근 생물공학기술의 발전에 힘입어 체세포배 발생 기법을 이용한 체세포묘 생산으로 일

부 조림물량 보급에 기여하고 있다.

백합나무의 체세포배 연구는 1986년 Merkle과 Sommer가 체세포배로부터 식물체 재분화를 보고한 이후로 수편의 관련 논문이 발표되었으며(Merkle et al., 1990; Dai et al., 2004), 국내에서도 수편의 논문이 발표되었는바(Lee et al., 2003; Son et al., 2005; Kim et al., 2011), 그중 Kim et al.(2011)은 백합나무의 체세포배 배양 기술을 개발하여 체세포묘 생산의 실용화를 이루어 일정부분 묘목수급에 기여할 수 있게 되었다. 체세포배 유도 기술을 통해 증식된 식물체는 유전자형이 동일한 클론개체이므로 생산된 체세포묘는 최대 32.8%이상의 유전개량효과를 보여 미래의 임업경영방식은 클론임업으로 나아가야한다는 당위성

*Corresponding author
E-mail: dragonkim@forest.go.kr

을 보고하고 있다(O'Neill et al., 2005). 그러나 체세포배 발생으로 육성된 체세포묘가 임목육종 프로그램에 포함되어 클론증식의 한 방법으로 자리잡기 위해서는 먼저 체세포묘와 실생묘 간의 생장 및 생리적 비교연구가 반드시 선행되어야 한다. 그러나 지금까지 활엽수종의 체세포묘와 실생묘간의 생장 등에 관한 비교연구는 소수이며 (Menéndez-Yuffá et al., 2010), 대부분의 연구는 침엽수종에 한정되는데 그중 interior spruce(*Picea glauca*)의 embling과 실생묘의 줄기 및 뿌리생장(Grossnickle et al., 1994), *P. glauca*, *P. engelmannii* 및 종간잡종의 체세포묘와 실생묘 간의 생장비교에 관한 연구(O'Neill et al., 2005) 및 red spruce(*Picea rubens*)의 실생묘와 체세포묘간의 묘목의 지상부 및 지하부 생장 비교(Nsangou and Greenwood, 1998) 등이 있다. 백합나무의 경우 체세포묘와 실생묘 간의 생장비교에 관한 연구는 Kim and Moo(2012)의 체세포묘와 실생묘 간의 수고, 흉고직경, 엽생장, 엽록소 양 및 엽조직의 미세절단을 통한 세포 배열 등의 비교에 관한 연구가 유일한 보고인데 두 식물체 간에는 거의 차이가 없는 것으로 보고하고 있어 차후 체세포배 발생을 통한 클론묘 생산의 가능성을 높여주고 있다.

따라서 본 연구에서는 5년생 백합나무 체세포배 유래 체세포묘와 실생묘 간 광합성율, 기공전도율, 증산율, 기공의 밀도 및 크기 및 flow cytometry를 이용한 DNA 함량 등의 비교를 통해 체세포묘의 생장안정성을 확보하고, 차후 체세포묘의 대량생산을 통한 육종프로그램으로의 적용 가능성의 기초자료를 얻고자 본 실험이 수행되었다.

재료 및 방법

1. 식물재료

배발생조직 유도는 경기 수원에 위치한 국립산림과학원 산림유전자원부 내에 자생중인 약 40년생 성숙목의 구과를 7월말 경 채취하여 종자를 분리한 다음 배양하였다. 종자표면 살균은 70% 에탄올로 1분간 처리 후 2% NaClO로 10분 정도 침적한 다음 멸균증류수로 수차례 세척 후 배양하였다.

2. 배발생조직 유도 및 증식

배발생조직 유도는 MS(Murashige and Skoog, 1962) 배지에 2.0 mg/L 2,4-D, 0.25 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate 및 3.0% sucrose를 첨가하였고 0.2% gellan gum(Sigma)을 첨가시켜 반고형 배지로 만들어 사용했다. 종자배양은 먼저 종자를 양분하여 절단면을 배지에 직접 접하는 식으로 배양하였고, 배양환경은 25±2°C, 암소에서 8주 동안 배지교환 없이 이루어졌다. 배발생조직 유도 후 증식은 유도배지와 동일한 배지에서 실시하였고 3~4주 간격으로 새로운 배지로 계대배양 하였다.

3. 체세포배 유도

배발생조직으로부터 체세포배 유도는 먼저 증식중인 조직을 액체배지 mL당 15 mg 농도로 맞추어 페트리디시 당 2 ml 배양을 기준으로 조정하였다. 배발생조직을 액체배지(1/2MS+4.0% sucrose)에 현탁 한 후 1회용 피펫으로 2 mL(15 mg/mL)의 세포현탁액을 체세포배 유도배지위로 곧바로 깔아준 뒤 세포가 배지전면에 고루 흩어지도록 잘 흔든 다음 5분정도 정체시켰다. 그 후 페트리디시를 기울여 흘러내리는 액체배지를 무균피펫(FALCON, Becton Dickinson Labware, USA)을 이용하여 모두 제거하였다. 배양은 24±2°C, 암소에서 8주간 새로운 배지교환 없이 진행되었다.

4. 체세포배 발아 및 식물체 순화

체세포배 발아는 유도한 체세포배를 발아배지(1/2MS 배지+2% sucrose+0.4% gelrite)로 옮겨 24±2°C, 광배양(50 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$)으로 이루어졌다. 배양 4~6주 후 잎, 줄기 및 뿌리가 완전히 분화된 소식물체만을 골라서 순화를 시켰는데 순화 토양(생생상토, 흥농)을 56.2 cm × 39 cm 크기의 바구니에 2/3정도 채워 넣고 한 바구니 당 약 80여개 정도의 소식물체를 이식하였다. 그런 다음 이 바구니를 보다 좀 더 큰 바닥이 밀폐된 플라스틱 용기(72 cm × 44.3 cm)로 옮긴 후 그 위로 투명비닐(0.5 mm)을 덮고 다시 투명 아크릴판(2.5 mm)으로 덮어 순화상 내의 상대습도를 90% 이상 유지하였다. 관수는 순화 1주일 후 한번만 충분히 실시하였고, 2차 관수는 2주 후에 실시하였다. 순화 2주 후부터는 비닐과 아크릴판을 1/4정도 열어주어 외부공기와 접촉토록하고 순화 3주 후부터는 완전히 벗겨 외부 환경에 적응시켰다. 그 후 순화묘를 포지에 이식시켜 1년간 생육 후 국립산림과학원 산림유전자원부 내 클론보존원을 조성하여 1-0묘의 실생묘와 체세포묘를 각각 이식시켜 생장모니터링 하였다.

5. 생리적 요인, 기공 및 DNA 함량 비교

1) 광합성율, 기공전도율 및 증산율 비교

국립산림과학원 산림유전자원부내 클론보존원에 식재되어 있는 5년생 실생묘 및 체세포묘 10본을 무작위로 선정하여 각각의 광합성율($\mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), 기공전도율($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) 및 증발산율($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) 등을 측정하였다. 측정은 portable photosynthesis system(Li-cor6400, Li-cor, USA)을 이용하였고, 측정 시에는 챔브 내의 CO_2 농도는 400±10 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ 로 조정하였다.

6. 기공 밀도, 길이 및 폭 비교

5년생 실생묘 및 체세포묘 10본을 무작위로 선정하여 각 시험목의 상단 2번째 가지의 엽을 채취하여 엽 뒤면의

표피를 핀셋으로 상처가 나지 않게 벗긴 후 광학현미경 (Leica, D.M.R., Germany)으로 관찰하였으며 기공의 밀도, 길이 및 폭을 측정하였다.

3) DNA 함량 비교

5년생 실생묘 및 체세포묘 10본을 무작위로 선정하여 각 식물체 엽조직의 DNA함량은 Cystain UV Precise P' kit(Partec GmbH, Munster, Germany)를 이용하여 분석용 세포를 조제하였으며, 준비된 세포시료는 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)로 형광 염색하였고, DNA함량은 Partec Ploidy Analyser(Partec GmbH, Munster, Germany)로 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 광합성율, 기공전도율 및 증산율 비교

Figure 1은 5년생 실생묘와 및 체세포묘의 광합성율, 기공전도율 및 증발산율을 비교한 결과로서 먼저 광합성율 비교의 경우 실생묘 평균은 $10.67 \mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 체세포묘는 $9.04 \mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 나타나 실생묘가 다소 높았다(Figure 1a). 기공전도도 비교에서는 실생묘가 $0.2 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 인 반면 체세포묘는 $0.166 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 나타나 실생묘가 다소 높게 나타났다(Figure 1b). 증산율 비

교 역시 $1.71 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 를 보인 실생묘가 $1.513 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 를 보인 체세포묘 보다 다소 높아(Figure 1c) 실생묘가 광합성율 등의 생리활성에서는 체세포묘 보다 다소 앞서는 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 interior spruce의 실생묘가 체세포묘 보다 광합성율이 높았다는 보고(Grossnickle and Major, 1998)와 일치하지만 white spruce의 경우 체세포묘 개체들이 실생묘보다 총 광합성율이 높았다는 보고(Lamhamedi et al., 2000)와는 차이를 보였다. 본 실험에서의 측정수치는 측정 시간 및 주변 환경조건 등 다양한 변수가 작용하기 때문에 몇 번의 측정으로 단정하기는 힘들고, 또한 이 결과(Figure 1)는 식물체가 생장함에 따라 얼마든지 변할 수 있으므로 장기간에 걸친 생리적인 모니터링이 요구된다. Nsangou and Greenwood(1998)에 따르면 8개월의 red spruce 총 광합성량 비교에서 실생묘는 $0.7 \mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 체세포묘 또한 $0.7 \mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 나타나 차이가 없었으나 기공전도도에서는 체세포묘가 약간 높았다고 보고하고 있다. 따라서 묘고 등의 생장이 높은 실생묘가 항상 체세포묘 보다 엽조직의 가스교환 효율이 높다고는 할 수 없음을 보여주고 있고(Nsangou and Greenwood, 1998), 또한 eastern larch의 성숙목이 생장속도가 빠른 유시성(juvenility)이 있는 접수로 생장된 접목개체 보다 총 광합성율이 높았다는 연구결과(Greenwood et al., 1989)가 있어 식물의 유시성 차이에 따른 생장속도와 광합성율과는 밀접한 연관성이 없는 것으로 보고되고 있다.

2. 기공 밀도, 길이 및 폭 비교

기공은 광합성과 호흡 시 가스(CO_2 및 O_2) 교환을 담당하는 주요 엽조직의 기관이며 앞서 서술한 광합성율, 기공전도도 등과 밀접한 관련이 있어 기공의 형태 및 크기를 추정하면 그 식물의 정상적인 광합성 효율 등을 가늠해볼 수 있다. 따라서 Figure 2와 3은 실생묘와 체세포묘 간의 기공 밀도, 길이 및 폭을 비교한 것으로서 먼저 기공 밀도 비교에서는 실생묘가 23.33개/mm^2 , 체세포묘가 22.43개/mm^2 으로 거의 동일하게 나타났다(Figure 2a). 기공 길이비교에서는 실생묘가 $25.83 \mu\text{m}$, 체세포묘가 $23.46 \mu\text{m}$ 로 약간 크게 나타났으나(Figure 2b), 기공 폭 비교에서는 실생묘가 $15.87 \mu\text{m}$, emblying이 $15.3 \mu\text{m}$ 으로 거의 유사하게 나타나(Figure 2c) 체세포묘의 엽조직 기공은 일반 실생묘와 거의 동일한 밀도 및 형태를 유지하는 것으로 조사되었다(Figure 2). 야외에 식재된 체세포묘간의 기공크기와 밀도에 관한 자세한 연구가 없어 직접적인 비교는 어려우나 red spruce의 실생묘와 체세포묘간의 기공특성 비교에서 비슷한 수치를 보여 체세포묘 또한 실생묘와 마찬가지로 정상적인 증산기능을 하는 것으로 보고하고 있고(Grossnickle et al., 1998), 3년생 낙엽송의 실생묘와 체

Figure 1. Comparison of photosynthetic rate (a), stomatal conductance (b) and respiration rate (c) between seedling and somatic plant in 5-year-old *L. tulipifera*.

Figure 2. Comparison of stomatal density (a), length (b) and width (c) between seedling and somatic plant in 5-year-old *L. tulipifera*.

세포묘 침엽의 기공비교의 경우 기공밀도 및 폭은 체세포묘에서 크게 나타난 반면 기공길이는 실생묘에서 크게 나타나 식물체 간 다소 차이를 보였다(Kim et al., 2002). 또한 기공 밀도 등은 식물체의 생육환경의 광도 및 광질에 따라 큰 차이를 보이기도 하며(Lee et al., 2007), 체세포묘의 배양 단계에 따른 기공 밀도 등의 차이(Joshi et al., 2006)를 보고하고 있는데 특히 기내배양 유래 식물체의 기공 중 29.4%는 변형된 것으로 알려져(Joshi et al., 2006) 차후 생장필드에서의 배양묘의 정상적인 생장의 중요성을 보여준다.

3. DNA 함량 비교

조직배양 유래 식물체는 식물생장조절물질 및 배양환경으로 인해 후성적 DNA변이 개체출현 가능성이 높은 것이 사실이나 체세포배 유래 식물체인 체세포묘는 아배양 및 캘러스배양 유래 식물체와는 달리 매우 안정적인 것으로 보고되고 있다(Isabel et al., 1993). 따라서 Figure 4는 실생묘와 체세포묘 개체 간의 Flow cytometry로 분석한 DNA 함량 프로파일 비교에 관한 것으로서, 현재까지 두 식물체군 간의 DNA 함량변이는 발견되지 않고 있다(Figure 4). *Quercus robur*의 somatic plant의 경우 RAPD(Valladares et al., 2005)

Figure 3. Comparison of stomatal morphology between seedling (a, arrows) and somatic plant (b, arrows) in 5-year-old *L. tulipifera*. (Bar =25 μm)

Figure 4. Comparison of DNA-histogram seedling (a, c) and somatic plant (b, d) in 5-year-old *L. tulipifera*.

혹은 DNA flow cytometry(Endemann et al., 2001)분석으로 변이체가 발견되지 않아 DNA는 안정적임을 보고하고 있다. 그러나 Isabel et al.(1993)은 2,270본의 white spruce somatic plant개체를 분석하던 중 4본에서 엽록소가 결핍된 변이체를 발견하였으며, 또한 RAPD 혹은 전자현미경으로 엽록체 혹은 핵게놈의 유전적 불안정성을 밝혔고, Tremblay et al.(1999)은 5년생 black spruce 및 white spruce의 체세포묘 개체를 분석하여 총 9종류의 비정상개체를 분류하였는데 그중 생장왜소형, 사향성(斜向性, plagiotropism) 등 비유전적 요인과 침엽색소 결핍개체와 같은 엽록체의 이수성으로 야기되는 변이개체를 보고하고 있다. 특히 Borchert et al.(2007)은 *Cyclamen persicum*의 체세포배 유도 중 각 단계 별 체세포배를 Flow cytometry 분석 한 결과 각 단계 별에 따른 체세포배에서 DNA함량 변이체를 발견하였고, 이러한 변이체는 배발생조직의 장기간에 걸친 배양 및 세포배양으로 야기되는 것이 대부분인데 배양과정 중 DNA함량 변이체 발생을 방지하기 위해서는 짧은 기간 내 배양된 식물체 유래의 조직 사용 및 액체질소로의 초저온저장을 통한 조직배양체의 안정적인 유지가 필수적임을 보고하고 있다. 본 연구의 재료인 백합나무 체세포묘 개체의 경우 DNA 함량변이는 아직 발견되지 않아 보다 유전적으로 보다 안정적이지만 차후 ISSR마커를 이용한 보다 정교한 변이분석이 수행되어야 할 것으로 사료된다. 다행히도 본 연구의 재료인 백합나무 체세포묘의 경우 DNA 함량변이는 아직 발견되지 않아 보다 유전적으로 보다 안정적이지만 차후 보다 정교한 변이분석을 위해 ISSR마커를 이용한 DNA변이분석이 수행되어야 할 것으로 사료된다.

인용문헌

- Borchert, T., Fuchs, J., Winkelmann, T., and Hohe A. 2007. Variable DNA content of *Cyclamen persicum* regenerated via somatic embryogenesis: rethinking the concept of long-term callus and suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90: 255-263.
- Dai, J., Vendrame, W.A., and Merkle, S.A. 2004. Enhancing the productivity of hybrid yellow-poplar and hybrid sweetgum embryogenic cultures. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 40: 376-383.
- Endemann, M., Hristofroglu, K., Stauber, T., and Wilhelm, E. 2001. Assessment of age-related polyploid in *Quercus robur* L. somatic embryos and regenerated plants using DNA flow cytometry. *Biologia Plantarum* 44: 339-345.
- Greenwood, M.S., Hopper, C.A., and Hutchison, K.W. 1989. Maturation in larch. I. Effect of age on shoot growth, foliar characteristic in larch, and DNA methylation. *Plant Physiology* 90: 406-412.
- Grossnickle, S.C. and Major, J.E. 1994. Interior spruce seedlings compared with emblings produced from somatic embryogenesis. II. Stock quality assessment prior to field planting. *Canadian Journal Forest Research* 24: 1385-1396.
- Grossnickle, S.C. and Fan, S. 1998. Genetic variation in summer gas exchange patterns of interior spruce (*Picea glauca* (Moench Voss $\times$ *Picea engelmannii* Parry ex Engelm). *Canadian Journal Forest Research* 28: 831-840.
- Isabel, N., Tremblay, L., Michaud, M., Tremblay, F.M., and Bousquet, J. 1993. RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-derived populations of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. *Theoretical Applied Genetics* 86: 81-87.
- Joshi, P., Joshi, N., and Purohit, S.D. 2006. Stomatal characteristics during micropropagation of *Wrightia tomentosa*. *Biologia Plantarum* 50: 275-278.
- Kim, Y.W., Han, M.S., Moon, H.K. and Park, S.Y. 2011. Effects of ABA, reduced nitrogen source and osmoticum for somatic embryogenesis in *Liriodendron tulipifera*. *Korean Journal of Plant Biotechnology* 38: 186-190.
- Kim, Y.W., Kim, J.C., Youn, Y., Moon, H.K., and Lee, J.S. 2002. Morphological and physiological characteristics of emblings derived from somatic embryos, seedlings, and mature trees in *Larix leptolepis*. *Journal of Korean Forest Society* 99: 623-637.
- Kim, Y.W. and Moon, H.K. 2012. Comparison of growth characteristics between 5-year-old emblings derived from somatic embryos and seedlings in *Liriodendron tulipifera*. *Journal of Korean Forest Society* 101: 613-618.
- Lamhamedi, M.S., Chamberland, H., Bernier, P.Y., and Tremblay, F.M. 2000. Clonal variation in morphology, growth, physiology, anatomy and ultrastructure of container-grown white spruce somatic plants. *Tree Physiology* 20: 869-880.
- Lee, J.S., Moon, H.K., and Kim Y.W. 2003. Mass propagation of *Liriodendron tulipifera* L. via somatic embryogenesis. *Korean Journal of Plant Biotechnology* 30: 359-363.
- Lee, S.H., Tewari, R.K., Hahn, E.J., and Paek K.Y. 2007. Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania Somnifera* (L.) Dunal. plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90: 141-151.
- Menéndez-Yuffá, A., Barry-Etienne, D., Bertrand, B., Georget, F., and Etienne, H. 2010. A comparative analysis of the development and quality of nursery plants derived from somatic embryogenesis and from seedlings for large-scale propagation of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 102: 297-307.
- Merkle, S.A. and Sommer, H.E. 1986. Somatic embryogenesis in tissue cultures of *Liriodendron tulipifera*. *Canadian Journal Forest Research* 16: 420-422.
- Merkle, S.A., Sotak, R.J., Wiecko, A.T., and Dommer H.E. 1990. Maturation and conversion of *Liriodendron tulipifera* somatic embryos. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*

- 26: 1086-1093.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nsangou, M. and Greenwood, M. 1998. Physiological and morphological differences between somatic, in vitro germinated, and normal seedlings of red spruce (*Picea rubens* Sarg.). *Canadian Journal Forest Reserach* 28: 1088-1092.
- O'Neill, G.A., Russell, J.H., Hooge, B.D., Ott, P.K., and Hawkins C.B.D. 2005. Estimating gains from genetic tests of somatic emblings of interior spruce. *Forest Genetics* 12: 57-66.
- Ryu, K.O., Kim, W.J., Kim, I.S., Choi, H.S., Lee, D.H., and Kim Y.W. 2008a. Yellow Poplar (*Liriodendron tulipifera*)-Growth characteristics and Usage techniques. Korea Research Forest Institute Research Bulletin 320: 19-33.
- Ryu, K.O., Kim, W.J., Kim, I.S., Choi, H.S., Lee, D.H., and Kim, Y.W. 2008a. Yellow Poplar (*Liriodendron tulipifera*)-Growth characteristics and Usage techniques. Korea Research Forest Institute Research Bulletin 320: 110-136.
- Son, S.G., Moon, H.K., Kim, Y.W. and Kim, J.A. 2005. Effect of mother trees and dark culture condition affecting on somatic embryogenesis of *Liriodendron tulipifera* L. *Journal of Korean Forest Society* 94: 39-44.
- Tremblay, L., Levasseur, C. and Tremblay, F.M. 1999. Frequency of somaclonal variation in plants of black spruce (*Picea mariana*, Pinaceae) and white spruce (*P. glauca*, Pinaceae) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability. *American Journal Botany* 86: 1373-1381.
- Valladares, S., Sánchez, C., Martínez, M.T., Ballester, A. and Vieitez, A.M. 2005. Plant regeneration through somatic embryogenesis from tissues of mature oak trees; true-to-type conformity of plantlets by RAPD analysis. *Plant Cell Reports* 25: 879-886.

(2013년 7월 2일 접수; 2013년 9월 27일 채택)