韓資植誌 21(1) : 60~65(2008)
Korean J. Plant Res.

현탁배양을 통한 음나무(*Kalopanax pictus*) 배발생 캘러스의 증식

김혜진*, 김원배, 유동림, 김수정, 이준구
농촌진흥청 고령지농업연구소 원예과

Proliferation of Embryogenic Callus of *Kalopanax pictus* through Suspension Culture System

Hye Jin Kim*, Won Bea Kim, Dong Lim Yoo, Su Jeong Kim and Jun Gu Lee
National Institute of Highland Agriculture, RDA, Pyeongchang 232-955, Korea

Abstract - *Kalopanax pictus* was cultured *in vitro* to find out optimal condition for embryogenic cells proliferation in liquid media rapidly. Embryogenic cells were induced from leaves and petiols of *Kalopanax pictus*. Optimum culture medium appeared to be a 1/2MS medium supplemented with 2.0㎎/L 2,4-D and 0.1㎎/L BA. To find out optimal conditions, embryogenic cells were cultured some condition as different concentrations of 2,4-D, medium and sucrose. There was cultured on 1/2MS liquid medium containing different concentration of 2,4-D. When embryogenic cells were cultured on 1/2MS liquid medium supplemented with 1.0㎎/L 2,4-D, cell propagation rate was higher than other concentration of 2,4-D. When embryogenic cells were cultured on different media that MS, Gamborg B5, N6, White, SH medium, observed the highest multiplication rate among Gamborg B5 and White medium. To find out of effect of sucrose to embryogenic cells propagation, we tested cells under different concentrations. Optimal concentration of sucrose appeared to be a basal medium added 3% sucrose. Above results suggest that optimal conditions for proliferation of embryogenic cells were established Gamborg B5 and White medium added 1.0㎎/L 2,4-D and 3% sucrose. There is every possibility achieving embryogenic cells proliferation via bioreactor culture system in *Kalopanax pictus*.

Key words - Liquid culture, Medium strength, Callus growth

서 언

음나무(*Kalopanax pictus*)는 주로 북아시아에 분포되어 있으며, 두릅나무과에 속하는 낙엽교목으로 목재는 물론 한약재 및 산채로도 이용되는 유망한 수종이다(Chae *et al.*, 1988). 음나무의 수피는 '해동피'라 하여 한방에서 약용으로 쓰이고 있으며, phenolic glycosides, syringin, triterpene과 같은 화학성분을 다량 함유하고 있고(Sano *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1998), 음나무의 주요 약리학적 효과는 항류머티즘(Choi *et al.*, 2002a,b), 항당뇨병(Park *et al.*, 1998), 항염증성(Kim *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2001)이다. 이러한 음나무의 수피는 자연산에 의존하는 탓에 해마다 무단채취꾼들에 의해 가을철 또는 이른 봄철에 성목의 껍질이 벗겨져 고사하거나, 아예 송두리째 잘려나가는 등, 산지의 목본식물자원 보호차원에서 큰 문제로 대두되고 있어, 수피 대신 새순이나 연한잎을 이용하는 대체방안이 절실히 요구되고 있다. 그러나 음나무의 증식은 주로 종자와 줄기 삽목에 의해 이뤄져 왔으나 보통 파종 후 2년째에 발아하고, 발아율이 낮은 습성을 지녀 효율성이 매우 낮기 때문에 (Yeoung *et al.*, 2001) 음나무의 급속 대량증식에 관한 효율적인 방법이 강구되어야 한다.

전통적인 종자번식이나 영양번식이 어려운 교목성 식물들은 대량 증식하는 방법으로 조직배양 기술을 이용하였다. 특히 체세포 배는 배발생학적 연구에서 모델 시스템으로서 이용되어져 왔으나, 광범위한 영양번식에 응용할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 또한 체세포 배발생은 생물반응기를 이용한 대량 증식이 가능하고, 대부분의 경우 초저온 저장이 가능하여 유전자 은행을 만들 수 있으며, 배발생 세포의 배양은 유전적 변형이 가능하다는 장점을 가지고 있다. 현재 이러한 여러 가지 가능성을 지닌 체세포 배를 이용하여 *Panax ginseng*(Choi *et al.*, 1999c), *Eleutherococcus senticoccus*(Gui *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 1999a,b), *Eleutherococcus sessiliflorus*(Choi *et al.*, 2002)

*교신저자(E-mail) : heijin79@empal.com

뿐만 아니라 *Kalopanax pictus*(Thunb.) Nakai(Moon *et al.*, 2005)에서 증식에 성공한 예가 있다.

음나무의 기내 대량 생산을 위한 기초 연구인 현탁배양시 음나무 배발생 캘러스의 증식에 영향을 미치는 요소에 대하여 연구하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 표면살균

식물재료는 온실에서 자란 음나무의 어린 잎, 엽병, 뿌리를 사용하였다. 표면살균은 tween20액을 몇 방울 첨가하여 거품을 내어 수돗물로 약 3시간가량 수세한 후, 무균상에서 70% (v/v) 에탄올로 1분, 멸균수로 1회 수세, 1% NaClO 액(v/v)으로 10분간 표면 살균 후 멸균수로 3회 수세하였다. 다음 여과지에서 수분을 제거한 후 살균 시 약해를 받은 부분을 잘라내고 캘러스 유도 배지에 치상하였다.

배발생 캘러스 유도

음나무 배발생 캘러스 유도에 미치는 옥신 및 시토키닌의 효과를 알아보고자 MS(Murashige and Skoog, 1962)배지에 2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)는 4농도(0.5, 1.0, 2.0 및 4.0㎎/l) 수준으로 처리하였으며 0.1㎎/l BA(6-benzylaminopurine)를 각 처리구에 첨가하여 사용하였다. 배지는 pH5.6-5.8로 조절하여 121℃에서 20분간 고압멸균한 후 90×15㎜ 페트리디쉬에 분주하여 사용하였다.

배발생 캘러스 증식

음나무 배발생 캘러스 대량 증식 조건을 구명하기 위하여 배지의 물리성, 2,4-D 농도별, 탄소원(sucrose) 농도별, 배지 종류 및 농도에 따른 실험을 실시하였다. 배발생 캘러스 증식 실험을 위하여, Moon 등(2005)의 방법에 따라 배발생 캘러스를 MS 기본배지에 5% sucrose와 1㎎/l 2,4-D를 첨가하여 0.3% gelrite로 고체화한 배지에서 치상하여 유지하였으며, 2주 간격으로 계대배양하였다. 배지는 121℃에서 20분간 고압멸균하여 90×15㎜의 페트리디쉬에 분주하여 사용하였다.

배지 물리성에 따른 음나무 배발생 캘러스 증식 정도를 알아보기 위하여 gelrite 첨가 여부에 따라 고체배지와 액체배지의 두 가지로 실험하였으며, MS 기본배지에 1㎎/l 2,4-D를 첨가하여 사용하였다. 2,4-D 농도별 증식실험은 MS 기본 액체배지에 2,4-D를 0.5, 1.0, 2.0, 4.0㎎/l의 농도별로 처리하였다. 탄소원 농도별 증식실험은 MS 기본배지 및 1/2MS 배지에 1㎎/l 2,4-D와 sucrose를 0, 1, 2, 3, 5%로 농도별 처리하였다. 배지 종류 및 농도별 캘러스 증식 실험은 MS, B5, N6, White, SH medium 등 5가지 배지를 이용하였으며, 이 배지 중 선발된 B5와 White 배지를 농도별로 1/4, 1/3, 1/2, 1, 2, 3배의 6가지 농도로 처리하였으며, 모든 배지에는 2,4-D를 1㎎/l 첨가하여 증식 실험을 실시하였다. 위의 모든 실험은 배지 물리성 실험의 결과를 바탕으로 액체배지를 이용하였으며, 100ml용 삼각플라스크에 배지를 50ml씩 분주하여 고압멸균하여 사용하였고, 배발생 캘러스를 각 처리별로 1g씩 접종하여 4주간 현탁배양하여 증식정도를 확인하였다.

결과 및 고찰

배발생 캘러스 유도

모든 배양된 조직의 절편에서 캘러스가 유도되었으며, 절편의 잘려진 부분에서 먼저 형성되었고 색깔은 흰색, 연노란색, 노란색등 다양하게 나타났다(Fig. 1). 2,4-D의 농도에 따른 캘러스 형성은 농도별로 확연한 차이는 보이지 않았으나 저농도보다 고농도에서 잘 유도되는 것을 확인할 수 있었으며(Table 1), 대부분의 식물체와 마찬가지로 고농도의 옥신류와 저농도의 사이토키닌류를 조합하여 캘러스를 유도하였을 때 세포분열이 왕성히 일어나 캘러스 유도가 잘 일어나는 것처럼 음나무 절편에서도 비슷한 양상을 보였다. 유도된 캘러스는 1㎎/l의 2,4-D와 1g/l의 L-glutamine이 첨가된 1/2MS 기본배지로 계대배양 후(Moon *et al.*, 2005) 캘러스의 생장이 빠르게 이루어져 배양 4주 후에는 거의 모든 캘러스가 직경 0.5~1.0㎝까지 자랐다. 배발생 유도에서 얻어진 캘러스 중 주로 노란색 계통이며, 잘 부서지는 캘러스에서 배발생 캘러스가 유도되었으며, 흰색의 캘러스에서는 배발생 캘러스가 유도되지 않았다.

Table 1. Effect of 2,4-D and explant types on embryogenic callus induction of *Kalopanax pictus*

Plant growth regulator(㎎/l)		Explant type	
2,4-D	BA	Leaf	Petiol
0.5	0.1	++	+ *
1.0		+++	++ *
2.0		+++	+++ *
4.0		++	++

* -: zero, +: low level, ++: middle level, +++: high level.

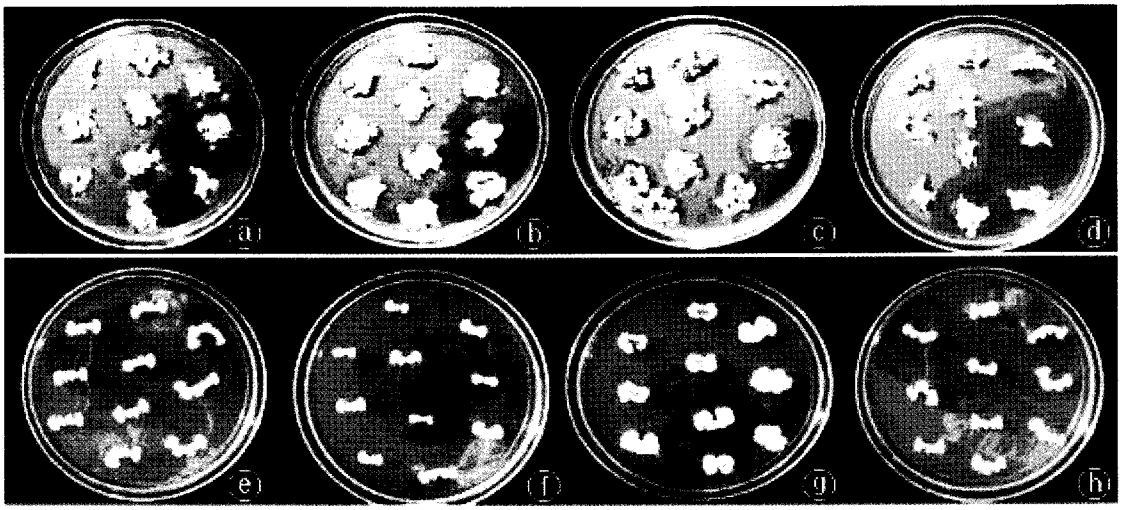

Fig. 1. Embryogenic callus induction from leaves and petiols explant of *Kalopanax pictus*.
*Induction of embryogenic callus from leaves (a~d), Induction of embryogenic callus from petiols (e~h), MS medium added 0.5㎎/l 2,4-D and 0.1㎎/l BA for embryogenic callus induction (a, e), MS medium added 1.0㎎/l 2,4-D and 0.1㎎/l BA for embryogenic callus induction (b, f), MS medium added 2.0㎎/l 2,4-D and 0.1㎎/l BA for embryogenic callus induction (c, g), MS medium added 4.0㎎/l 2,4-D and 0.1㎎/l BA for embryogenic callus induction (d, h).

배발생 캘러스 유도시 L-glutamine의 역할은 nitrogen을 환원시켜 stress 요인을 유발하여 체세포 배발생을 촉진시키는 것으로 보고된 바 있다(Tachikawa *et al.*, 1998). 그러나 본 실험에서 음나무 배발생 캘러스 유도시 L-glutamine의 정확한 역할을 확인하기 위해서는 L-glutamine의 유무 및 농도에 따른 세분화된 실험을 통해 확인해야 할 것으로 생각된다. 또한 절편체의 종류와는 상관없이 절단면에서 더 많은 캘러스가 유도되는 경향을 보이는데 이는 wounding에 의한 stress 효과가 나타난 것으로 추정된다(Hernandez *et al.*, 2003).

배발생 캘러스로부터 식물체 분화

유도된 배발생 캘러스의 식물체로의 안정적 분화를 확인하기 위하여 실험을 실시한 결과, 대부분의 배발생 캘러스가 현탁배양을 통해 자엽형 체세포 배로 분화하는 것을 확인할 수 있었다. 자엽형 체세포 배를 Moon 등(2005)의 방법에 따라 식물체 분화 실험을 한 결과, 자엽과 하배축이 신장하였으며, 약 12주간의 배양 후에 완전한 식물체의 형태를 갖추는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

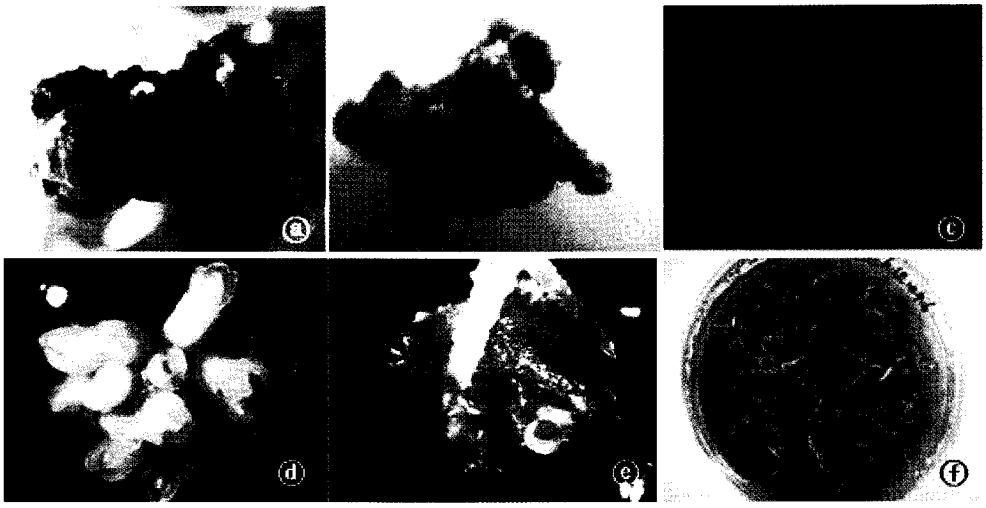

Fig. 2. Germinated plants from embryogenic callus of *Kalopanax pictus*.
Induction of embryogenic callus from petiol explants (a, b). Suspension culture of embryogenic callus (c). Formation of cotyledonary somatic embryo from callus suspension culture (d). Germinated plants from somatic embryo (e, f).

배지 물리성 및 2,4-D 처리에 따른 배발생 캘러스 증식

배지 물리성에 따른 배발생 캘러스의 증식 실험을 실시한 결과, gelrite를 첨가한 고체배지에 비해 gelrite를 첨가하지 않은 액체배지에서 약 5배의 증식률을 보였다(Fig. 3). 이 결과를 바탕으로 액체배지가 배발생 캘러스의 대량 증식에 적합하여, 액체배지에서의 대량 증식 조건을 규명하기 위하여 다음 실험을 실시하였다.

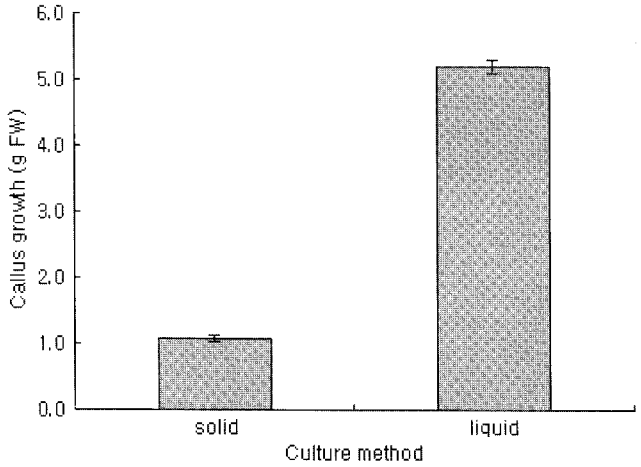

Fig. 3. Effect of culture method on callus propagation of *Kalopanax pictus*.

액체 현탁배지에서의 음나무 배발생 캘러스의 증식이 가장 활발히 이루어지는 2,4-D 농도를 확인하기 위하여 4수준의 농도별로 실험한 결과, 1.0mg/l의 2,4-D를 첨가하였을 때 가장 많은 양의 캘러스가 증식되었다(Fig. 4). 또한 1회 현탁배양 기간을 최대 4주를 넘지 말아야 하며, 4주 이상 현탁하였을 경우 캘러스가 갈변하면서 배양액 안에서 죽게 된다(결과 미제시). 이것은 1회 현탁배양 시 배양액 안의 산소가 부족하여 나타나는 현상일 뿐만 아니라, 배양액내의 무기염류의 부족 때문에 생기는 것으로 생각된다. 캘러스의 괴사를 막기 위해서는 신선한 공기

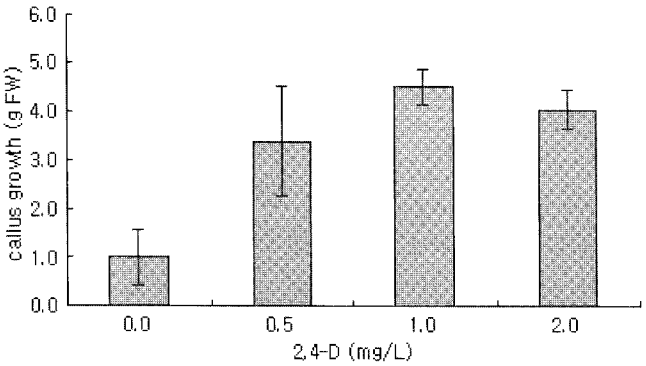

Fig. 4. Effect of 2,4-D on embryogenic callus growth (after 4weeks) of *Kalopanax pictus* cultured in liquid medium.

를 지속적으로 주입해 줄 수 있고, 많은 양의 배양액을 넣어 사용할 수 있는 생물반응기를 이용한다면 배양액의 교체 등과 같은 번거로운 작업 및 교체 시 일어날 수 있는 오염을 방지하여 오랜 기간동안 대량의 캘러스를 증식시킬 수 있을 것으로 생각된다. 또한 4주 이상 현탁배양할 경우 최대 12주까지 약 3회 반복 현탁배양하여 증식할 수 있고, 그 이상 배양하였을 경우에는 배발생 캘러스에서 체세포 배로의 전환 능력이 현저히 감소하여 결과적으로 식물체 생산에 있어서는 좋지 못한 영향을 미친다.

배지 종류 및 농도에 따른 배발생 캘러스의 증식

배지 종류에 따른 캘러스 증식 정도를 알아보기 위해서 5개의 배지(MS, B5, N6, White, SH)에 1.0mg/l의 2,4-D를 첨가하여 실험을 실시하였다. 기존에 사용하던 MS 기본배지에 비하여 B5 배지와 White 배지에서의 캘러스 증식이 매우 잘되는 것으로 나타났다(Fig. 5). 이것은 MS 배지에 비하여 위 두가지 배지에 함유된 암모니아태 질소의 함량이 B5배지의 경우 약 1/16 정도이며, White 배지의 경우는 암모니아태 질소가 전혀 들어있지 않기 때문으로 생각된다. 이것은 붉은잎자작나무에서의 배발생 캘러스 실험 결과와 같은 양상으로 암모니아태 질소와 질산태 질소의 비율이 캘러스 생장과 색소 형성에 미치는 영향에 대한 실험 결과, 낮은 농도의 암모니아태 질소가 캘러스 형성에 유리하게 작용하는 것으로 나타났는데, 음나무 또한 붉은잎자작나무와 마찬가지로 암모니아태 질소의 비율이 질산태 질소의 비율에 비해 낮을 경우 캘러스의 형성 및 증식에 유리하게 작용하는 것으로 생각된다.

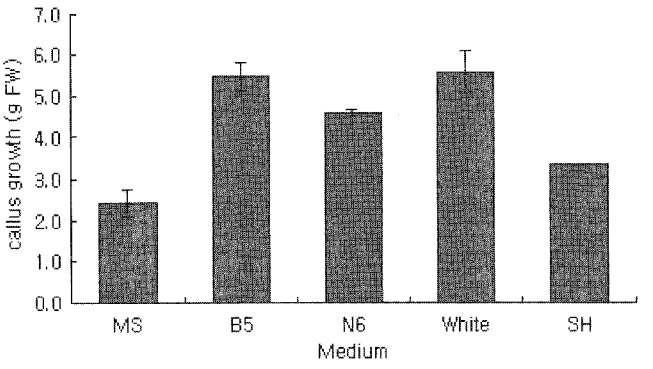

Fig. 5. Find out of suitable media on embryogenic callus proliferation of *Kalopanax pictus*.

배지의 농도에 따른 캘러스의 증식은 B5와 White 배지 모두에서 1/2의 농도에서 가장 많이 증식되는 것으로 나타났다(Fig. 6). 이 사실로 보아 캘러스의 생장 및 증식에 암모니아태 질소와 질산태 질소의 비율도 중요할 뿐만 아니라 배양액내의 무기염류의 양도 매우 중요한 요소임을 입증하는 결과이다.

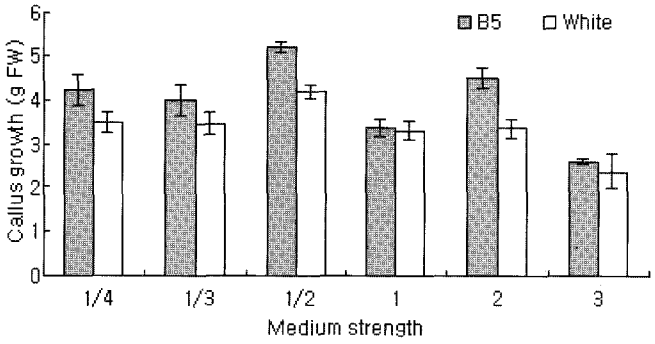

Fig. 6. Establishment of medium strength condition in suspension culture of *Kalopanax pictus*.

Sucrose 농도에 따른 배발생 캘러스의 증식

식물의 세포, 조직 및 기관배양에 있어서 일반적으로 배양 배지에 탄소원 첨가가 요구된다(George, 1993; Karhu, 1997). Elaeis quineensis Jacq.(oil palm) 및 Asparagus officinalis L.등과 같은 식물종의 형태형성에 탄소원이 영향을 미치는 것으로 보고된 바 있다(Hilae and Te-chato, 2005; Mamiya and Sakamoto, 2000).

배발생 캘러스의 증식에 영향을 미치는 요인 중의 하나인 sucrose를 농도별로 처리한 결과, 3%의 sucrose를 첨가한 배양액에서 가장 많은 양이 증식됨을 알 수 있었다(Fig.7). 각 농도별 배양액에서 증식된 배발생 캘러스를 2,4-D를 첨가하지 않은 기본 배지에 현탁하였을 경우, sucrose의 농도가 1%, 2% 및 3%인 경우에는 대부분의 캘러스가 체세포 배로 발달하였으며, 배양 후 정상적인 형태의 자엽이 출현하였으며, 하배축이 가늘고 길게 형성된 반면, 5%의 sucrose가 첨가된 배양액에서 증식된 캘러스는 체세포 배로의 발달은 정상적으로 이루어졌으나 자엽이 형성되지 않고, 하배축은 짧고 굵으며 여러개의 체세포 배가 뭉쳐서 정상적인 발아가 이루어지지 않았으며, 배양 중 대부분의 발아된 배가 갈변하여 고사하였다.

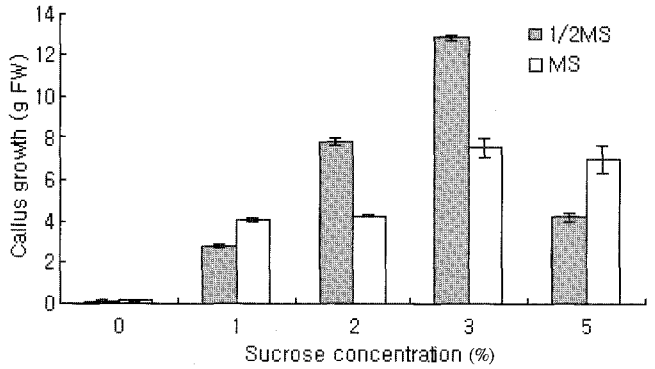

Fig. 7. Effect of sucrose concentration on embryogenic callus proliferation of *Kalopanax pictus*.

Sucrose는 여러 가지 유용한 탄소원 중 가장 대표적인 것임에도 불구하고(Petersen *et al.*, 1999; Fuentes *et al.*, 2000), sucrose는 세포 내의 저산소증과 에탄올 축적을 야기시키며, 빠른 물질대사를 유발한다(Scott *et al.*, 1995; Ramarosandratana *et al.*, 2001). 그러므로 고농도의 sucrose를 첨가하여 배양하였을 경우 음나무의 배발생 캘러스가 비정상적인 발아 양상을 띄는 것으로 생각된다. 또한 배양 배지내의 적당량의 탄소원의 영양학적 중요성은 널리 알려져 있으나, 다량원소와 탄소원 등과 같은 배지 구성성분의 첨가는 배지 내 삼투 포텐셜을 감소시키는 것으로 나타났다(George, 1993). Oil palm 배배양에서 osmoticum은 체세포 배 발아(배로부터 신초나 뿌리를 유도시키는 것)시 수분 스트레스를 증가시킨 결과를 보였다(Hilae and Te-chato, 2005). 따라서 sucrose는 배발생 캘러스의 증식, 체세포 배 발아 및 식물체 형성에 영향을 미치는 중요한 요소이며 5% 수준에서 배발생 캘러스 증식률의 감소와 체세포 배의 비정상적인 발아는 배지의 삼투압이 지나치게 높거나 탄소원의 독성에 의한 해로운 작용으로 추측된다(Mamiya and Sakamoto, 2000). 이러한 경우 sucrose를 대체할 적정 탄소원의 종류를 찾는 실험을 추가적으로 실시해야 할 것으로 생각된다.

적 요

배발생 캘러스 유도 실험을 통해 음나무의 대량 증식의 가능성을 제시하였다. 절편체의 부위 및 호르몬 농도에 따라 약간의 차이는 보였으나 대부분의 조건에서 배발생 캘러스가 유기되었다. 특히 엽병 절편체에 비하여 잎 절편체에서 배발생 캘러스 유기가 더 활발히 이루어졌으며, 2.0mg/l의 2,4-D와 0.1mg/l의 BA를 혼합 처리한 조건에서 가장 많이 유기됨을 확인할 수 있었다. 배발생 캘러스의 대량 증식을 위하여 현탁배양을 실시한 결과 1.0mg/l의 2,4-D를 첨가한 배양액이 증식에 가장 좋은 것으로 나타났으며, 무기염류를 1/2로 반감한 B5 배지와 White 배지가 적당한 것으로 나타났다. 또한 탄소원은 3%의 농도를 사용하였을 때 캘러스 증식 뿐만 아니라 체세포 배의 발아에도 적당한 것으로 나타났다. 따라서 본 실험 결과는 생물반응기를 이용한 음나무의 대량 생산을 가능하게 하는 기초 자료로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21 사업지원에 의하여 수행된 연구 결과의 일부이며, 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

Choi, J. W., K. Huh, S. H. Kim, K. T. Lee and H. J. Park. 2002a. Kalopanaxsaponin A from *Kalopanax pictus*, a potent antioxidant in the rheumatoidal in the rheumatoidal rat treated with Freund's complete adjuvant reagent. J. Ethmopharmacol. 79: 113-118

Choi, J. W., K. Huh, S. H. Kim, K. T. Lee, H. J. Park and Y. N. Han. 2002b. Actinociceptive and anti-rheumatoidal effects of *Kalopanax pictus* extract and its saponin components in experimental animals. J. Ethmopharmacol. 79: 199-204

Choi, Y. E., J. W. Kim and E. S. Yoon. 1999a. High frequency of plant production via somatic embyogenesis from callus or cell suspension cultures in *Eleutherococcus senticosus*. Ann. Bot. 83: 309-314

Choi. Y. E., S. K. Ko, K. S. Lee and E. S. Yoon. 2002. Production of plantlets of *Eleutherococcus sessiliflorus* via somatic embryogenesis and successful transfer to soil. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 69: 201-204

Choi, T. E., D. C. Yang and E. S. Yoon. 1999b. Rapid propagation of *Eleutherococcus senticosus* via direct somatic embryogenesis from explants of germinating zygotic embryo. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 58: 93-97

Choi, T. E., D. C. Yang, E. S. Yoon and K. T. Choi. 1999c. High-efficiency plant production via direct somatic single embryogenesis from preplasmolysed cotyledons of *Panax ginseng* and possible dormancy of somatic embryos. Plant Cell Rep. 18: 493-499

Fuentes, S. R. L., M. B. P. Calheiros, J. Manetti-Filho and L. G. E. Vieira. 2000. The effectos of silver mitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 60: 5-13

George, E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1. The Technology, 2nd ed. Exegetics Ltd., Edington.

Gui, Y., Z. Guo, S. Ke and R. H. Skirvin. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acanthopanax senticosus*. Plant Cell Rep. 9: 514-516

Hernandez, I., C. Celestino, J. Alegre and M. Toribio. 2003. Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis: Ⅱ. Plant regeneration from selected cork oak trees. Plant Cell Rep 21: 765-770

Hilae, A. and S. Te-chato. 2005. Effects of carbon sources and strength of MS medium on germination of somatic embryo of oil palm(*Elaeis quineensis* Jacq.) Songklanakarin J. Sci. Technol. 27: 629-635

Karhu, S. T. 1997. Sugar use in relation to shoot induction by sorbitol and cytokinin in apple. J. Am. Soc. Hort. Sci. 122: 476-480

Kim, Y. K., S. J. Park, J. H. Ha, J. W. Choi and K. T. Lee. 2002. In vitro anti-inflammatory activity of kalopanaxsaponin A isolated from *Kalopanax pictus* in murine macrophage RAW 264.7 cells. Biol. Pharm. Bull. 25(4): 472-476

Lee, E. B., D. W. Li, J. E. Hyun, I. H. Kim and W. K. Whang. 2001. Anti-inflammatory activity of methanol extract of *Kalopanax pictus* bark and its fractions. J. Ethmopharmacol. 77: 197-201

Mamiya, K. and Y. Sakamoto. 2000. Effect of concentration and strength of basal medium on conversion of somatic embryos on *Asparagus offcinalis* L. Sci Hort 84: 15-26

Moon, H. K., Y. W. Kim, J. S. Lee and Y. E. Choi. 2005. Micropropagation of *Kalopanax pictus* tree via somatic embryogenesis. 41: 303-306

Park, H. J., D. H. Kim, J. W. Choi, J. H. Park and Y. N. Han. 1998. A potent antidiabetic agent from *Kalopanax pictus*. Arch. Pharm. Res. 21: 24-29

Petersen, K. K., J. Hansen and P. Krogstrup. 1999. Significance of different carbon sources and sterilization methods on callus induction and plant regeneration of *Miscanthus×ogiformis* Honda Giganteus. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 58: 189-197

Ramarosandratana, A., L. Harvengt, A. Bouvet, R. Galvayrac and M. Pâques. 2001. Effects of carbohydrate source, polyethylene glycol and gellan fum concentration on embryonal-suspensor mass (ESM) proliferation and maturation of maritime pine somatic embryos. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 37: 29-34

Sano, K., S. Sanada, Y. Ida and J. Shoji. 1991. Studies on the constituents of the stem bark of *Kalopanax pictus* Nakai. Chem. Pharm. Bull. 39: 865-870

Scott, P., R. L. Lyne and T. Rees. 1995. Metabolismof maltose and sucrose by microspores isolated from barley (*Hordeum vulgare*). Planta 197: 435-441

Tachikawa. Y., T. Saitou , H. Kamada and H. Harada. 1998. Changes in protein pattern during stress induction of carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryogenesis. Plant Biotechnol 15: 17-22

Yeoung, Y. R., M. H. Lee, B. S. Kim, H. K. Kim and J. H. Kim, 2001. Seed germination and softwood cutting technique of *Kalopanax pictus* Nakai. Kor, J. Plant Resources 14: 53-59

채영복, 김완주, 지옥표, 안미자, 노영주. 1988. 한국유용식물 자원 연구편람. 한국화학연구소 pp. 122.

(접수일 2007. 11. 23 ; 수락일 2007. 12. 7)