

음나무 배발생 캘러스의 증식 및 체세포배 발달을 위한 액체 현탁 배양조건 확립

김선자 · 문흥규*

국립산림과학원 산림유전자원부 생물공학과

Establishment of suspension culture condition for embryogenic callus proliferation and somatic embryo development of *Kalopanax septemlobus*

Sun-Ja Kim · Heung-Kyu Moon*

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

ABSTRACT This study was conducted to establish the optimal suspension culture system for both the propagation of embryogenic cells (ECs) and the induction of somatic embryos (SEs) of *Kalopanax septemlobus*. The proliferation rate of ECs was reduced as the inoculum density was increased; the highest rate was obtained when 0.1 g/100 ml of cells was initially inoculated. According to the analysis of cell growth pattern and cell growth cycle (G1, S and G2/M), the cell growth started in 5 days culture initiation, grew rapidly until 15 days and then decreased gradually. Distinctive changes of the cell growth cycle by the culture periods was also observed; the growth cycle was doubled from initial 5.6% to 11.7% of S stage in 5 days culture and then reached in stable stages again. Therefore, the results indicated that a 15-day-cycle was the optimal culture period for the propagation of the ECs through the suspension culture. Furthermore, the cell inoculum density was also important for the induction of SE; more than 65% of SEs at the torpedo stage was induced by using the low level of cell inoculum (0.5 g/L), while the higher inoculum densities were rapidly reduced the proportion of SEs at that stage. Although the higher inoculum density delayed the development of SE, it did not affect the proportion of SEs at the globular and heart stage. In conclusion, this study showed that the suspension culture of the *Kalopanax septemlobus* ECs through the control of inoculum density was an efficient way for both the propagation of ECs and the induction of SEs, suggesting that the development of this system might help to reduce the culture period for the somatic embryo production.

서 론

음나무 (*Kalopanax septemlobus* Koidz.)는 두릅나무과에 속하는 낙엽활엽 교목으로 수고 25 m, 직경 1 m에 달하는 거목으로 목재는 물론 한약재 및 산채로도 이용되는 유망한 수종이다 (채영복 등, 1988). 음나무의 번식은 실생 및 근삽의 방법이 사용되어 왔으나 자연상태에서 음나무 종자는 2년간의 발아기간이 요구되고 발아율도 낮다. 무성번식인 근삽의 경우 삼목 시기가 봄철에만 국한되고, 삼목을 위한 근삽수의 채취가 어려워 효율적인 번식법은 못된다. 더욱이 삼목 발근율은 모수령의 증가에 따라 뚜렷이 감소되어 실용화가 어려운 실정이다 (Yeoung et al. 2001). 이러한 기존 번

식법의 대안으로서 기관 배양 및 체세포배 배양 기술 같은 다양한 방법의 조직배양 기술에 대한 연구가 활발히 이루어져 클론 증식의 주요 수단으로 이용되어 왔다 (Lee et al. 2006; Zhu et al. 2007).

음나무는 고급산채 및 특수 약리 성분을 목적으로 한 이용 가능성 때문에 효율적인 기내 번식법의 개발은 대량증식을 통한 실용화 측면에서 중요하게 평가된다. 음나무가 속해있는 두릅나무과의 수종 가운데 두릅나무속과 오갈피나무속 수종에 대한 다수의 조직배양 연구가 보고된 바 있으며 (Choi et al. 1999; Moon et al. 2008), 대량배양에 대한 연구 또한 활발히 이루어지고 있다 (Chakrabarty et al. 2003; Paek and Chakrabarty 2003; Shohael et al. 2005). 최근에는 배발생 캘러스의 액체 현탁 배양을 통한 체세포배 발달 및 식물체 재분화에 대한 연구가 많이 시도되고 있다 (Shohael et al. 2005; Thiruvengadam et al. 2006; Masako and Hifoji 2002). 음나무는 선행 연구를 통해 기내번식을 위한 기관분화 및 체세포배 배양기술이

*Corresponding author Tel 031-290-1163 Fax 031-290-1020
E-mail: jesusbhk@hanmail.net

어느 정도 확립되었으나 (Moon et al. 2002, 2005, 2008) 아직까지 액체 현탁배양을 통한 체세포배 발달의 연구는 발표된 바 없다. 본 연구는 음나무의 배발생 캘러스를 이용하여 대량 배양을 위한 기초자료를 제공코자 실시되었으며 체세포배 발달을 위한 액체 현탁 배양 조건을 확립하기 위하여 배발생 캘러스 증식을 위한 적정 현탁배양 밀도와 성장 패턴의 구명 및 체세포배 발달을 위한 적정 접종 밀도를 구명코자 수행되었다.

재료 및 방법

공시재료로 이용한 음나무는 경기도 화성군 팔탄면 소재 약 50년생 음나무 종자를 이용하여 종자의 과육을 제거하고 충실한 종자만을 수선하여 70% 에탄올에 1분, 2% NaOCl에 15분간 살균 후 외종피를 제거한 후 배발생 조직으로 유도하였다. 배발생 조직 및 체세포배의 유도는 Moon 등 (2005, 2008)의 방법으로 유도하여 본 시험에 사용하였다.

배발생 캘러스 초기 접종 밀도 실험

배발생 캘러스의 생장에 적합한 초기 접종 밀도를 조사하기 위하여 500 ml 삼각플라스크에 100 ml의 배지를 분주하여 초기 세포접종밀도 (wet weight 기준)를 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 g/100 mL로 각각 처리하였다. 배지는 2,4-D 1.0 mg/L 와 sucrose 3% 가 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962)를 사용하여 100 rpm으로 현탁배양 하였다. 배양 3주 후 vacuum pump를 이용하여 세포 내 수분을 모두 제거한 뒤 생체중을 측정하였으며, 60°C 하에서 24시간 건조 후 건물중을 측정하였다. 생체중에 대한 건물중 비율 (% dry weight)은 Kim (2002)의 방법에 따라 아래식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{생체중에 대한 건물중 비율} = \text{건물중} / \text{생체중} * 100$$

초기 접종한 양을 기준으로 배양 3주 후에 증가한 세포 성장률 (growth rate)을 구하고자 Zhong 등 (1996)의 방법에 따라 아래 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{세포 성장률} = \frac{(\text{최종 성장한 세포의 양}) - (\text{초기 접종한 세포의 양})}{(\text{초기 접종한 세포의 양}) / (\text{성장 기간}) * \text{성장기간} = \text{성장일수}(\text{day})}$$

본 실험의 배양 및 이하의 실험에서 배양환경은 광은 냉백색 형광등 (오스람 코리아, 안산, 한국) 하에서 25-30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광량 지속 밀도로 1일 16시간 일장을 유지하였으며, 온도는 25±1°C로 유지되는 배양실에서 수행하였다.

배발생 캘러스의 성장 패턴

상기의 실험 결과를 바탕으로 배양기간별 배발생 세포의 성장 변화를 확인하고자 위 실험과 동일한 조건으로 500 ml 삼각플라스크에 100 ml의 배지 (0.1g 배발생 세포)를 넣어 100 rpm으로 40일간 액체 현탁 배양하였다. 배양과정에서 5일 간격으로 배양세포를 수확하여 생체중과 세포 주기를 분석하였으며 다음의 식을 사용하

여 specific growth rate (μ) 와 doubling time (T_d)을 구하였다.

$$\text{Specific growth rate } (\mu) = 1/X \cdot dX/dt \quad (X = \text{fresh weight, } t = \text{time (day)})$$

$$\text{Maximum growth rate } (\mu \text{ max}), \text{ Doubling time } T_d = \ln 2 / \mu \text{ max}$$

체세포 배 발달을 위한 세포 접종 밀도

배양 초기의 접종 밀도가 체세포배 발달에 미치는 영향을 조사하고자 500 ml의 삼각플라스크에 100 ml의 배지를 분주하여 초기 접종 밀도를 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 30.0 g/L (생체중 기준)으로 각각 준비하였다. 배지는 MS배지에 0.41 μM abscisic acid, 0.02% (w/v) 활성탄 (activated charcoal), 5% (w/v) sucrose, 5% (w/v) polyethylene glycol (PEG, MW 3350)를 각각 첨가하여 사용하였다. 배양 5주 후 체세포배 발달 단계별 (세포단계, 구형/심장형 및 어뢰형 단계)로 구분하여 각 처리에 따른 배 발달 정도를 조사하였다. 한편 접종 밀도에 따라 각각 유도된 체세포배가 차후 발아에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 처리 별로 일정량 (0.25g/Petri dish)의 체세포배를 채취하여 1/2 MS + 8.66 μM GA₃, 2% sucrose, 0.3% gelrite 배지에서 2주간 배양 후 발아된 체세포배를 조사하였다.

세포주기 분석

배발생 캘러스의 성장 주기 별 세포의 활력을 조사하고자 세포의 주기를 분석하였다. 5일 간격으로 세포를 채취하여 petri-dish에 HR-A용액 (High resolution plant staining kit, Partec GmbH, Münster, Germany)을 0.5 mL 첨가한 후, 칼로 잘게 절단하여 핵을 추출한 다음 30 μm filter (Cell Trics™, Partec GmbH, Münster, Germany)를 사용하여 여과하였다. 실온에서 3분간 방치 후, HR-B용액 (High resolution plant staining kit, Partec GmbH, Münster, Germany)을 2 mL 첨가하여 염색한 후 Flow cytometry (PAS, Partec GmbH, Münster, Germany)를 이용하여 세포주기를 분석하였다.

체세포배 조직 관찰

체세포배의 발달 정도에 따른 조직검정을 위하여 Yeung (1999)의 방법에 따라 GMA section 을 하였다. 접종 밀도에 따라 발달된 체세포배를 채취하여 0.05 M의 phosphate buffer (pH 6.8)로 2.5%의 glutaraldehyde와 1.6%의 paraformaldehyde가 포함된 고정액에 24-48시간 동안 4°C에서 고정하였다. 그 다음 에탄올을 30, 50, 70, 80, 90, 95, 100%로 12시간 단위로 교환하여 탈수 시킨 후 진공 처리하여 식물체내의 공기를 제거하였고, 에탄올과 Technovit 7100 (Heraeus Kluzer, Germany)을 2:1, 1:1, 1:2의 비율로 각각 24시간씩 3차례 조직 내에 침투용액을 침투 포매시킨 후, 포매시킨 블록을 microtome (RM 2165, Leica, Nussloch, Germany) 으로 3 μm 두께로 단면을 절단하였다. Slide에 3차 증류수를 스포이드로 적당량 떨어뜨린 후 그 위에 절단된 조직을 올려놓고 50°C에서 건조 고정시켰다. 염색은 0.1%의 periodic acid와 shiff (PAS)용액에 각각 30분간 처리한 후 흐르는 물

Table 1 Effect of inoculum densities on the embryogenic cell growth after 3 weeks of suspension culture

Inoculum density (g/100ml)	Fresh wt. (g/L)	Dry wt. (g/L)	% of DW	Growth rate
0.05	4.60 e ^z	0.57 c	12.38 a	0.39 b
0.1	19.63 d	2.50 bc	12.69 a	0.89 a
0.5	31.33 c	4.27 b	13.63 a	0.25 c
1.0	37.43 c	5.13 b	13.72 a	0.13 d
5.0	82.10 b	9.67 a	11.79 a	0.03 de
10.0	122.50 a	11.37 a	9.20 b	0.01 e

^z Different letters within columns indicate significant differences at $p \leq 0.05$

에 5분 세척하고, toluidine-blue O (TBO) 용액에 5분간 염색 후 흐르는 물로 5분 세척하여 광학현미경 (DM R, Leica, Wetzlar, Germany) 하에서 50배로 체세포 배의 단면 조직을 관찰하였다.

통계처리

실험 결과는 통계분석용 프로그램 (SAS Institute, Cary, NC, U.S.A)을 이용하여 5% 유의수준에서 Duncan 다중비교로 유의성을 비교하였다.

결과 및 고찰

음나무 배발생 세포 생장에 적합한 초기 세포 접종 밀도를 조사한 결과 접종밀도가 증가할수록 배양 3주 후 최종 증식된 세포의 양이 증가하였다 (Table 1). 그러나 0.1, 0.5, 1.0 g/100 ml 세 처리구 사이에는 건물중의 경우 5% 수준에서 유의 차가 나타나지 않았다. 따라서 가장 효율적인 초기 세포 접종밀도를 알아보기 위하여 초기 접종량을 기준으로 배양 3주 후 증가된 세포의 비율 (세포 성장률)을 비교하였다. 그 결과 0.05 g/100 ml 에서 0.1 g/100 ml 까지는 세포 접종밀도와 비례하여 세포 성장률이 증가하여 0.1 g/100 ml 처리구에서 0.89/day로 가장 높은 값을 나타낸 후 감소하였다 (Table. 1). 따라서 음나무 세포배양의 경우 세포분열에 필요한 임계밀도는 0.1 g/100 ml 로 추정되었다. 초기 접종밀도가 0.1 g/100 ml 이하인 처리구에서는 세포분열이 활발히 이루어지지 않았고 이로 인해 낮은 세포 성장률을 나타낸 것으로 생각되었다. 반면 0.1 g/100 ml 이상의 배양밀도에서는 배양액 내의 세포 밀도가 지나치게 높아 배양세포의 성장과 노화가 빨리 이루어져 세포 성장률이 낮아진 것으로 추정되었다.

이와 유사한 연구로서 Akalezi 등 (1999)은 세포 접종밀도를 건물중 기준으로 1.5, 3, 4.5, 6 g/L으로 처리하여 인삼 세포를 배양한 결과 배양 26일 후 최종 증식된 세포의 성장률은 접종밀도가 높아질수록 증가하였으나, 세포 성장률은 3 g/L 처리구에서 0.12/day로 가장 높게 나타났다고 보고하였다. 이는 초기 접종밀도에 따라 배양기간 동안의 세포의 밀도 및 배양액 내에 존재하는 용존 가스들의 확산에 영향을 미쳐 궁극적으로 세포생장을 조절하는 효소들의 활성을 조절하기 때문으로 관찰되었다 (Akalezi 등 1999). 또한 배양액 속에 세포들이 지나치게 높은 밀도로 존

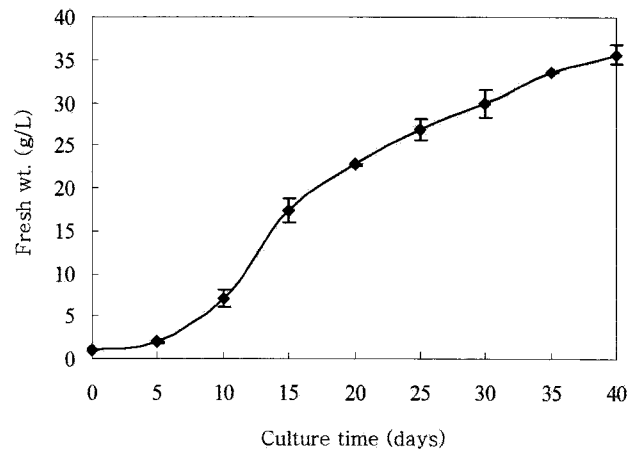


Figure 1. The growth pattern of embryogenic cells during 40 days of suspension culture

재할 경우 세포로의 산소 전달과 양분 전달 및 가스 확산에 필요한 배지의 회전이 충분히 이루어지지 않아 세포생장이 억제되는 결과를 가져온다 (Hu et al. 2001; Kanokwaree and Doran 1997). Contin 등 (1998)도 *Catharanthus roseus* 세포 배양 시 초기 접종밀도가 높을수록 세포의 최종 성장량은 증가하나 서로 다른 세포 성장률을 나타내므로 적절한 초기 접종밀도의 선정이 필요하다고 보고하여 세포 배양 시 접종밀도의 조절이 중요함을 시사하였다.

Table 1의 실험 결과를 바탕으로 음나무 배발생 세포의 성장변화를 5일 간격으로 총 40일간 조사하였다. 생체중은 배양 10일부터 증가하여 배양 15일 까지 급격히 증가하다가 이후 증가 폭이 다소 감소하였다 (Fig. 1). 이 같은 결과는 배양 15일 이후부터 세포 분열 능력이 감소되어 더 이상 세포분열이 이루어지지 않고 개개의 세포들이 배지로부터 수분을 흡수함에 따라 생체중이 증가하는 것으로 추정되었다. 생체중의 변화와 마찬가지로 세포의 성장을 또한 같은 경향을 보이면서 배양 15일째 0.147/day로 가장 높았으며, 이후 감소하는 경향을 보이다가 배양 후기로 갈수록 세포 성장율은 급격히 감소하였다. 또한 초기에 접종한 세포의 밀도가 두 배로 성장하는데 소요되는 시간(Td)은 4.71일로 나타났다 (Table. 2). 한편 배양 기간이 경과함에 따라 대체적으로 세포의 노화가 이루어져 세포가 점차 경화되고 갈색으로 변화하였는데 (data not shown), 이러한 결과는 세포가 일정량 증식된 다음 배지의 양분 부족 및 배양체

Table 2 Specific growth rate (μ) and doubling time (T_d) for embryogenic cells grown in suspension culture

Day	5	10	15	20	25	30	35	40
μ	0.104	0.122	0.147*	0.039	0.030	0.022	0.022	0.012

* Maximum growth rate (μ_{max}), $T_d = \ln 2 / \mu_{max} = 4.71$ (days)

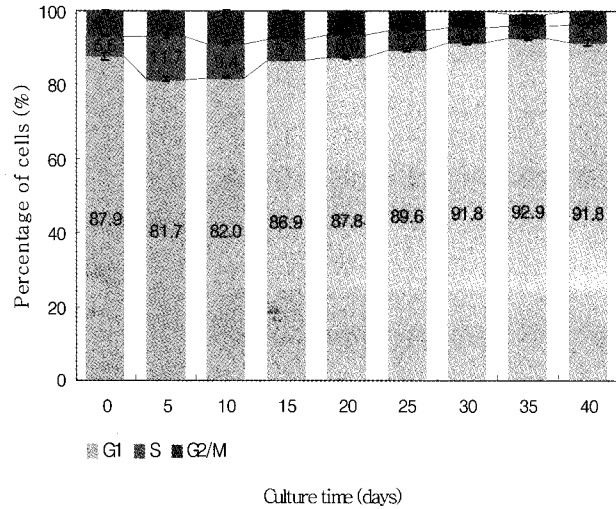


Figure 2. Time-dependant changes of three different periods of cell cycle

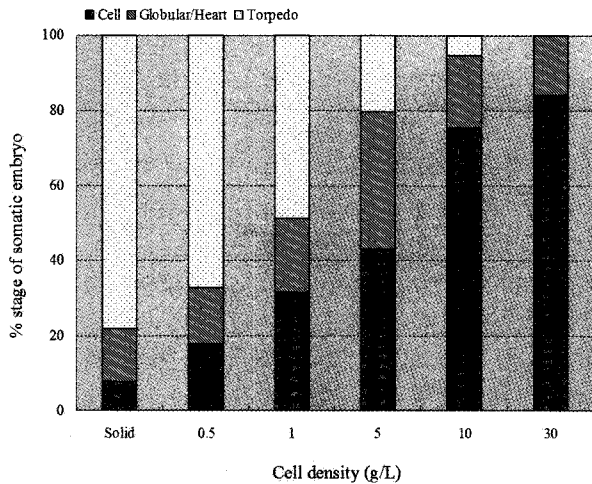


Figure 3. Changes of SE developmental stages depending on inoculum density

에서 기인한 독성물질의 집적 등으로 인해 세포의 노화가 이루어진 것으로 추정된다.

세포의 갈변화와 노화현상은 배지의 양분과 수분 흡수 장애에 따른 세포의 활력 감소를 의미하기 때문에 배양 주기별 세포 주기 (G1, S, G2/M)를 분석하였다 (Fig. 2). 그 결과 배양 기간에 따른 세포 주기의 변화가 명확하게 나타나 배양 5일째 G1 phase는 87.8%에서 81.7%로 감소하였고, S phase는 5.6%에서 11.7%로 두 배 증가하였으며 배양 15일 이후부터는 초기 세포 주기로 되돌아가면서 안정화 되었다 (Fig. 2). Winkelmann 등 (1998)은 *Cyclamen persicum*

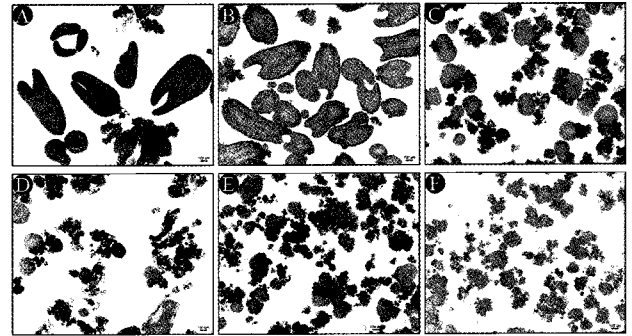


Figure 4. Histological observation of somatic embryo development depending on inoculum

A : Solid culture (0.01g/plate)

B-F : Suspension culture (B: 0.5, C: 1.0, D: 5.0, E: 10, F: 30 g/L)

의 체세포배 캘러스 증식 시 배양 1주일 안에 S기가 23%에서 46%로 두 배가 증가하였고 G0/G1기는 30%가 감소한다고 하여 본 실험과 유사한 결과를 보고하였다. 이상의 결과를 종합해 보면 으나무 배발생세포는 배양 초기 10일까지가 유도기에 달하고 그 후 5일 정도의 간격으로 증식기와 안정기를 거침을 알 수 있었다. 따라서 으나무의 현탁배양 시 배발생 세포의 빠른 성장으로 인한 갈변화 및 세포활력 저하를 최소화 시키기 위해서는 적어도 2주 정도의 배양주기로 계대배양이 이루어져야 한다는 것을 보여 주었다.

배발생 세포로부터 체세포배 발달을 위한 액체 현탁 배양 초기 세포 접종 밀도를 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 0.5 g/L 접종 시 65% 이상의 어뢰형 단계의 배를 얻을 수 있었고 1.0 g/L의 경우는 약 50%의 어뢰형의 배를 생산하였다. 반면 접종 밀도가 가장 높았던 30 g/L에서는 20% 미만의 구상형/심장형의 배가 관찰되었다. 접종 밀도에 따른 체세포배 발달 정도를 확인하기 위하여 조직을 관찰한 결과 배양 밀도가 높아질수록 체세포배 발달은 거의 이루어지지 않아 거의 80% 이상이 세포 단계에 머무르고 구상형/심장형의 배가 일부 관찰되었으나 어뢰형의 배는 전혀 발달하지 못했다. 30 g/L의 고밀도에서는 배발생 세포만 관찰되었을 뿐 체세포배 분화 단계의 세포는 전혀 관찰되지 않았다 (Fig. 4). 따라서 배양초기의 접종밀도가 많을수록 특히 어뢰형 배의 발달이 지연됨을 알 수 있었고 구형 및 심장형의 배는 초기 접종 밀도에 크게 영향 받지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 초기 세포 접종 밀도는 구형 및 심장형 배의 발달에는 영향을 주지 않으나 구상형/심장형의 배가 어뢰형으로 분화하는데 크게 영향을 미친다는 Osuga 등 (1993)의 연구 결과와 유사한 내용이다.

또한 배양 초기의 접종 밀도가 체세포배 발아에 미치는 영향을 조사한 결과, 어뢰형의 배가 가장 많이 유도된 배양밀도 (0.5 g/L)에서 체세포배의 발아체가 가장 많았으며 초기 접종 밀도가 높을

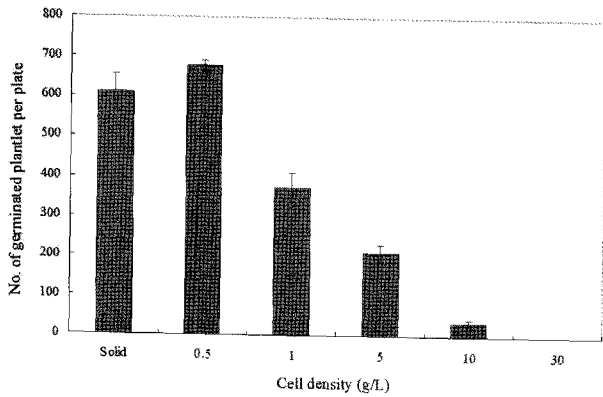


Figure 5. Alteration of the number of plantlets germinated from SEs depending on inoculum density

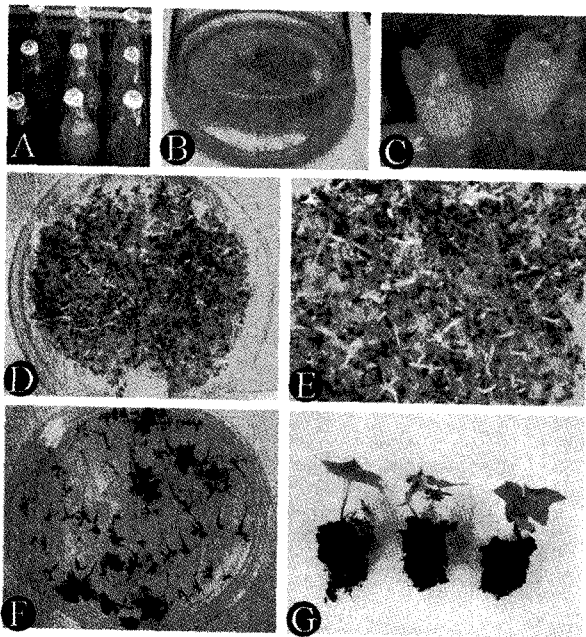


Figure 6. Cell culture and plant regeneration of *K. septemlobus* embryogenic cell

A- Proliferation of embryogenic cells in suspension culture; B- Somatic embryo induction from embryogenic cells; C- Somatic embryos at torpedo stage, D and E- Germinating somatic embryos; F- Converted plantlets, G- Acclimatized plantlets in artificial soil

수록 발아체는 감소하였다 (Fig. 5). 이 같은 결과를 대조구로서 실시한 고체 배양과 비교한 결과, 0.5 g/L 접종된 현탁 배양의 경우는 약 65%의 어뢰형의 배가 발달 한 반면 고체배양은 약 80%의 어뢰형 배가 유도되어 배발달은 고체배지에서 더 양호하게 이루어지는 것으로 나타났다 (Fig. 3). 그러나 발아 및 식물체의 재생은 고체 배양에 비하여 0.5g/L의 접종의 현탁 배양 조건에서 발아효율이 높게 나타나 적정 밀도 하에서 건전한 배발달을 이룬다면 직접 액체 배양을 통해 음나무의 효과적인 식물체 증식이 가능함을 보여주었다 (Fig. 6). 이상의 실험을 통해 액체 현탁 배양을 통한 음나무 배

발생 세포의 증식 및 식물체 생산이 가능함을 보여주었고, 향후 보다 scale up 된 생물반응기를 이용한 대량배양의 이용 가능성은 계속 연구가 필요한 상태이다.

적 요

본 실험은 음나무 배발생 세포의 증식 및 체세포배 발달을 위한 액체 현탁 배양조건 확립을 위해 수행되었다. 배발생 세포의 생장율은 접종 밀도가 증가할수록 감소하였다. 배발생 세포의 증식에 가장 효과적인 접종 밀도는 0.1 g/100 ml로서 이 농도에서 세포의 생장율이 가장 높았다. 배양기간에 따른 배발생 세포의 성장 패턴 및 세포 주기 (G1, S, G2/M) 분석 결과, 세포의 생장은 배양 5일 후부터 증가가 시작되어 15일 까지 급격히 성장하였으며 그 이후에는 점차 감소하였다. 배양 기간 별 세포 주기 (cell cycle)의 변화가 명확하게 관찰되어 배양 5일째 S기는 초기의 5.6%에서 11.7%로 두 배 정도 증가하였으며, 배양 15일 이후부터는 다시 초기의 세포 주기로 되돌아 가면서 안정화되는 것으로 나타났다. 따라서 음나무 배발생 세포의 현탁배양은 15일의 주기로 배양하는 것이 증식에 가장 효과적인 것으로 생각되었다. 한편 배발생 세포에서 체세포배의 유도는 배양초기의 접종 밀도가 중요한 것으로 나타났다. 0.5 g/L의 낮은 밀도로 접종 시에는 65% 이상의 어뢰형 배가 유도된 반면 접종 밀도가 높아질수록 어뢰형으로의 배발달은 급격히 감소하였다. 초기의 접종 밀도가 증가할수록 특히 어뢰형 배의 발달은 지연되었으나 구형 및 심장형 배의 유도는 초기 접종밀도에 영향을 받지 않았다. 이상의 실험결과로 음나무 액체 배양 시 초기 접종 밀도를 조절함으로써 배발생 캘러스의 증식 및 체세포배를 효과적으로 유도할 수 있었으며 이는 체세포배 생산을 위한 배양 기간의 단축이 가능함을 보여주는 결과이다.

인용문헌

- 채영복, 김완주, 지옥표, 안미자, 노영주 (1988) 한국유용식물자원 연구편람. 한국화학연구소 pp 122
- Akalezi CO, Liu S, Lig QS, Yu JT, Zhong JJ (1999) Combined effects of initial sucrose concentration and inoculum size on cell growth and ginseng saponin production by suspension culture of *Panax ginseng*. Proc Biochem 34:639-642
- Chakrabarty D, Yu KW, Paek KY (2003) Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). Plant Sci 165:61-68
- Choi YE, Kim JW, Kim YS, Yoon ES (1999) High frequency of plant production via somatic embryogenesis from callus or cell suspension cultures in *Eleutherococcus senticosus*. Annals Bot 83:309-314
- Contin A, Heijden R, Ten Hoopen HJG, Verpoorte R (1998) The inoculum size triggers tryptamine or secologanin biosynthesis in a *Catharanthus roseus* cell culture. Plant Sci 139: 205-211
- Hu WW, Yao H, Zhong JJ (2001) Improvement of *Panax notoginseng*

- cell culture for production of ginseng saponin and polysaccharide by high density cultivation in pneumatically agitated bioreactors. *Biotechnol Prog* 17:838-846
- Kanokwaree K, Doran PM (1997) Effect of inoculum size on growth of *Atropa belladonna* hairy roots in shake flasks. *J Ferment Bioeng* 84:378-381
- Kim YS (2002) Production of ginsenosides through bioreactor cultures of adventitious roots in ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). PhD thesis, Chungbuk National University, Cheongju
- Lee JS, Kim CK, Kim IS, Lee EJ, Choi HK (2006) In vitro regeneration of *Phragmites australis* through embryogenic cultures. *J. Plant Biotechnol* 8(1):21-25
- Masako A, Hiroji S (2002) Induction of proembryos in liquid culture increases the efficiency of plant regeneration from *Alstroemeria* calli. *Plant Sci* 163:475-479
- Moon HK, Kim SH, Kim BK (2002) Micropropagation of *Kalopanax pictus* Nakai via axillary bud culture. *J Kor Forest Soc* 91:775-780
- Moon HK, Kim YW, Lee JS, Choi YE (2005) Micropropagation of *Kalopanax pictus* tree via somatic embryogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 41:303-306
- Moon HK, Park SY, Kim YW, Kim SH (2008) Somatic embryogenesis and plantlet production using rejuvenated tissues from serial grafting of a mature *Kalopanax septemlobus* tree. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 44:119-127
- Murashige T, Skoog FA (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15:473-479
- Osuga K, Kamada H, Komamine A (1993) Cell density is an important factor for synchronization of the late stage of somatic embryogenesis at high frequency. *Plant Tiss Cult Lett* 10:180-183
- Paek KY, Chakrabarty D (2003) Micropropagation of woody plants using bioreactor. In: Jain SM, Ishii K (eds). *Micropropagation of woody trees and fruits*. Kluwer Academic Publisher, The Netherlands. pp 735-756
- Shohael AM, Chakarabarty D, YU KW, Hahn EJ, Paek KY (2005) Application of bioreactor system for large-scale production of *Eleutherococcus sessiliflorus* somatic embryos in an air-lift bioreactor and production of eleutherosides. *J Biotechnol* 120:228-236
- Thiruvengadam M, Varisai Mohamed S, Yang CH, Jayabalan N (2006) Development of an embryogenic suspension culture of bitter melon (*Momordica charantia* L.). *Sci Hort* 109:123-129
- Winkelmann T, Sangwan RS, Schwenkel HG (1998) Flow cytometric analyses in embryogenic and non-embryogenic calus lines of *Cyclamen persicum* Mill.: relation between ploidy level and competence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 17:400-404
- Yeung EC (1999) The use of histology in the study of plant tissue cultures systems-some practical comments. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 35:137-143
- Yeoung YR, Lee MH, Kim BS, Kim HK, Kim JH (2001) Seed germination and softwood cutting technique of *Kalopanax pictus* Nakai. *Kor J Plant Res* 14:53-59
- Zhong JJ, Bai Y, Wang SJ (1996) Effects of plant growth regulators on cell growth and ginsenoside saponin production by suspension cultures of *Panax quinquefolium*. *J Biotechnol* 45:227-234
- Zhu ML, Yang JW, Yu Y, Liu SJ (2007) Efficient organogenesis and plantlet regeneration in the timber species *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 43:449-455

(접수일자 2008년 11월 25일, 수리일자 2009년 1월 10일)