

시호(*Bupleurum falcatum* L.) 잎절편으로부터 형성된 체세포배 발생의 형태학적 관찰

조덕이* · 소웅영¹

우석대학교 자연과학대학 생물학과, ¹전북대학교 자연과학대학 생물학과

Morphological Observation of Somatic Embryogenesis in Leaf Explant Cultures of *Bupleurum falcatum* L.

Duck Yee CHO* and SOH, Woong Young¹

*Department of Biology, Woosuk university, Chonbuk, 565-800; and

¹Department of Biology, Chonbuk National university, Chonju, 561-756. *Corresponding author.

This study describes plant regeneration from leaf explant of *Bupleurum falcatum* through somatic embryogenesis, and the effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on somatic embryo abnormalities. The relationship between the cotyledon number of somatic embryo and its germinability is also described. Embryogenic calli were selected from calli formed on explants cultured on MS solid basal medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D. Cotyledonary abnormalities were observed in somatic embryos which were developed from calli cultured on MS medium with 1 mg/L 2,4-D for 6-week and then subcultured on 2,4-D free MS medium for 3 weeks. The frequency of abnormalities was as follows: 7% of somatic embryos had one cotyledon, 65% of them had two cotyledons, 25% three cotyledons, 5% four cotyledons, 2% five cotyledons, and 3% trumpet-like cotyledons. The two cotyledon somatic embryos were germinated at a frequency of 80%. However, the germination frequency of one cotyledon embryo and multicotyledonary embryo was lower than that of the two cotyledon somatic embryo. All of trumpet-like somatic embryos did not germinate. Histological observations of multicotyledon embryo showed circular procambium in the root but procambial strands in the cotyledonary node or upper hypocotyl. The number of the strands was equal to the cotyledon number.

Key words: cotyledonary structure, embryo abnormality, germination, procambial arrangement, somatic embryo,

시호(*Bupleurum falcatum* L.)는 산형과에 속하는 다년생 초본식물로서 노지재배의 2년근을 수확하여 해열, 진통, 해독 및 소염 등의 처방에 사용한다. 한국산은 일본, 중국의 노지재배근 보다 saikosaponin 함량이 뛰어나지만 급증하는 수요에 비하여 공급량이 부족하므로 일본 및 중국으로부터 수입해오고 있는 실정이라서 saikosaponin 생산기반 구축을 위하여 시호의 조직배양에 대한 연구가 필요하게 되었다. 또한 재래식 노지재배의 번식방법에 의한 증식은 재배기간이 길고 재배지역 및 계절적 영향으로 인한 변이가 많으며, 2년근은 뿌리 내부가 목질화되어 saikosaponin 함량이 떨어진다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 증식이 빠르고, 우수한 형질의 세포주를 선발하여 기내에서 대량증식시킬 필요성이 있다.

식물세포 및 조직배양으로부터 체세포배 발생을 유도할 수 있고 이로부터 식물체 재생을 시킬 수 있으므로 인공종자 생산 및 양질의 식물체를 대량생산하게 되었으나 접합자배와 기내배양에서 발생된 체세포배는 형태학적으로 차이가 있음이 밝혀졌다(Ammirato, 1977; Kageyama et al., 1990; Lee and Soh 1993 ab). 땅두릅, 멜론 및 당근에서 나팔모양 자엽배 등 이상배가 2,4-D 첨가배지에서 유도되었다(Lee and Soh, 1993a; Choi et al., 1994; Soh and Cho, 1995). 이러한 비정상적인 체세포배의 발생으로 인하여 식물체 재생율은 저조하게 된다는 사실이 밝혀졌다(Soh, 1993; Wetzstein and Baker, 1993). 따라서 이러한 체세포배의 자엽이상에 미치는 식물생장조절제 및 배지의 성분에 대한 연구를 서두르지 않으면 충실하고 건전한 식물체 재

생체계를 확립시킬 수 없다.

시호에 관한 연구는 주로 노지재배 시호근의 성분분석 (Shimizu et al., 1986; Tani et al., 1986), 약리작용(Lee et al., 1993), 캘러스나 조직으로부터 부정근 발생에 대한 해부학적 연구(Bae et al., 1994) 및 부정근으로부터 유용성분 생산에 대한 연구(Kim et al., 1995; Hiraoka et al., 1986; Jo et al., 1990) 등이 있으나 체세포배 발생을 통한 식물체 재생 과정에 따르는 조직학적 연구와 체세포배 발생에서 배의 형태에 대한 연구가 미흡한 실정이다. 따라서 시호 잎절편으로부터 체세포배 발생 패턴에 미치는 2,4-D와 체세포배 발생을 통한 식물체재생 및 체세포배 발생과정의 해부학적 연구를 시도하였으며 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

식물재료 및 캘러스 유도

시호(*Bupleurum falcatum* L.)의 종자를 Bae 등(1994)의 방법으로 발아시켜 0.1, 0.5, 1, 2, 3 및 5 mg/L의 2,4-D 및 BA가 단독 및 조합처리된 MS (1962) 기본배지에서 잎절편체를 100 mL 삼각플라스크에 400 mL씩 넣어 3개의 잎절편(5 × 5 mm)을 치상하여 캘러스를 유도하였다. 배지는 pH 5.8로 맞추고 121°C, 1.2기압에서 15분간 고압멸균하였다. 배양물은 25 ± 1°C, 1900 Lux 에서 광주기 16시간으로 조절된 배양실에서 6주간씩 5회 배양하였다.

체세포배 발생과정의 해부학적 연구

체세포배 발생을 조직학적으로 관찰하기 위하여 단계별로 시료를 채취하여 FAA에 고정하였다. 고정된 재료는 부탄올 시리즈로 탈수하고 paraplast에 포매시켜 10 μm 두께로 절편을 만들어 haematoxylin과 fast green 및 light 등으로 삼원염색하여 광학현미경하에서 검경하였다.

결과 및 고찰

캘러스 유도 및 체세포배 발생을 통한 식물체 재생

시호 잎 절편을 BA 및 2,4-D의 여러 가지 농도(0.1, 0.5, 1, 2, 3 및 5 mg/L)의 단독 및 조합첨가된 MS 배지에 이식하면 2주후 절편단면이 부풀기 시작하여 연노랑색의 캘러스와 연녹색의 캘러스가 유도되었다. 또한 2,4-D 첨가배지에서는 연노랑색 캘러스가 형성되고 녹색 캘러스는 BA 첨가 배지에서 형성되었다. 배양 3주후 외식편의 전체에 캘러스가 유도되었다. 잎절편 이식 6주후 0.1, 0.5, 1 mg/L의

Table 1. Effects of 2,4-D and BAP combinations on somatic embryogenesis in leaf explant tissue cultures of *Bupleurum falcatum* L.^a

| BA (mg/L) | 2,4-D (mg/L) | | | | | | | |
|--------------|-----------------|-----|-----|----|----|----|----|--|
| | 0 | 0.1 | 0.5 | 1 | 2 | 3 | 5 | |
| 0 | | R | C | SE | SE | SE | SE | |
| 0.1 | C | S | C | C | C | C | C | |
| 0.5 | C | C | C | C | C | C | C | |
| 1 | C | C | C | R | R | R | C | |
| 2 | N | C | C | C | C | C | C | |
| 3 | N | C | C | C | C | N | N | |
| 5 | N | N | N | N | N | N | N | |

^aR: Root S: Shoot SE: Somatic Embryo N: Necrosis C: Callus

BA 첨가배지에서 캘러스 형성만 일어났고, 고농도인 2, 3 및 5 mg/L BA와 5 mg/L BA 및 여러 가지 2,4-D가 조합 첨가된 배지에서는 괴사하였다. 또한 체세포배 발생은 1, 2, 3 및 5 mg/L 2,4-D에서 일어났고(Table 1 and Fig. 1), 특히 고농도인 5 mg/L 2,4-D에서는 캘러스 형성없이 잎절편체로부터 직접 체세포배가 형성되었다(Fig. 2). 1, 2 및 3 mg/L 2,4-D 첨가배지에서는 캘러스 형성후 배발생능 캘러스(Fig. 1A)로부터 구형상의 배(Fig. 1B)가 형성되고 짧은 시기의 심장형의 배(Fig. 1C)가 형성되었다. 이러한 심장형의 배는 어뢰형배(Fig. 1D)로 진행되며 후기 어뢰형의 배(Fig. 1E)는 점차로 길어지면서 자엽시기의 배(Fig. 1F)로 되어 발아하여 진실한 식물체(Fig. 1G)로 재생되었다.

일반적으로 체세포배발생에는 캘러스 형성을 거쳐서 일어나는 경우와 식물 외식편에서 직접적으로 일어나는 경우가 있다 (Sharp et al., 1980; Konar and Nataraja, 1965; Conger et al., 1983; Williams and Maheswaran, 1986). 캘러스 형성을 유도시킨 후 이로부터 체세포배를 발생시키는 경우는 2,4-D와 같은 오옥신을 첨가하여 배발생능 캘러스를 유도시킨 후 오옥신을 제거하여야만 체세포배가 형성된다 (Amirato, 1983). 그러나 식물외식 편에서 직접적으로 형성되는 경우에는 배양재료가 원래 갖는 배형성능을 가지고 있으므로 생장조절제의 역할은 배발생을 자극할 뿐이라는 견해가 있다(Ammirato, 1983). 또한 *Petroselinum hortensii*의 배유조직 (Masuda et al., 1977)과 *Ilex*의 미숙배(Hu and Sussex, 1971) 및 당근의 접합자배(Smith and Krikorian, 1980)의 경우는 생장조절제를 첨가하지 아니할 때에도 체세포배발생이 일어났다. 따라서 Ammirato (1983)의 연구에서처럼 배발생시킬 정도의 극미량의 필요성이나 Hu and Sussex (1971) 및 Smith and Krikorian (1989)의 연구에서 생장조절제 무첨가시 직접적 체세포배발생이 일어나는 현상이나 본 연구진의 고농도 2,4-D (5 mg/L) 첨가배지에서 직접 체세포배가 형성된 것은 같은 현상으로 사료되어진다. 체세포배의 기원 및 발생 양상은 식물의 종과 배양 절편체

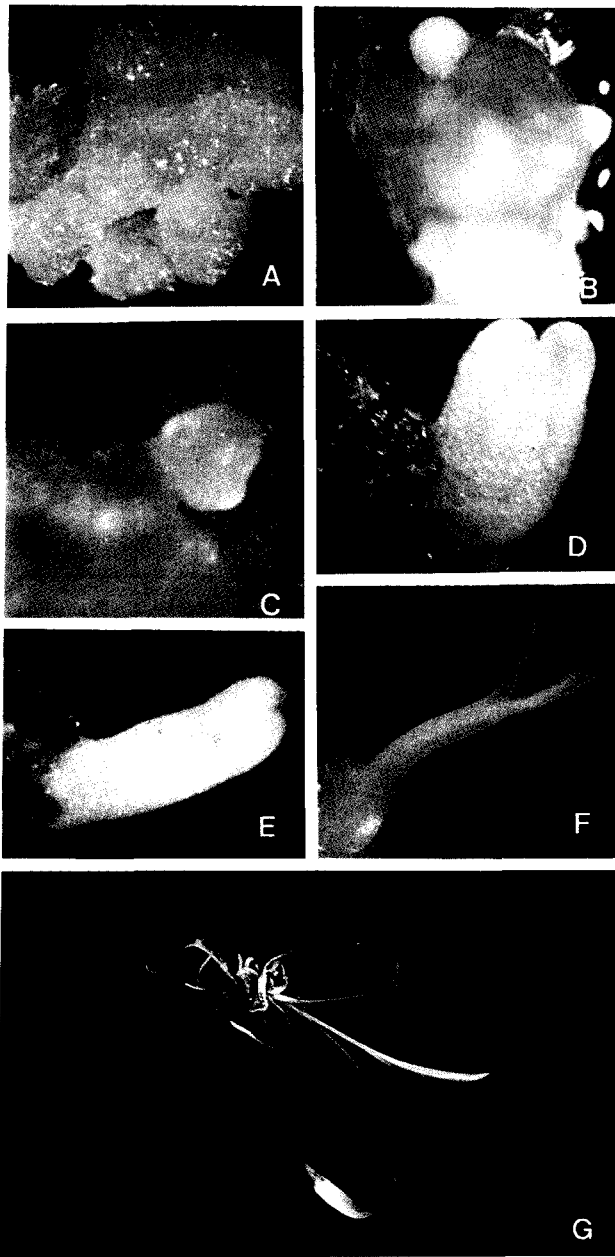


Figure 1. Induction of somatic embryogenesis from *Bupleurum falcatum* callus following sequential subculture on hormone free MS medium. A: Embryogenic callus formation on MS agar medium containing 1 mg/L 2,4-D for 6-week of culture; B: Globular stage embryo obtained upon transfer of embryogenic callus to hormone free medium; C: Early heart stage embryo; D: Torpedo stage embryo; E: Advanced torpedo stage embryo; F: Cotyledonary stage embryo; G: Plantlet.

에 따라서 다르고(Lu and Vasil, 1982; Wang and Phillips, 1984), 이러한 현상은 식물절편 채취시기 및 연령에 따라서 내재 오옥신의 함량이 다르기 때문에 일어난다고 사료된다.

체세포배 발생단계별 조직학적 관찰

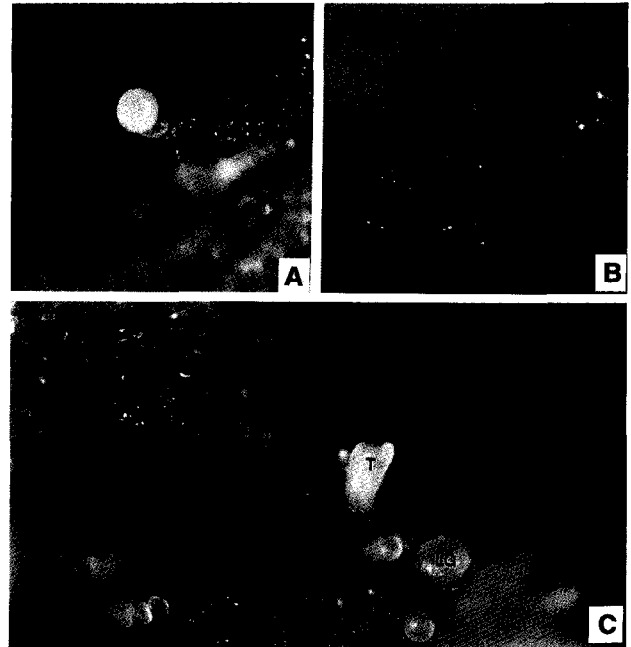


Figure 2. Direct somatic embryogenesis from leaf epidermis of *Bupleurum falcatum* on MS medium containing 5 mg/L 2,4-D for 6-week of culture. A: Globular stage; B: Heart stage; C: Torpedo stage T and LG: late globular stage embryo.

배발생능 캘러스로부터 체세포배의 발생단계별 조직학적 특징을 관찰하기 위하여 배발생능 캘러스를 MS 기본배지에 옮겨 3주간 배양하면서 구형, 심장형, 어뢰형 및 자엽기의 체세포배를 선발하여 종단면으로 관찰하여 보면, 구형배(Fig. 3A)에서는 세포분열상이 균등하게 분포되어 정단분열조직의 극성이 나타나지 아니하고, 초기 심장형시기부터 양극성 패턴이 나타나기 시작하고 동시에 내부에 전형성축속이 형성되기 시작하여 자엽의 원기가 돌출되기 시작하면서 심장형을 이루게 되었다(Fig. 3B). 어뢰형배와(Fig. 3C) 자엽기의 배(Fig. 3D)에서는 더욱 뚜렷하게 전형성축속이 각각의 자엽으로 이어지게 되며 장차 유경과 유근이 될 부분이 형성되었다. 시호의 외부 및 조직학적 체세포배 발달단계는 접합자배의 초기과정에서 보여지는 배병의 구조가 관찰되지 않는다는 점에서 큰 차이가 보였다. 그러나 유근과 유경형성의 양극성 패턴과 표피, 기본조직 및 유관속 조직형성의 방사패턴 분화에 있어서는 (Mayer et al., 1991) 접합자배와 유사하였다. 따라서 기내배양에서 관찰되는 체세포배와 자연상태에서 관찰되는 접합자배의 발생단계는 배병의 구조를 제외하고는 거의 동일한 것으로 사료된다. 그리고 이러한 자엽시기의 체세포배는 MS 기본배지에서 3주 동안 배양하면 대부분 유근과 유경이 발생되어 정상적인 완전한 유식물체를 형성하였다. 체세포배 발생을 통한 식물체 재생은 양극성과 방사패턴의 분화과정을 거치며 이와 같은 현상은 정단분열조직이 캘러스 내부의 유관속과 연결

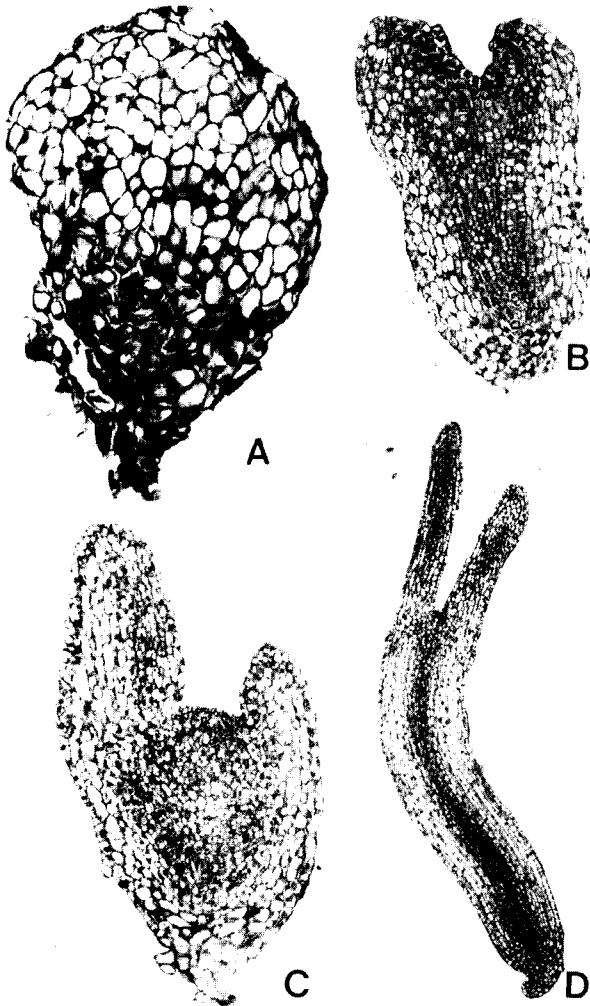


Figure 3. Histological observation on the developmental stage of somatic embryo from culture of *Bupleurum falcatum* L. A: globular; B: late heart; C: torpedo; D: cotyledonary stage.

되어 형성되는 부정아를 통하여 일어나는 식물체 재생과는 전혀 다른 발생패턴을 거쳐 식물체가 형성되었다.

다자엽 체세포배의 발생

체세포배의 자엽 발생과정을 관찰한 결과 2,4-D의 농도와 관계없이 2개의 정상적인 자엽을 갖는 체세포배 및 1, 3, 4, 5개 등 비정상적인 자엽을 갖는 체세포배 그리고 나팔형 배가 형성되었다(Fig. 4). 1개의 자엽을 갖는 체세포배는 7%, 정상적인 2개의 자엽은 65%, 3개의 자엽을 갖는 것은 25%, 4개에서는 5%, 5개에서는 2% 등이 출현되었으며 나팔모양에서는 3%를 나타냈다(Fig. 5). 이와 같은 체세포배의 자엽 변이에 따르는 발아율을 보면 한개의 자엽배에서 25%, 2개의 자엽배에서 80%, 3개, 4개, 5개의 자엽배에서 58%, 38% 및 20% 등으로 2개의 정상자엽에서 가장 발아율이 좋았다. 또한 나팔형의 자엽에서는 전혀 발아되지 아니하였고 당근

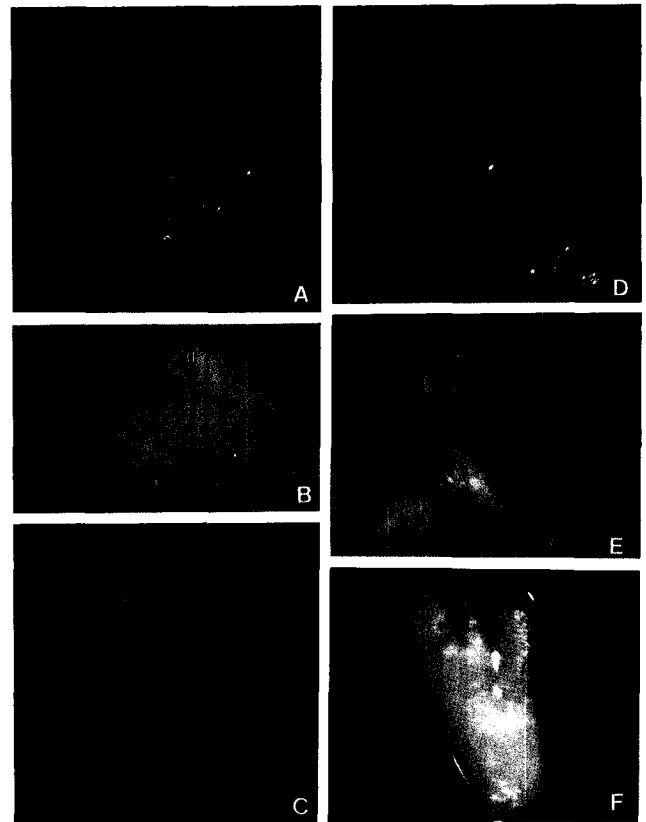


Figure 4. Cotyledonary variation of somatic embryos formed from callus cultures of *Bupleurum falcatum* in MS basal medium. A: One cotyledon; B: Trumpet-shaped cotyledon; C: Two cotyledon; D: Three cotyledon; E: four cotyledon; F: five cotyledon.

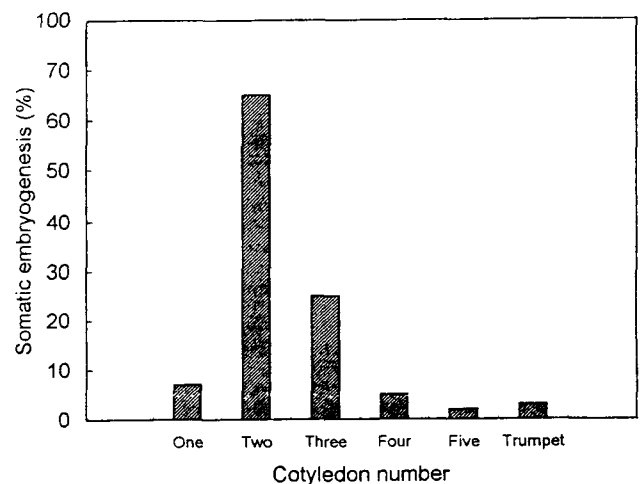


Figure 5. Germination frequency (%) of somatic embryos formed from callus cultures of *Bupleurum falcatum* L. Data were collected from three replicates with 100 embryos each.

(Soh et al., 1995) 현탁배양에서 발생된 체세포배의 경우와도 같은 현상이었다(Fig. 6). 그러나 당근의 경우에는 1개

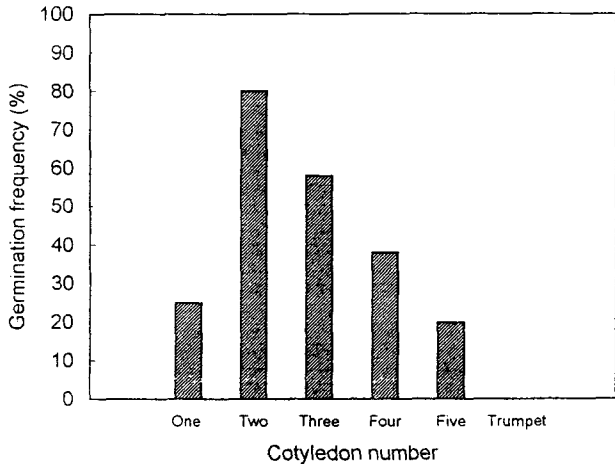


Figure 6. Germination frequency (%) of somatic embryos formed from callus cultures of *Bupleurum falcatum* L. Data were collected from three replicates with 100 embryos each.

의 자엽배에서 55%이었으나 시호의 경우에는 25%에 불과하였다. 나팔형 자엽배에서 당근의 경우와 마찬가지로 시호에서도 전혀 발아되지 아니하였다 (Soh et al., 1995). 이와 같이 체세포배의 자엽의 숫자변이에 따라 식물체 재분화율은 크게 차이가 있으며 1, 3, 5개 자엽 및 나팔형 등 비정상적인 자엽의 체세포배가 정상적인 2개의 자엽배에 비하여 발아율이 낮았다. 이것은 더덕(Choi, 1994), 포도(Isabelle et al., 1993), 대두(Choi, 1994)에서 비정상 자엽을 갖는 체세포배의 식물체 재생율이 낮은 결과와 유사한 경향이었다. 땅두릅(Lee and Soh, 1994)에서는 다자엽배가 정상적인 2개의 자엽을 갖는 배에 비하여 재생율이 높지만 나팔형 자엽배에서는 역시 재생율은 아주 낮았다. 따라서 나팔형 자엽배의 출현에 미치는 여러 가지 요인을 구명할 필요가 있다고 사료된다. 땅두릅의 경우 재생율은 자엽의 수에 비례하고 경엽부의 수도 자엽수에 비례하였으나(Lee and Soh, 1994) 시호나 당근(Soh et al., 1995)의 경우에는 재생율은 자엽수에 비례하지 아니하였다. 일반적으로 고형배지에서 배양한 경우에는 액체 현탁배양에서보다 이상자엽배의 출현 빈도가 적다. 이러한 현상은 액체배양에서는 같은 농도에서라 할지라도 더욱 민감하게 반응이 일어나며 체세포배 전체에 식물생장조절제가 영향을 주기때문에 사료된다. 또한 땅두릅의 경우(Lee and Soh, 1994) 식물생장조절제의 종류에 따라서 자엽변이가 달리 나타나서 사이토키닌 중 0.2 mg/L BA 에서 95%, zeatin 53% 및 kinetin 43%이었다. 따라서 다자엽배나 이상 자엽배 출현 빈도를 낮추기 위해 재료식물별로 처리되는 오옥신 및 사이토키닌의 종류와 농도에 대한 연구가 필요하게 된다.

다자엽 체세포배의 발생을 해부학적으로 관찰해 보면 1개의 자엽을 갖는 나팔모양의 체세포배는 자엽부위(Fig. 7-1)에 나팔모양의 전형성층이 관찰되며, 배측부위(Fig. 7-2)에

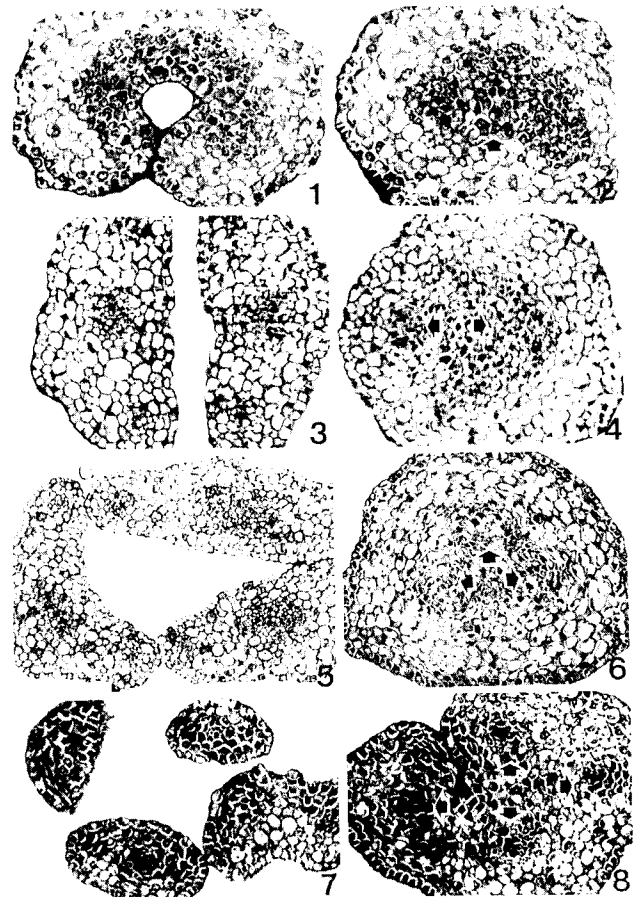


Figure 7. Transverse sections of somatic embryos with various type of cotyledons from callus cultures of *Bupleurum falcatum* L. 1, 3, 5, 7: middle region of cotyledon; 2, 4, 6, 8: hypocotyl showing procambial strands (arrows); 1, 2: monocotyledon; 3, 4: dicotyledon; 5, 6: Tricotyledon; 7, 8: Tetracotyledon.

서는 원형으로 존재하고 있다. 2개의 정상적인 자엽은 배측 부위에서 전형성층이 원통형으로 배열하고(Fig. 7-4), 자엽 절 부위에서 완전히 분리되어 각각 자엽으로 들어간다(Fig. 7-3). 3개의 자엽을 갖는 체세포배는 자엽절 부위에서 전형성층속이 3개로 나누어져서 자엽에서 각각 1개의 전형성층속을 갖고 있는 3개의 자엽을 형성하였다(Fig. 7-6). 4개의 자엽을 갖는 체세포배의 경우에도 배측에서 전형성층이 원통형으로 배열되어 있고 자엽절 부위에서는 전형성층속이 4개로 나누어져서 4개의 자엽에 각각 연결되었다.

이상과 같이 시호 배양계에서는 접합자배에서는 거의 관찰할 수 없는 비정상적인 체세포배가 많이 나타났으며 체세포배의 자엽수 변이는 전형성층속의 수와 밀접한 관계가 있으며 이상자엽배 출현은 발아율에 미치는 영향이 지대한 것으로 밝혀졌다. 체세포배로부터 식물체의 재생에 앞서 먼저 염두에 둘 것은 동조화된 배 및 구조와 기능상으로 정상적이고 건실한 배의 생산이다. 따라서 건실한 식물체 재생 체제를 확립하기 위하여 체세포배 발생의 초기 단계에서부

터 적절한 배양조건의 구명에 대한 연구가 필요하며 이는 대량번식에 중요한 관건으로 대두되고 있다.

적 요

시호(*Bupleurum falcatum* L.)의 잎절편으로부터 체세포배 형성을 통한 식물체 재생과 체세포배 발생의 이상을 일으키는 2,4-D의 영향에 대하여 또한 체세포배의 자엽수와 발아와의 관계에 대하여 기술하였다. 배발생능 켈러스는 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS 고형기분배지에서 배양된 켈러스로부터 선발하였다. 2,4-D 첨가 MS 기본배지에서 6주간 배양 후 3주간 2,4-D가 제거된 배지에서 배양하여 체세포배 발생과 비정상적인 체세포배의 자엽발생을 관찰하였다. 이상 자엽의 빈도는 정상인 2개 자엽에서 65% 인데 비하여 1개의 자엽에서 7%, 3개의 자엽을 갖는 체세포배에서는 25%, 4개 자엽에서는 5%, 5개 자엽에서 2% 및 나팔형 자엽배는 3% 이었다. 2개의 정상적인 자엽을 갖는 체세포배의 발아율이 80%인 것에 비하여 1, 3, 4, 5개의 자엽을 갖는 체세포배에서는 25%, 58%, 38% 및 20%로 발아율이 낮았다. 그러나 나팔형의 비정상 체세포배는 전혀 발아되지 않았다. 다 자엽배의 구조는 체세포배의 뿌리 또는 배측에서 원통상 전형성증을 나타내었지만 자엽절에서는 자엽수와 동일한 수의 전형성증속으로 분포되었다. 체세포배의 자엽수 변이는 전형성증의 수와 밀접한 관계가 있다.

사 사-이 연구는 1994년도 교육부 기초과학육성 연구비의 지원에 의한 것이며(BSRI-94-4427), 원고정리를 도와준 모 기식 대학원생에게 사의를 표한다.

인 용 문 헌

- Ammirato PV** (1977) Hormonal control of somatic embryo development from cells of caraway. Interaction of abscisic acid, zeatin and gibberellic acid. *Plant Physiol* 59: 579-586
- Ammirato PV** (1983) Embryogenesis. In DA Evans, WR Sharp, PV Ammirato and Y Yamada [eds.] *Handbook of Plant Cell Culture, Vol 1 Techniques for propagation and breeding*. Macmillan Publishing Co., New York, pp 82-123
- Bae HH, Cho DY, Kim SG, Soh WY, Seoung RS** (1994) Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on adventitious root formation from callus of *Bupleurum falcatum* L. and its histological observation. *Korean J Plant Tissue Culture* 21: 41-46
- Button J, Kochba J, Bonuman CH** (1974) Fine structure of and embryoids development from embryogenic ovular callus of shamouti orange (*Citrus sinensis* Osb.). *J Exp Bot* 25: 446-457
- Choi PS, Soh WY, Cho DY, Liu JR** (1994) Somatic embryogenesis in immature zygotic embryo cultures of Korean soybean (*Glycine max* L.) cultivars and effect of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid on somatic embryo morphology. *Korean J Plant Tissue Culture* 21: 7-13
- Choi PS, Soh WY, Cho DY, Liu JR** (1994) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in seedling explant cultures of melon (*Cucumis melo* L.) *Korean J. Plant Tissue Culture* 21: 1-6
- Choi PS, Soh WY, Cho DY, Liu JR** (1994) Effects of carbohydrate source and osmoticum on the structural abnormality of somatic embryo of *Codonopsis lanceolata*. Abtract. Spring Meet. Kor. Soc. Plant Tissue Culture. p. 47
- Conger BV, Hanning GE, Gray DJ, McDaniel JK** (1983) Direct embryogenesis from mesophyll cells of orchardgrass. *Science* 221: 850-851
- Hiraoka N, Kodama T, Oyanagi M, Nakano S, Tomita Y, Yamada N, Iida O, Satake M** (1986) Characteristic of *Bupleurum falcatum* plants propagated through somatic embryogenesis of callus cultures. *Plant Cell Report* 5: 319-321
- Hu CY, Sussex IM** (1971) In vitro development of embryoids on cotyledons of *Ilex aquifolium*. *Phytomorphology* 21: 103-107
- Isabelle GT, Mauro MC, Sossountzov L, Miginiac E, Deloire A** (1993) Arrest of somatic embryo development in grapevine: histological characterization and the effect of ABA, BAP and Zeatin in stimulating plantlet development. *Plant Cell Tissue Org Cult* 33: 91-103
- Jo PH, Seong RS, Bae HH, Soh WY, Cho DY** (1990) Saikosaponin contents in *Bupleurum falcatum* root produced by tissue culture. *Korean J Pharmacogn* 21: 205-209
- Kageyama K, Komatsuda T, Nakajima K** (1990) Effects of sucrose concentration on morphology of somatic embryo from immature soybean cotyledon. *Plant Tissue Culture Letters* 7: 108-110
- Kim SG, Cho DY, Soh WY** (1995) Saikosaponin content in adventitious root formed from callus of *Bupleurum falcatum* L. *Korean J Plant Tissue Culture* 22: 29-33.
- Konar RN, Nataraja K** (1965) Experimental studies in *Ranunculus sceleratus* L. Development of embryos from the stem epidermis. *Phytomorphology* 15: 132-137
- Lee JS, Lee CK, Choi JW** (1993) Pharmacologic activities of Saikosaponins (II) - Effects of Saikosaponin on metabolizing Enzymes and lipid peroxide contents in liver - *Kor J pharmacogn* 24: 153-158
- Lee KS, Soh WY** (1993 a.) Somatic embryogenesis and structural aberrancy of embryos in tissue cultures of *Aralia cordata* Thumb. *Korean J Plant Tissue Cult* 20: 77-84
- Lee KS, Soh WY** (1993 b.) Effects of cytokinins on the number of cotyledons of somatic embryos from cultures cells of *Aralia cordata* Thumb. *Korean J Plant Tissue Cult* 20: 171-175
- Lee KS, Soh WY** (1994) Effect of abscisic acid on the number of somatic embryo cotyledons in tissue cultures of *Aralia cordata* Thumb. *Korean J*

- Plant Tissue Culture **21**: 287-291
- Lu C, Vasil IK** (1982) Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of *Panicum maximum* Jacq. Amer J Bot **69**: 77-81.
- Masuda K, Koda Y, Okazawa Y** (1977) Callus formation and embryogenesis and endosperm tissue of parsely seed cultured on hormone free medium. Physiol Plant **41**: 135-138
- Mayer U, Torres Ruiz RA, Thomas B, Misera S, Jurgens G** (1991) Mutations affecting body organization in the Arabidopsis embryo. Nature **353**: 402-407
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant **15**: 473-497.
- Sharp WR, Sondahl MR, Calolas LS, Maraffa SB** (1980) The physiology of in vitro asexual embryogenesis. Hor Rev **2**: 268-310.
- Shimizu K, Amagaya sakae, Ogihara Y** (1986) Seperation and quantitative analysis of saikosaponins by highper formance liquid chromatography. Journal of Chromatography. **268**: 85-91
- Skoog E, Miller CO** (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. Symp Soc Exp Biol **11**: 118-140.
- Smith DL, Krikorian AD** (1989) Release of somatic embryogenic potential from excised zygotic embryos of carrot and maintenance of proembryonic cultures in hormone-free medium. Amer J Bot **76**: 1832-1843
- Soh WY** (1993) Development and structural diversity of regenerated plants in cell and tissue cultures. In ; Molecular apprpach to plant cell differentiation. 7th symposium on plant biotechnology. Korean Soc Bot pp. 1-35
- Soh WY, Coh DY, Lee EK** (1995) Multicotyledonary structure of somatic embryos formed from cell cultures of *Daucus carota* L. Korean J Bot **38** : in press
- Tani T, Katsuki T, Kubo M, Arichi S** (1986) Histochemistry IX Distribution of saikosaponin in *Bupleurum falcatum* root. Journal of Chromatography **360**: 407-416
- Thomas E, Street HE** (1972) Factors influencing morphogenesis in excised roots and suspension culture of *Atropa belladonna*. Ann Bot **36**: 239-247
- Wang AS, Phillips RL** (1984) Synchronization of suspension culture cells. In I. K. Vasil, ed., Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. 1. Laboratory procedures and their applications, Academic press, Inc. pp 175-181
- Wetzstein HY and C. M. Baker** (1993) The relationship between somatic embryo morphology and conversion in peanut (*Arachis hypogaea* L.). Plant Sci **92**: 81-89
- Williams EG, Mahaswaran G** (1986) Somatic embryogenesis: Factors influencing coodinated behaviour of cells as an embryogenic group. Anals of Botany **57**: 443-462

(1995년 10월 23일 접수)