

국내 임목류 기내증식 연구현황 및 전망

문흥규 · 김용욱 · 박소영 · 한무석 · 이재선

A review of forest trees micropropagation and its current status in Korea

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

Received: 6 November 2010 / Accepted: 18 November 2010
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Plant micropropagation techniques include bud cultures using apical or axillary buds, organogenesis through callus culture or adventitious bud induction, and somatic embryogenesis. In Korea Forest Research Institute (KFRI), the first tissue culture trial in woody plant was initiated from the bud culture of hybrid poplars (*Populus alba* x *P. glandulosa*) in 1978. Since then several mass propagation techniques have developed from conifer and hardwood species, resulting in allowing practical application to Poplars, Birches and some oak species. In addition, useful micropropagation and genetic resources conservation techniques were established in some rare and endangered tree species including *Abeliophyllum distichum*. Among various *in vitro* propagation techniques, somatic embryogenesis is known to be the most efficient plant regeneration system. Since the first somatic embryo induction was reported in *Tilia amurensis* by KFRI in 1986, various protocols for direct or indirect somatic embryogenesis systems have developed in conifer and hardwood species including *Larix leptolepis*, *Pinus rigida* x *P. taeda* F1, *Kalopanax septemlobus* and *Liliodendron tulipifera*, etc. However, most of these technologies have been developed using juvenile tissues, i.e. immature zygotic embryos or mature embryos. Therefore it has been difficult to directly application to tree breeding program due to their unproven genetic background. Recently

remarkable progresses and new approaches have been achieved in mature tree somatic embryogenesis. In this article we reviewed several micropropagation techniques, which have been mainly developed by KFRI and recent international progresses.

서론

산림수종은 생물다양성의 중요한 구성 요소이자 고대부터 인간 삶의 필수요소가 되어왔다. 또한 나무는 음식, 연료, 목재 및 기타 가치 있는 비목재산물의 재생 가능한 원천이기도 하다. 최근 이러한 산림자원이 기후변화로 인해 급속히 파괴되고 있다. 이에 반해 우리의 삶에 필요한 목재의 수요는 계속 증가되고 있다. 산림면적의 감소는 생물 다양성 보존의 위협이 되며 이러한 감소는 결국 인간 삶의 질을 떨어뜨리게 된다. 산림자원은 목재급원이라는 기능뿐만 아니라 환경 보존 측면에서도 보존해야 할 가치가 크다. 건강한 산림을 유지하고 필요한 산물을 얻기 위하여 전통적인 방법의 육종, 개량 및 여러 가지 번식 기술이 개발되어 왔다. 그러나 산림수종이 가지고 있는 고유한 특성, 즉 느린 성장, 장수성, 자가불화합성, 고도로 이형접합화 된 식물이라는 점 때문에 개량이 어렵다. 이로 인해 전통적인 육종 방법으로는 나무의 효과적인 유전적 개량에 한계가 있다 (Girt et al. 2004; Merkle and Dean 2000).

이러한 단점을 극복하기 위해 클론 혹은 영양번식 기술이 사용되고 있다. 이러한 무성번식 기술은 우성의 상가적 그리고 epistatic 유전적 효과를 지닌 우수한 유전자형을 선발할 수 있다는 장점이 있다 (Park 2002). 식물조직배양 및 형질전환 기술은 제한된 시간 내에 산림수종의 효과적인 증식과 개량을 가능하게 한다. 지난 10여 년

H. K. Moon (✉) · Y. W. Kim · S. Y. Park · M. S. Han
국립산림과학원 산림생명공학과
(Division of Forest Biotechnology, Korea Forest Research Institute,
Suwon, Gyeonggido 441-847, Republic of Korea)
e-mail: hkmooon@forest.go.kr

J. S. Yi
강원대학교 산림환경과학대학
(College of Forest and Environment Sciences, Kangwon National
University, Chuncheon, Kangwondo 200-701, Republic of Korea)

간 미세증식 기술과 더불어 산림생명공학 기술의 비약적인 발전이 지속되어 왔고 이러한 기술적 발전은 전통적인 육종의 한계를 벗어나 임목육종의 새로운 패러다임으로 자리 잡고 있다 (Park et al. 1998; Merkle and Dean 2000; Sutton 2002; Girdl et al. 2004; Merkle and Nairn 2005; Nehra et al. 2005; Pijut et al. 2007; Harfouche et al. 2010).

국내 임목류 미세증식 (micropropagation) 연구는 1978년 경북대학교의 박용구교수 (2010 정년퇴임)가 일본에서 유학을 마치고 귀국하여 국립산림과학원 (당시 임목육종연구소)에서 실험을 시작한 것이 효시이며, 1980년부터 경상과제의 시험제목으로 정상적인 연구가 시작되었다. 임목의 미세증식 기술개발은 대부분 국립산림과학원에서 이루어졌고, 경북대학교, 강원대학교, 충북대학교 및 동국대학교에서 부분적으로 이루어졌다. 국립산림과학원에서는 김재현 연구관이 실험실의 체계를 만드는데 산과 역할을 하였고, 초기 시험연구의 대상수종으로는 분열능력이 높은 포플러류의 아배양 (Bud culture)에 의한 대량증식에 연구의 중점을 두었다 (Kim et al. 1981; Kim et al. 1982b; Noh et al. 1988). 침엽수는 리기테다소나무의 배배양을 중심으로 시작되었고 (Kim et al. 1982a) 이후 호도나무 등 경제적으로 유망한 유실수와 희귀수종의 대량증식 기술개발이 주로 이루어 졌으며 특히 체세포배발생 (somatic embryogenesis) 기술개발 이후 산림생명공학 분야의 연구영역이 급진적으로 확대되었다 (Lee et al. 1986b; Lee et al. 1987a, b; Lee et al. 1988; Lee et al. 1989; Kwon et al. 1990; Youn et al. 1992a; Moon et al. 1994; Lee et al. 1995; Park et al. 1998; Kim and Moon 2005; Kim et al. 2006; Kim and Moon 2007a, b).

본문에서는 그 동안 국내에서 발표된 산림수종의 미세증식 기술을 국립산림과학원에서 수행된 내용을 중심으로 고찰하고, 이와 관련된 문제점 및 이를 해결하기 위한 방법, 특히 상변화 (phase change) 등과 같은 몇 가지 방법을 소개하였다. 또한 산림수종의 기내 미세증식 기술과 산림생명공학 분야 연구발전에 관한 최근 자료의 고찰을 통해 이 분야 연구에 관한 필요한 정보를 제공하고자 한다.

기관형성 (Organogenesis)

임목류 조직배양 연구의 가장 보편적인 방법은 아배양이나 액아배양을 통한 우수 클론의 대량증식이며 이 분야 연구성과가 가장 실용화에 접근되어 있다. 외국에서는 사시나무류, 유칼리나무류 및 자작나무류 등 몇 수종에 대하여 이미 실용화가 이루어 졌으며, 1990년 이후에는 우수한 클론의 증식, 즉 영양계 입엽 (clonal forestry) 실현을 위한 조직배양 기술의 중요성이 인식되어 이 분야 연구가 크게 활성화되었다 (Park et al. 1998; Park 2002). 국립

산림과학원에서는 소나무 등의 침엽수종을 대상으로는 배배양과 연속배양의 기술개발에 역점을 두어 실험이 진행되었으나 증식효율이 매우 낮고 더욱이 기내생장이 느려서 실용화에는 어려움이 있는 것으로 지적되었다 (Kim et al. 1982b; Kim and Park 1987). 그러나 이러한 침엽수 조직배양 연구는 1990년 대 이후 미국, 캐나다 및 뉴질랜드 등 산림선진국에서 체세포배 발생을 이용한 묘목생산 기술이 임목개량의 육종 프로그램에 응용되면서부터 실용화에 접근할 수 있었다 (Sutton 2002).

활엽수의 조직배양은 1980년 연구의 초기부터 시작된 포플러류의 기초적인 연구를 토대로 여러 수종에서 배양 조건의 적정화를 통한 대량증식 기술이 개발되었다 (Kim et al. 1981, 1982b; Kang and Moon 2001). 상수리나무 등 참나무류의 액아배양, 특히 재유령화 기술을 도입한 수형목의 기내증식 기술이 개발되어 무성번식에 어려움이 있는 참나무류의 조직배양에 의한 대량번식의 가능성이 제시되었으며 (Lee et al. 1985; Moon et al. 1987; Hyun et al. 1991; Moon et al. 1991b; Moon et al. 1993a, b; Moon et al. 1997a), 박달나무, 거제수나무 등 자작나무류의 유묘는 물론 성숙목의 배양기술이 개발되어 수형목의 대량증식의 기반을 조성하였다 (Hong et al. 1986; Lee et al. 1986a; Lee et al. 1990; Moon et al. 1991a; Kwon et al. 1992; Kwon et al. 1994; Moon and Moon 1999). 이러한 활엽수의 조직배양에는 1980년 Lloyd와 McCown (1980)이 개발한 WPM (Woody Plant Medium) 배지를 주로 쓰고 있다. 이밖에도 피나무 (Youn et al. 1988; Youn et al. 1989; Youn and Ohba 1990), 들메나무 (Youn et al. 1992b) 등에서 기내배양 기술이 개발되어 기내 대량증식의 기반을 조성하였고, 희귀 및 멸종위기 수종의 보존 및 증식기술로도 유용하게 쓰일 수 있었다 (Lee et al. 1995). 산림생명공학과에서는 흰배롱나무 (Lee et al. 1987a), 산개나리 (Moon et al. 1997b), 히어리나무 (Moon et al. 2002a; Kang et al. 2003), 미선나무 (Moon et al. 1999), 망개나무 (Youn et al. 1992a) 등의 수종에서 아배양을 통한 효율적인 묘목생산 기술을 개발하였으며, 특히 망개나무는 29~50년생의 맹아지를 이용한 배양으로 재유령화 기내 증식이 가능함을 보여주었다.

한편 호도나무와 같은 유실수종은 묘목의 가격이 비싸고 기존의 접·삼목의 방법으로는 효율적인 묘목생산이 어려워 그에 대한 대안으로 조직배양이 시작되었다. 유사한 이유로 밤나무, 호두나무 (Lee et al. 1988; Kwon et al. 1990), 대추나무 (Lee et al. 1986c; Moon et al. 1994), 왕머루 (Lee et al. 1989) 등의 유실수와 민초피나무 (Son et al. 1995), 산사나무 (Moon et al. 1990), 마가목 (Moon 1993) 등의 특용수 조직배양 기술이 개발될 수 있었다. 호도나무의 조직배양은 Driver와 Kuniyuki (1984)에 의해 개발된 DKW라는 배지가 주로 쓰이고 기타 수종은 일반적으로 WPM 혹은 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지를 사용하

였다. 그러나 이러한 많은 연구에도 불구하고 중요한 유실수에 대한 조직배양은 초피나무 등 한 두 종 이외에는 실용화하는데 여전히 어려움이 있는 것으로 나타났다.

1990년대 이후의 조직배양은 선발목을 대상으로 한 재유령화 (rejuvenation), 회귀 및 멸종위기 수종의 번식 및 체세포배 유도에 의한 대량증식에 중점을 두고 진행되었다 (Kwon et al. 1992, 1994; Moon et al. 1997b; Moon et al. 1999; Moon et al. 2006). 재유령화는 유묘로의 반복 접목 및 강도 높은 전정과 별목을 통한 맹아지 유도를 통해 실시되었고, 회귀수종에는 주로 아배양 기술이 사용되었다.

아배양 (Bud culture)

목본류의 조직배양에서 가장 보편적으로 사용하는 조직은 눈 (bud), 특히 액아나 신초지의 정아를 사용한다. 최근의 기내배양 연구는 주로 체세포배형성을 통한 방법이 보편화되고 있으나, 기존의 증식법이 효율적이지 못한 수종이나, 선발목의 증식에 있어 반복접목 등의 방법으로 재유령화 된 조직의 배양에 아배양을 주로 이용한다. 브라질이나 인도네시아와 같은 열대림 조성에 있어서는 선발개체의 영양번식에 의한 클론임업이 상업적인 목적으로 실행되고 있다. 특히 유칼리속 수종에는 아배양 증식 기술이 보편적으로 적용되고 있다. 국립산림과학원에서

Table 1 Micropropagation via various organ or tissue culture at KFRI

Year	Species	Explant*	Result	Reference
1981	Hybrid poplar	ABS	Plantlet production	Kim et al.
1982a	Hybrid pine	ZE	Plantlet production	Kim et al.
1982b	Poplar	ABS	Plantlet production	Kim et al.
1985	<i>Paulownia tomentosa</i>	ABS	Plantlet formation	Lee
	<i>Quercus acutissima</i>	ABS	Shoot formation/rooting	Lee et al.
1986	<i>Betula costata</i>	ABA	Plantlet formation	Hong et al.
1986b	<i>Juglans sinensis</i>	ABS	Shoot formation/rooting	Lee et al.
1986c	<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i>	ABS	Shoot formation/rooting	Lee et al.
1987b	<i>Actinidia arguta</i>	ABA	Shoot formation	Lee et al.
1987	<i>Quercus acutissima</i>	ABS	Shoot proliferation/rooting	Moon et al.
1988	<i>Populus davidiana</i>	ABA	Shoot formation/rooting	Noh et al.
	<i>Tilia cordata</i>	ABA	Shoot formation/rooting	Youn et al.
1989	<i>Tilia cordata</i>	ABS	Shoot formation/rooting	Youn et al.
	<i>Vitis amurensis</i>	ABA	Shoot proliferation/rooting	Lee et al.
1990	<i>Tilia cordata</i>	ABA	Plant production/clonal effect	Youn and Ohba
1990	<i>Juglans sinensis</i>	ABS	Rooting	Kwon et al.
	<i>Betula davurica</i>	ABA	Artificial seed	Lee et al.
	<i>Crataegus pinnatifida</i>	ABA	Shoot proliferation/rooting	Moon et al.
1991	<i>Quercus acutissima</i>	ABA	Plantlet formation	Hyun et al.
1991b	"	ABS	Shoot proliferation	Moon et al.
1991a	<i>Betula platyphylla</i>	ABA	Shoot proliferation	Moon et al.
1992	<i>Machilus thunbergii</i>	St	Plantlet formation	Kim and Kang
	<i>Betula schmidtii</i>	ABA	Plant production	Kwon et al.
1993	<i>Sorbus commixta</i>	ABA	Shoot proliferation	Moon
1993a,b	<i>Quercus acutissima</i>	St	Shoot proliferation	Moon et al.
1994	<i>Betula costata</i>	ABA	Plant production	Kwon et al.
1995	<i>Zanthoxylum piperitum</i>	ABA	Shoot proliferation/acclimation	Son et al.
1997	<i>Quercus acutissima</i>	ZE	Proliferation/rooting	Kim et al.
1997a	"	ABA/ABS	"	Moon et al.
2001	<i>Populus euphratica</i>	IP	"	Kang and Moon
1999	<i>Betula davurica</i>	ABA	"	Moon and Moon
2002b	<i>Kalopanax pictus</i>	ABS	"	Moon et al.
2003	<i>Eucalyptus pellita</i>	"	Shoot proliferation/acclimation	Moon et al.
	<i>Corylopsis gotoana</i> var. <i>coreana</i>	ABS	"	Moon et al.
2004	<i>Stewartia koreana</i>	ZE	Adventitious shoots formation	Son et al.
2006	<i>Eucalyptus pellita</i>	St	LED effect on growth	Kim and Moon
2008b	<i>Salix pseudolasiogyne</i>	Nd	Plant production	Park et al.
2010	<i>Castanea crenata</i>	ZE/ABS	Growth enhancement	Park et al.

*ABS-axillary bud of seedling, ABA-axillary bud of adult tree, St-shoot, Nd-node, IP-In vitro plantlets, ZE-zygotic embryo

그간 수행한 아배양의 주요결과는 Table 1과 같다.

참나무류 수형목 4수종 37가계의 기내배양을 실시하였다 (Moon et al. 1993b). 유묘임에도 불구하고 수종간 및 가계간에 뚜렷한 증식차이를 보여주었고, 배양과정에서 정단괴저가 흔히 나타났다. 상수리나무는 유묘에 반복 접목된 줄기의 사용 혹은 통나무의 맹아지를 사용하여 기내증식 가능성을 보였으나 배양이 잘되는 클론 선발이 무엇보다 중요한 것으로 나타났다.

자작나무류는 성숙목의 번식도 가능하며, 물박달나무 성숙목의 대량증식 (Kwon et al. 1992)과 참다래 x 다래 교잡종의 대량증식 기술을 확립하였고 (Lee et al. 1987b; Kim and Moon 2005), 내염성 수종인 유프라티카 포플러의 아배양 및 부정아 유도를 통한 증식 (Cheong et al. 1997; Cheong and Moon 1999), 그리고 오동나무의 부정아 유도를 통한 증식기술을 확립하였다 (Bergmann and Moon 1997). 한편 희귀 및 멸종위기 수종의 기내배양을 통해 산개나리 (Moon et al. 1997b), 금선개나리, 떡버들 (Lee et al. 1995), 미선나무 (Moon et al. 1999) 등에서 묘목생산을 통한 자생지 복원이 가능함을 보여주었다 (Table 2).

상수리나무 (*Quercus acutissima*)

유묘 및 수형목을 대상으로 액아배양을 통한 기내증식을 시험하였다. 5가지 배지 가운데 WPM 배지에서 줄기 분화 및 생장이 가장 양호하였다. 사이토키닌 중에서는 3.0 mg/L zeatin에서 줄기 분화 및 성장 효과가 있었으나 대체로 BA 처리가 다경유도 및 성장에 주효하였다. BA와 zeatin 혼용처리가 증식 및 성장에 더욱 시너지 효과를 보였으며, 적정농도는 0.5 mg/L BA, 0.05-1.0 mg/L zeatin이었다. 기내발근은 1/2 GD 배지 (Greshoff and Doy 1972)에 0.5 mg/L IBA 처리로 90% 이상 발근되고, 인공상토에서 70% 이상

생존하였다. 어린대목에 2회 접목된 27개 수형목 클론을 배양한 결과 4개 클론에서 증식 가능성을 보여 클론에 따른 차이를 크게 나타냈다. 가장 좋은 반응을 보인 전북 17호 클론은 증식 후 90% 이상 기내 발근되어 재유령화 되었음을 보여 주었다. 이상의 결과는 상수리나무 수형목의 기내증식을 위해서 보다 많은 클론을 대상으로 재유령화 처리가 필요하고 증식이 가능한 클론을 선발해야 될 필요성을 보여주었다 (Moon et al. 1997a).

물박달나무 (*Betula davurica* Pall.)

50년생 물박달나무 성숙목을 재료로 수관하부에서 당년생 가지를 채취하여 액아배양을 실시하였다. 증식은 DKW 배지에서 양호하였고, 줄기의 증식에는 액아배양이, 생장에는 정아배양이 양호하게 나타났다. 발근은 IBA보다 NAA가 효과적이었으며, 1/2 DKW 배지에 1.0 mg/L NAA 처리로 80% 발근되었다. 기내증식 된 줄기는 기외삽목의 방법으로도 효과적으로 발근되어 물박달나무 성숙목의 기내증식이 가능함을 보여주었다 (Moon and Moon 1999).

읍나무 (*Kalopanax septemlobus*)

2년생 읍나무의 액아배양을 통해 배지 및 사이토키닌 처리별 효과를 시험하였다. 잎의 생장은 MS 배지에서, 엽병의 생장은 WPM 배지에서 양호하였고 kinetin 처리로 다경유도가 가능하였으나 절편 당 2-3개의 줄기가 유도되어 증식효율은 저조하였다. 증식된 줄기는 기외삽목의 방법으로 60%까지 발근되었다 (Moon et al. 2002b).

유칼리나무 (*Eucalyptus pellita*)

유칼리의 실생묘 액아 배양은 DKW, 1/2 MS 및 WPM 배지의 사용으로 줄기증식이 가능한 것으로 나타났다. 그중

Table 2 Micropropagation for rare and endangered woody species at KFRI

Year	Species	Explant*	Result	Reference
1987a	<i>Lagerstroemia indica</i>	AB	Shoot proliferation/rooting	Lee et al.
1992a	<i>Berchemia berchemiaefolia</i>	AB	Shoot proliferation/rooting	Youn et al.
1995	<i>Forsythia koreana</i> <i>Salix hallaisanensis</i>	AB	Shoot proliferation	Lee et al.
1996	<i>Melia azedarach</i> var. <i>japonica</i>	ImZE	Somatic embryogenesis	Moon and Kim
1997b	<i>Forsythia saxatilis</i>	AB	Shoot proliferation/plantlet production	Moon et al.
1999	<i>Abeliophyllum distichum</i>	AB	Shoot proliferation/acclimatization	Moon et al.
2002a	<i>Corylopsis gotoana</i> var. <i>coreana</i>	AB	Shoot proliferation/acclimatization	Moon et al.
2003	<i>Albizia kalkora</i>	IR	Adventive shoot induction	Park et al.
2004	<i>Stewartia koreana</i>	ImZE	Adventive shoot induction	Son et al.
2006	<i>Oplopanax elatus</i>	ImZE	Somatic embryogenesis/plantlet production	Moon et al.
2008	<i>Echinophora koreensis</i>	AB	Plantlet production	Moon et al.
2010	<i>Empetrum nigrum</i>	IP	Shoot proliferation	Han et al.

*AB-axillary bud, IP-in vitro plantlet, IR-in vitro root, ImZE-immature zygotic embryo

DKW 배지에서 다경유도 및 생장이 양호하여 유칼리 기내증식의 적정배지로 선정할 수 있었다. 증식된 줄기의 발근은 0.2 mg/L 및 0.5 mg/L NAA 농도에서 100% 발근되었고, 특히 0.2 mg/L 처리시 유근 형성이 좋았다. 발근묘는 상토로 이식하여 3주간 순화 후 100% 활착되고, 균일하고 비교적 빠르게 성장하였으며 2개월 후에는 묘고 40 cm 이상으로 성장하였다 (Moon et al. 2003; Park et al. 2005, 2008a).

산개나리 (*Forsythia saxatilis*)

약 3년생 산개나리 신초액아 절편을 2종의 사이토키닌 (BA, Kinetin, Zeatin)이 포함 된 MS 배지에 배양하여 그 농도별 증식효과를 조사하였다. 줄기 증식은 사이토키닌 종류별 혹은 농도별 효과가 뚜렷하지 않았으나 zeatin 처리시 줄기 및 잎의 발달에 효과가 있었다. Kinetin 처리시에는 줄기 성장과 함께 모든 절편에서 발근이 이루어졌다. 줄기는 기내에서 3년 이상 계대배양을 통해 정상적으로 증식이 가능하였고, 발근 후 산지에 이식하여 정상적으로 성장하였다 (Moon et al. 1997b).

미선나무 (*Abeliophyllum distichum*)

신초지 액아를 절편으로 MS 배지에 세 종류의 사이토키닌을 처리하여 증식을 시험하였다. 줄기유도는 BA가 효과적으로 나타났고, 생장은 zeatin 처리가 양호하였다. Kinetin은 고농도 (2.0 및 5.0 mg/L)에서 증식효과가 있었으나 그 효과는 BA, zeatin에 비해 저조하였다. 증식된 줄기는 1/2 DBM2 배지에 IBA 처리로 가능하였고, 인공상토에 이식하여 100% 활착되었고 정상생장을 나타냈다. 이상의 결과로 미선나무의 액아배양을 통한 기내증식 가능성이 보여주었다 (Moon et al. 1999).

히어리 (*Corylopsis gotoana* var. *coreana*)

1년생 및 10년생 액아를 절편으로 MS배지에 0.5~3.0 mg/L zeatin, 0.2 mg/L BA 처리로 줄기증식이 양호하였다. 1년생이 10년생보다 전반적으로 증식 및 생장이 양호하였으며, 배양 6 개월 후에는 10 년생에서도 매월 3배의 증식이 가능하였다. 기내발근은 1년생 97%, 10년생 62%를 나타내었고, 토양이식 시 1년생 배양묘는 67%, 10년생은 48% 생존하여 모수령에 따른 차이를 나타냈다 (Moon et al. 2002a).

왕자귀나무 (*Albizia kalkora*)

기내발아 후 10일이 지난 유묘 뿌리를 절편으로 신초를 유도하여 기내증식 체계를 확립하였다. Thidiazuron (TDZ) 0~4.5 μ M과 NAA, 2,4-D 등이 첨가된 B5 배지에서 배양 8주 후 60~93%의 절편에서 신초가 형성되었다. 그러나 자엽, 하배축, 잎 등의 절편체에서는 뿌리조직에 비해 신초 형성이 매우 저조하였다. TDZ 처리배지에서 유도된 신초는 1.44 μ

M GA₃이 첨가된 배지에서 57.5%가 식물체로 발달하고, 생장조절제 무처리 배지에서 발근되어 정상적인 형태로 성장하였다 (Park et al. 2003).

시로미 (*Empetrum nigrum* var. *japonicum*)

액아 마디를 절편으로 MS 및 WPM 배지에 BA를 처리하여 줄기 유도 및 발근에 미치는 배지와 호르몬의 효과를 조사하였다. 다경유도는 zeatin이 BA보다 다소 효과적인 반면 줄기생장에는 BA가 zeatin보다 양호한 것으로 나타났다. 증식줄기의 기내발근은 1/2 MS 배지보다 WPM 배지가 효과적으로 5.0 mg/L IBA 처리시 53% 까지 발근되었다. 발근묘는 인공배양토에서 93% 이상 활착되었다 (Han et al. 2010).

이상에서 보여준 몇 가지 산림수종의 아배양 기술은 효율적인 기내 증식수단으로 사용될 수 있음을 보여주고 있다. 그러나 많은 경우 산림수종이 지니는 유전적인 고유한 특성으로 인해 기내배양을 어렵게 만들고 있으며 (McCown 2000), 배양과정에서 나타나는 문제들 이를테면 오염제거, 폐놀성 화합물의 분비, 과산화 현상, 발근의 어려움과 동일한 수종에서도 반응에 차이를 보이는 개체목에 따른 유전자형의 효과로 인해 배양조건의 적정화가 어렵다. 최근에는 생물반응기의 활용, 광독립배양의 도입 등으로 이러한 문제점 들이 극복되고 있다 (Kitaya et al. 2005).

캘러스배양 및 부정아 유도

유용한 유전자를 원하는 식물에 도입하기 위해서는 대상 수종의 재분화 체계 확립이 선행되어야 한다. 유용 유전자의 탐색과 식물 형질전환을 위한 벡터가 다수 개발되었으나 임목류에서 형질전환이 주로 포플러류에 한정되어 이루어지는 이유는 목적하는 다양한 수종의 재분화 체계가 확립되지 못하였기 때문이다. 국립산림과학원에서는 여러 수종에서 체세포배 형성을 통한 식물체 재생 기법이 확립되고 있어 앞으로는 이 분야의 형질전환 연구가 기대된다. 그간 수행된 캘러스 및 부정아유도의 주요결과는 Table 3과 같다.

체세포배발생 (Somatic embryogenesis)

1990년대에 들어와 임목류에서 가장 보편화된 조직배양 기술은 체세포배 유도를 통한 증식이다 (Gupta et al. 1991). 침엽수는 1985년 독일가문비에서, 활엽수는 1965년 Sandalwood에서 처음 발표되었다 (Reviewed by Rao et al. 2000). 국립산림과학원의 산림생명공학과에서는 1986년 피나무의 미숙배 배양으로 체세포배를 처음 유도하였으며, 다음해에는 완전한 식물체를 얻을 수 있었다 (Kim

Table 3 Micropropagation via adventitious bud induction from tissue or callus at KFRI

Year	Species	Explant*	Result	Reference
1987	<i>Pinus densiflora</i>	AB	Shoot proliferation	Kim and Park
1999	<i>Populus euphratica</i>	IP	Shoot proliferation	Cheong and Moon
2001	<i>Populus euramericana</i>	IP	Plant regeneration	Kang and Moon
2005	Hybrid kiwi	SC	Plant regeneration	Kim and Moon
2005b	<i>Eucalyptus pellita</i>	IL/IR	Adventive shoot induction	Kim et al.
2006	"	IL/Hy	Adventive shoot induction	Kim et al.
2007b	Hybrid kiwi	IL	Plantlet regeneration	Kim and Moon
2008b	<i>Salix pseudolasioogyne</i>	Nd	Shoot proliferation, rejuvenation	Park et al.
2008a	<i>Eucalyptus pellita</i>	IP	Shoot proliferation	Park et al.
2010	<i>Eucalyptus pellita</i>	Nd	Bioreactor culture	Kim et al.

*AB-axillary bud, Hy-hypocotyl, IL-In vitro leaf, IP-In vitro plantlet, IR-In vitro root, Nd-node, SC-suspension cells

Table 4 A review of micropropagation via somatic embryogenesis at KFRI

Year	Species	Explant*	Result	Reference
1986	<i>Tilia amurensis</i>	SE	Somatic embryo induction	Kim et al.
1988	<i>Juglans regia</i>	ImZE	Somatic embryo induction/plant regeneration	Lee et al.
1991	<i>Hibiscus syriacus</i>	FOs	"	Lee et al.
1992a	<i>Quercus acutissima</i>	mZE	"	Kim et al.
1992b	<i>Hibiscus syriacus</i>	mZE	Somatic embryo induction	Kim et al.
1994	<i>Q. acutissima</i>	ImZE	Somatic embryo induction/plant regeneration	Kim et al.
	<i>Zizyphus jujuba</i>	ImZE	"	Moon et al.
1995b	<i>Quercus variabilis</i>	ImZE	Somatic embryo induction	Kim et al.
1996	<i>Melia azedarach</i> var. <i>japonica</i>	ImZE	Somatic embryo induction/plant regeneration	Moon and Kim
1996	<i>Tilia mandshurica</i>	ImZE	Somatic embryo induction/plant regeneration	Moon and Youn
1997	<i>Q. acutissima</i>	ImZE	"	Kim et al.
1998	<i>Aralia elata</i>	WB	"	Moon et al.
1999	<i>Larix leptolepis</i>	ImZE	"	Kim et al.
1999	<i>Aralia elata</i>	WB	"	Moon and Youn
2003	<i>Liriodendron tulipifera</i>	ImZE	"	Lee et al.
2005a	<i>Aralia elata</i>	Pt/L	"	Kim et al.
2005	<i>Eleutherococcus koreanum</i>	IR	"	Park et al.
	<i>Kalopanax pictus</i>	ImZE	"	Moon et al.
	<i>Liriodendron tulipifera</i>	ImZE	Somatic embryo induction	Son et al.
2006	<i>Zizyphus jujuba</i>	ImZE	Somatic embryo induction/plant regeneration	Kim et al.
2006	<i>Oplopanax elatus</i>	ImZE	"	Moon et al.
2007a	<i>Pinus rigida</i> × <i>P. taeda</i>	ImZE	"	Kim and Moon
2007c	<i>Larix leptolepis</i>	ImZE	"	Kim and Moon
2007	<i>Magnolia abovata</i>	ImZE	"	Kim et al.
2008	<i>Picea koraiensis</i>	ImZE	"	Li et al.
2010	<i>Pinus contorta</i>	ImZE/WB	"	Park et al.
	<i>Liriodendron tulipifera</i>	SE	Bioreactor culture	An et al.

*AB-axillary bud, FOs-floral organs, IR-in vitro root, ImZE-immature zygotic embryo, mZE-mature zygotic embryo, L-leaf, Pt-petiole, SE-somatic embryo, WB-winter bud

et al. 1986; Kim et al. 1988). 호두나무는 미숙배를 재료로 체세포배의 유도과 발아를 시험하였으나 완전한 식물체는 얻지 못했다 (Lee et al. 1988). 그러나 무궁화의 성숙배 혹은 화사 (filament)로부터 체세포배를 유도하여 완전한 식물체까지 얻었다 (Lee et al. 1991; Kim et al. 1992, 1995). 또한 상수리나무의 성숙배를 절편으로 BA와 IBA를 처리한 MS, WPM 배지에서 체세포배를 유도하였으며, BA가

처리된 WPM 배지에서 발아 후 몇 본을 포트묘까지 육성하였다 (Kim et al. 1992a, 1994, 1997). 이 같은 연구결과는 1995년 이후 조직배양의 가장 진보된 핵심 기술로 자리 잡은 체세포배 연구의 귀중한 토대를 이루게 되었으며, 땃대추 (Moon et al. 1994; Kim et al. 2006), 무궁화 (Kim et al. 1992b, 1995a), 상수리나무 (Kim et al. 1994, 1997), 굴참나무 (Kim et al. 1995b), 찰피나무 (Moon and Youn 1996),

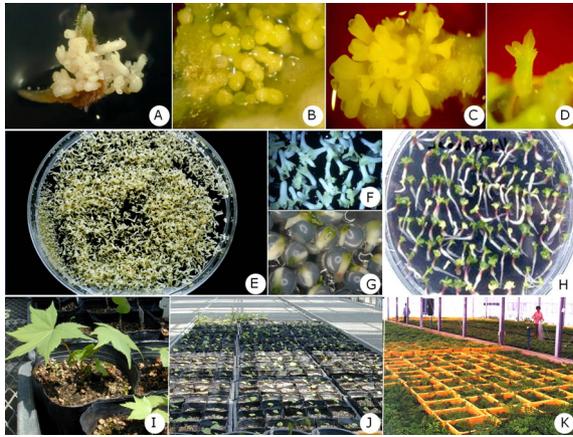


Fig. 1 Plant production via somatic embryogenesis (SE) from various tree species at KFRI [A. Direct SEs formation from zygotic embryo of *Eleutherococcus divaricatus* var. *chiisanensis*; B-D. Globular (B), torpedo (C) and conversion stage (D) of SEs in *Tilia amurensis*; E-F. Synchronized SEs by sieving in *Aralia elata*; G-J. Artificial seeds using SEs (G), plantlet conversion (H) and acclimatization (I and J) in *Kalopanax septemlobus*; K. Emblings of *Aralia elata*]

멀구슬나무 (Moon and Kim 1996) 등에서 기술개발이 이루어졌다 (Fig. 1).

1990년대 이후 조직배양에 의한 기내증식의 현저한 특징은 체세포배 유도에 의한 증식기술의 보편화이다. 이 기술은 초저온 저장기술과 연계하여 임목에서도 비교적 단기간에 유전적 개량을 가져올 수 있는 새로운 기술로 보고되고 있으며 (Park 2002), 150여 종의 임목류에서 체세포배 형성이 보고되었다 (Dunstan et al. 1995). 전술한 바와 같이 체세포배형성 기술은 대량증식의 측면에서 매우 효율적일 뿐만 아니라, 초저온저장에 의한 생식질보존이 가능하고, 형질전환의 좋은 재료가 된다. 우리 과학원에서도 1995년 이후 체세포배 유도기술을 이용한 증식기술이 여러 유용한 수종에서 보편적으로 적용되어 왔으며, 최근에는 기내배양이 매우 어려운 소나무 등에서도 체세포배 유도를 통한 묘목생산이 가능하게 되었다.

절편체는 대부분 유시성 (juvenility)이 높은 미숙배로부터 배발생 조직을 유도하고 있다. 절편으로 미숙배를 사용하는 것은 침엽수 혹은 활엽수종에서 동일한 현상으로 나타나지만 기내배양이 까다로운 침엽수종에 있어서는 미숙배의 발달시기 중 특정한 기간에만 배발생이 가능한 time window가 있다. 따라서 수분과 수정이 된 다음 일정한 시기별로 배양을 실시하여 배발생이 가능한 적정시기를 찾아야 한다. 한편 활엽수종에 있어서도 절편은 배발생능이 높은 미숙배를 사용하고, 수종에 따라서는 화기조직이나 유묘의 신초를 사용하고 있다. 두릅나무는 배발생능이 좋아서 유묘의 신초나 동아 (winter bud)로부터 배발생이 가능하였으며, 최근에는 약 50년생 모수의 근맹아지로부터 캘러스 및 배발생 캘러스를 유도하여 묘목

을 생산한 바 있다. 배지는 주로 MS 배지를 사용하고 있으며, 백합나무에서는 1/2 LM 배지 (Lindemann et al. 1970)를, 그리고 소나무 및 리기테다소나무에서는 1/2 Lepoivr (LP, Aitken-Christie 1984) 혹은 P6 (Teasdale et al. 1986) 배지를 사용하였다 (Kim and Moon 2007a). 적정배지는 수종, 유전자형, 배양절편에 따라 다를 수 있다. 배발생 조직의 유도에 있어 성장조절제의 처리는 필수적이다. 대부분의 활엽수종은 2,4-D의 단독처리가 주효하며, 수종에 따라서는 저농도의 싸이토키닌을 혼용 처리한다. 멀구슬나무는 특이하게 BA 단독처리로 배발생 조직이 유도되었으며 (Moon and Kim 1996), 상수리나무의 미숙배로부터 배발생조직의 유도는 BA와 IBA의 혼용처리로 가능하였다 (Kim et al. 1997).

일단 배발생 조직이 얻어지면 계대배양을 통해 배발생능이 있는 조직만을 유지, 증식하는 것이 매우 중요하다. 이러한 배발생 조직은 세포계통에 따라 체세포배의 유도, 발아 및 식물체 형성이 다르게 나타나므로 다른 세포주와 섞이지 않도록 주의 깊게 다루어야 한다. 배발생 조직이 증식된 다음의 단계는 이러한 조직으로부터 체세포배를 유도하는 것이다. 일반적으로는 배발생 조직의 유지에 첨가시킨 오옥신을 제거한 기본배지로 옮겨 체세포배를 유도하지만 침엽수종의 경우 고농도의 ABA를 첨가하는 것이 보통이다.

ABA는 체세포배의 조기발아를 억제하고, 균일한 체세포배를 유도시켜 준다. 많은 경우 체세포배는 자엽이 붙어있는 것, 단자엽 혹은 다자엽으로 형성된 것, epicotyl이 형성되지 못한 것 등이 나타나는바 ABA의 처리는 이러한 기형의 체세포배 유도를 억제한다. 또한 ABA의 처리와 함께 보통 고농도의 삼투압제를 사용하고, 기본배지에 glutamine 등의 아미노산을 첨가하기도 한다. 수종에 따라서는 polyethylene glycol (PEG)를 첨가하며 PEG 4000으로 농도범위 7~10%을 주로 사용한다. 체세포배가 유도되면 다음의 단계는 체세포배를 정상적으로 발아시켜 식물체로 유도하는 것이다. 활엽수종의 체세포배, 특히 오갈피류의 체세포배 발아시에는 GA₃의 처리가 효과적으로 보고되고 있으며, 음나무 및 땃두릅나무의 체세포배 발아에 있어서도 GA₃ 처리가 필수적이었다 (Moon et al. 2005; Moon et al. 2006) (Fig. 1H).

민두릅나무 (thornless *Aralia elata*)

동아 및 신초 유조직을 재료로 MS 기본배지에 2,4-D를 처리하여 배발생 캘러스를 유도하고, 일련의 배양과정을 적정화하여 체세포배 유도, 발아 및 식물체 형성을 통한 묘목 생산을 체계화하였다. 1999년부터 2002년까지 포트묘로 10만 본 이상을 산림청 산하 기관으로 보급하였다. 이상의 결과는 조직배양묘의 실용화라는 측면에서 의의가 있다 (Moon et al. 1999) (Fig. 2C).

상수리나무 (*Quercus acutissima*)

수정 후 약 5주부터 일주 간격으로 미숙배를 채취하여 glutamine, proline과 성장조절제 BA와 IBA가 처리된 MS 배지에서 체세포배를 유도하였다. 체세포배는 BA가 처리된 WPM 배지에서 발아 및 식물체로 재생하였다. 총 210본의 재분화체 중 120본을 토양에 이식하여 34%가 활착되었다. 이 결과는 기내배양이 까다로운 상수리나무의 체세포배 유도를 통한 식물체 재생의 흥미 있는 결과로, 체세포배의 발아 및 재분화율 제고는 계속 연구할 필요가 있다 (Kim et al. 1994; Kim et al. 1997).

음나무 (*Kalopanax septemlobus*)

8월 중순 미숙배를 재료로 2,4-D가 처리된 MS 배지에서 암배양으로 배발생 캘러스를 유도하였다. 체세포배는 ABA 처리된 배지에서 가능하였고, 정상적인 배 발아 및 재분화를 위하여 저농도의 활성탄 처리가 필요하였다. 체세포배의 발아과정에서 2차 체세포배를 형성하였고, 정상적인 배발생 경로를 통해 식물체가 형성되었다. 재분화된 식물체는 인공배양토에서 95% 이상 활착되어 포지에 이식 후 정상성장 하였다 (Moon et al. 2005).

낙엽송 (*Larix leptolepis*)

자엽단계의 접합자 배를 절편으로 LM 배지 등 3종의 배지에서 배발생 조직을 유도하였다. 미숙배의 발달단계에 따라 배발생율이 크게 달랐으며, 7월말에 채취한 미숙배에서 배발생율이 가장 양호하였다. ABA는 배의 조숙화 발아 억제에 효과가 있었다. 이 방법으로 총 400본 이상의 체세포배 유래 식물체를 생산하였다 (Kim et al. 1999).

소나무 (*Pinus densiflora*)

약 5,700 개 이상의 미숙종자를 배양하여 10개의 배발생 계통을 얻었다. 7월 5일에 채취한 종자에서 가장 양호한 결과를 얻었고 0.36%의 배발생 조직을 유도하였다. 배발생 세포로부터 체세포배의 유도는 세포계통에 따라 차이를 보였으며, 80 μ M ABA, 0.2M maltose, 1.0% gellan gum 배지에서 체세포배를 유도하여 자엽단계의 배로 성숙하였다. 이러한 성숙배는 0.2% gellan gum의 1/2 LM 배지에서 발아 되었는데, 배성숙배지의 ABA 농도, 활성탄이 첨가된 발아배지의 종류에 따라 0~34%까지 발아되었다 (Kim et al. unpublished data).

리기테다소나무 (*Pinus rigida* x *P. taeda*)

6월 11일부터 7월 30일까지 약 1주 간격으로 미숙종자를 채취하여 절편으로 사용하였다. 총 3,400개 이상의 종자로부터 5개의 배발생 조직을 얻어 평균 0.14%의 빈도를 보였다. 13.5 μ M 2,4-D와 4.4 μ M BA를 첨가한 P6 배지에서만 배발생 조직이 유도되었으며, 7월 3일에 채취한 종

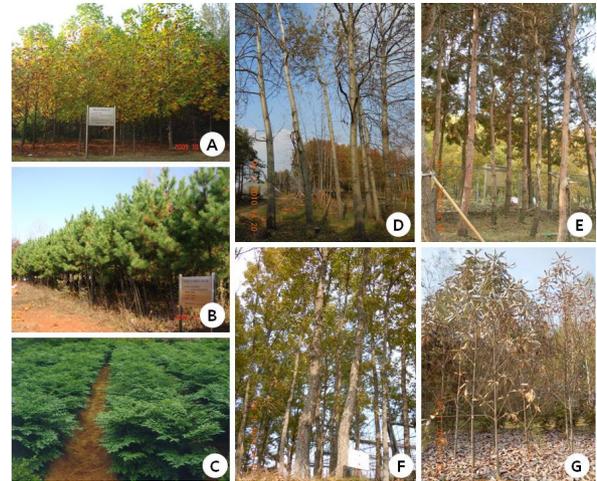


Fig. 2 Growth performance of several tree species produced via micropropagation at KFRI (A. 5-yr-old yellow poplar emblings; B. 9-yr-old hybrid pine emblings; C. 8-month-old thornless *Aralia elata* emblings; D. 20-yr-old hybrid poplar produced via axillary buds; E. 15-yr-old *Pinus densiflora* produced via mature zygotic embryos; F. 15-yr-old *Quercus acutissima* produced via axillary buds; G. 5-yr-old *Magnolia abovata* emblings)

자에서 0.55%의 가장 높은 배발생 조직이 유도되었다. 조직검정 결과 이 시기의 접합자배는 전배 (proembryos)에서 초기 자엽단계로 전이되는 상태로 나타났다. 배발생 조직은 세포질이 충만하고 잘 발달된 배병 (suspensor)을 나타내어 비배발생 조직과 구별되었다. 얻어진 5개의 배발생 조직은 증식율의 차이가 있었으나 모두 체세포배를 형성하였으며, 80-150 μ M ABA 처리가 필요하고, 고농도 gellan gum (1%)에서 성숙되었다. 체세포배는 성장조절제 무처리 조건에서 정상적인 배발달 경로를 통해 발아되었다 (Kim and Moon 2007a). 재분화된 어린 식물체는 인공상토에서 순화하여 묘목으로 육성하였다 (Fig. 2B).

상변화 (Phase change)

임목류 미세번식의 가장 큰 어려움은 성숙목의 분화능이 현저히 낮다는 것이다. 그러나 대부분의 수종에서 중요한 특성들은 성숙기 (adult stage)에 도달해야만 발현된다. 나무가 나이가 들고 성숙해지면 영양 번식체의 발근력이 점차 감소하기 때문에 산림수종의 무성번식 (조직배양을 포함)은 상변화를 잘 이해할 필요가 있다 (Greenwood 1987, 1995).

Greenwood (1987)는 성숙상에 이르는 4가지 발달 단계를 제안하였다. 이것은 형태형성 등의 독특성에 의해 특징 지을 수 있다. 배발생단계, 유묘단계 (유시상과 밀접하게 관련), 천이단계 (유시기에서 성숙기로 넘어가는 단계로 생식능을 얻는 단계를 포함) 및 성숙상 단계 (생식능이 최고에 달하고, 묘고나 직경성장 능력은 최저가 됨) 등이다.

상변화와 관련하여 몇 가지 정의를 숙지할 필요가 있다. 상변화란 배 (embryo)로부터 시작하여 유시기와 성숙기를 거쳐 식물이 발달해가는 과정에 관련한 생리적 변화이다. 노화 (aging)는 나이들 혹은 가령 (加齡)을 뜻하며 식물의 개체발생적 혹은 연대기적 나이가 들어가면서 나타나는 표현형적 변화를 뜻한다. 개체발생적 노화 (ontogenetic aging)란 배로부터 출발하여 성숙기로 발전해가는 과정에서 나타나는 노화를 뜻한다. 이와 비슷한 용어로 연대기적 노화 (chronological aging)가 있는데 이것은 실생묘이든 영양번식체이든 어떤 개체 식물의 일생을 통하여 지속적으로 나타나는 노화를 의미한다. 이것의 특징은 종자기원이나 영양번식 기원에 관계없이 그 식물체가 생장한 기간에 의해 결정되는 노화를 뜻한다. 보다 자세한 설명은 다음에 기술하였다.

상변화에는 담쟁이나 유칼리나무의 경우처럼 때때로 잎 모양이 특징적으로 변하기도 한다. 유시 특성을 지닌 조직을 이용하면 성숙목의 번식이나 배양이 촉진되는데 이것은 검증된 성숙한 우량한 나무 (유전자형)의 성공적인 번식을 위해 매우 중요한 내용이다. 위치효과 (position effect)를 고려한다면 유시특성은 대부분의 나무의 뿌리에 가까운 기저부에 있다. 이곳은 개체 발생적으로 어린 조직이 있는 곳이다. 반면 성숙된 조직은 개체 발생적으로 늙은 그러나 연대기적으로는 젊은 (발달이나 생리적 요소의 기능으로 볼 때) 상태인 식물의 외면에 존재한다. 나무의 맨 꼭대기 상단부의 정아나 줄기 조직이 이에 해당한다고 볼 수 있다. 유시조직을 얻기가 어려우면 노화의 역전 (reversion)이나 부분적 재유령화 (partial rejuvenation) 처리가 도움을 줄 수 있다. 야외에서는 가지치기, 전정, 근맹아지의 이용, 어린대목으로의 접목, 성장조절제 살포, 황화처리 및 수경배양을 통한 부정아유도, 잠아 (epicormic bud)유도 등이 있다. 기내 방법으로는 잠아가 있는 절편의 배양, 반복된 계대배양, 유시대목으로 미세접목, 부정아유도, 체세포배형성, 수평배양 (horizontal culture) 등을 시도할 수 있다 (Hartmann et al. 2002).

비록 상변화의 기작은 아직 잘 알려지지 않은 상태이다. DNA methylation에서의 변화가 노화와 관련이 있다는 연구와 여러 가지 형태적, 생화학적, 분자수준의 마커를 이용하여 서로 다른 발달단계 상 (phase)에 대한 특성이 구명되고 있다. 유시성에 대한 임의적 마커 유전자가 담쟁이의 성숙화 과정에서 동정되었는데 dihydroflavonol reductase가 그것이다. 사과에서는 MADS-box 유전자가 개화의 시작을 통한 생식발달에 관여하고 (van der Linden et al. 1999), 배 (pear)에서는 DNA-methyltransferase 유전자가 동정되었다 (Giannino et al. 1999).

개체발생적 노화 (Ontogenetic aging)

노화는 식물 발달에 있어 두 가지 별개의 의미를 지닌다.

개체발생적 노화란 유식물이 배발생기, 유시기, 천이기를 거쳐 성숙상태로 발달해 가면서 나타나는 상변화이다. 유묘에서 개화기까지의 천이 (transition)는 연년식물에서 매우 빠르게 일어나지만 나무에서는 20년 이상이 걸리기도 한다. 이러한 천이 기간을 며칠 혹은 몇 년의 시간 개념으로 표시하는 것이 편리하기도 하지만 상변화는 정단 분열조직에서 발달한 마디수로 결정하는 것도 좋은 방법이다. 특정한 마디에서 생산된 눈 (bud)은 그것의 개체 발생적 나이와 관련하여 마디의 epigenetic potential을 지니고 있다. 예로써 식물의 기부에서 만들어진 눈 (bud)은 보다 유시적이라고 말할 수 있는데 그것은 유시상 (juvenile phase)의 발달기 동안에 처음 형성되었기 때문이다.

상변화는 잎 모양이나 개화능력과 같은 특정단계의 형태적 특징으로써 가장 잘 구분된다. 식물에 따라서는 유묘에서 성숙상으로 발달하면서 형태적 변화가 분명치 않은 경우가 있다. 이러한 것을 homoblastic이라 부른다. 다른 식물에서는 나이를 먹으면서 특성변화에 있어서 분명한 표현형적 변화가 있는데 이것을 heteroblastic이라 부른다 (Hartmann et al. 2002 and there in cited papers). 유시 혹은 성숙상에서 차별적으로 발현되는 여러 유전자와 유전자 산물이 동정되고 있는데 이러한 것은 상발달의 분자적, 생화학적 마커로 사용될 수 있다 (Park et al. 2010).

연대기적 노화 (Chronological aging)

이러한 노화는 실생묘이든 영양번식체이든 관계없이 어떤 개체 식물의 일생을 통하여 지속적으로 나타난다. 이 노화의 특징은 식물체가 생장한 실제 연수 (year)에 의해 결정된다. 좋은 생장조건의 어린 식물체는 생장이 왕성하고, 건강하여 꽃이 많이 피게 되지만 나이가 들면서 생장은 점차로 감퇴한다. 개화 및 결실이 많을 지라도 새로운 생장은 감소하는 경향이 있으며 식물은 결국 노쇠하여 죽게 될 것이다. 노쇠기로 들어간 식물은 재 번식시켜 왕성하고 생산적인 상태로 되돌아 갈 수 있다. 여러 가지 외부적 처리 즉, 전정, 질소시비, 관수, 해충이나 질병 조절, 기타 일반적으로는 관리경영을 잘해서 재유령화를 촉진 시킬 수 있다.

상변화와 영양번식 (Vegetative propagation)

개체 발생적 노화 (ontogenetic aging)는 영양번식에서 매우 중요하다. 왜냐하면 성숙목의 정아나 측아를 영양번식시키면 그 차대 식물에서도 계속해서 개체 발생적 노화가 나타나기 때문이다. 예로써 모본의 식물이 유시상이라면 그 영양번식 차대는 유시상을 나타낼 것이고 차후 생장을 통해 성숙상으로 바뀌게 되어 안정화된 성숙 생식상으로 들어간다. 실생묘의 성숙된 가지를 이용한 영양 번식체는 결국 S₁세대에서 실생묘의 표현형이 재생되지 않을지 모른다. 나무의 아래쪽 기부에서 만들어진 번식체는 생물

학적으로 유시성의 경향을 띤다. 나무의 꼭대기나 외면에서 취한 절편체는 생물학적으로 차대에서 성숙상을 띤다. 유시와 성숙상 중간 단계에서 취한 영양 번식체는 유시 혹은 성숙상을 띤 수 있다. 임업인들은 이러한 변이를 관찰하고 새로운 단어를 만들어 냈는데 식물을 *ortet*로 S_1 식물을 *ramet*이라 부르게 되었다. 이러한 변이는 유전적 변화에 기인하는 것이 아니라 영양번식 과정에서 지속되는 성숙상에서의 후생적변이 (epigenetic variation)에 기인한다.

유시 및 성숙상의 특성

영양 번식체가 계속 생장하고 세대가 지속되면 클론 개체식물의 성숙상은 안정화 되고 유시상의 특성이 사라진다. 과실, 종자, 꽃을 목적으로 한 대부분 클론 품종은 성숙 cycle의 성숙상에 달하면 동일한 특성을 나타낸다. 대부분 개체 식물체는 꽃이 피고 영양 발달기 이후에는 상당히 빠르게 과실이 맺힌다. 그리고 유시상과 관련된 바람직하지 못한 특성도 사라지게 된다. 안정화된 성숙 클론의 영양상 (vegetative phase)을 “유시적” (juvenile)이라고 부르는 것은 적절치 않다.

유시상에서 성숙상으로의 상변화 촉진

많은 목본수종에서 유묘가 성숙하여 개화기에 달하려면 오랜 시간이 필요하다. 임목류 육종 프로그램은 주로 유묘를 이용하는데, 이러한 경우 유시기가 길어서 방해를 받는다. 유시기 (juvenile stage)는 여러 유전자에 의해 조절될 수 있기 때문에 육종과 생산주기를 단축시킬 수 있다. 그리고 나무의 생장이나 발달 역시 환경적인 제어로 조절될 수 있다. 생장과 발달 역시 환경적 조절로 조절될 수 있다. 가장 중요한 개념은 가능하면 빨리 유시기를 지나서 성숙상의 나무로 자라도록 하는 것이다. 예를 들어 자작나무 유묘는 겨울에 온실에서 계속 장일장하에서 키웠을 때 단일장으로 키운 것 보다 유시기를 지나 성숙기로 가는 기간이 훨씬 빠른 것으로 나타났다. Crab apple은 일반적으로 4년에 개화가 시작되지만 온실에서 계속 키웠을 때 발아 후 13개월에 2.5~3.0 m에 달하고 개화가 시작되었다 (Zimmermann 1971). 생장억제, 환상박피, 왜성 대목으로 접목, 기타처리 등으로 조기 개화가 가능하다. 그러나 이러한 방법은 나무가 천이기 혹은 성숙기에 도달했을 때에만 유용하다. 때문에 유묘는 생장을 촉진시켜 유시상을 벗어나도록 해야만 한다.

유시상의 선택과 유지

영양번식을 위해 모본 재료를 유시상으로 유지시키는 것은 발근력을 증가 시키는 중요한 요인이다. 여러 가지 방법이 사용될 수 있는데, 나무의 근부에 있는 유시 특성을

나타내는 줄기의 선택, 근맹아 혹은 epicormic shoot의 이용, 돌기조직 (sphaeroblasts)의 선택, 산울타리 (hedge rows) 처리, 연속적인 삽목재료의 유지, 지표면 가까이의 삽수 줄기를 이용한 stool-shoot 상 (bed)의 조성 등이다 (Moon et al. 1991a).

재유령화 (Rejuvenation)

자연상태에서 식물이 성숙상에서 유시상으로 역전되는 것은 생식 (sexual)에 의해서 혹은 apomictic 시기에 종자의 발달로 이루어진다. 한편 성숙상의 유시상으로의 역전은 영양 재료로써도 가능하다. 세코이아 혹은 유칼리 나무에서는 성숙된 가지를 어린 대목에 연속적으로 접목시키면 성숙상에서 유시상으로 역전되었다. 조직배양에서 정단 분열조직을 계속해서 계대배양시키면 유시상으로 바뀐다. 생장호르몬의 처리도 효과적인데 GA의 처리는 담쟁이의 유시생장을 유도하였고, ABA 처리는 또 다시 성숙상으로 역전되었다 (Hartmann et al. 2002).

이상에서 언급한 식물의 상변화와 관련한 몇 가지 내용은 성공적인 미세번식 특히 성숙목의 번식에 있어 중요한 내용이 된다. 대부분 목본류는 성숙목이 되어야 바람직한 특성이 나타나므로 성숙목의 번식을 위해서는 상변화에 관련한 이러한 특성을 잘 이해할 필요가 있다. 적극적인 방법으로는 야외에서 반복 접목이나 고강도의 전정과 같은 여러 가지 재유령화 처리를 실시하고, 기내배양 조건의 최적화와 더불어 여러 가지 스트레스처리 (고농도 생장조절제, 삼투압제, 고·저온처리, 기아처리, 박편배양 등)를 통해 선발목의 미세번식이 가능할 것이다 (von Aderkas and Bonga 2000). 최근 여러 침엽수 및 활엽수에서 성숙목을 재료로 한 체세포배 유도과 다양한 형질전환체의 활용이 보고되고 있는데 이러한 결과는 전통적인 산림수종의 육종과 개량을 촉진시켜 목재의 생산성을 크게 제고시키는 방법이 될 것이다 (von Aderkas and Bonga 2000; Harfouche et al. 2010).

결론

산림수종의 기내배양 기술은 기존의 육종프로그램의 보조수단 혹은 촉매수단으로 유용하게 사용될 수 있다. 일반적으로 대부분의 나무는 장수성이고, 수체가 크며, 개화기까지 수년 혹은 수십 년이 소요되고, 성숙목이 되어야 유용한 형질특성이 나타나고, 환경적인 제어가 곤란하여 육종에 어려움이 많다. 그러나 앞서 언급했듯이 미세번식 기술은 산림수종의 육종에 있어 효율적인 번식수단이 될 수 있으며 성숙목을 대상으로 한 번식기술의 개발은 선발에 의한 개량효과를 크게 높일 수 있다. 열대림 속성수종으로 육성임업과 클론임업의 주요수종으로

각광 받는 유칼리나무는 이미 성숙목의 번식기술 개발로 개량효과를 크게 높이고 있다. 하지만 그동안의 목본류를 대상으로 이루어진 대부분의 기내증식 프로토콜이 유시재료를 사용한 것이기 때문에 선발목 등 성숙목에 직접 적용하기 어려운 문제점이 있다. 최근에는 성숙목의 번식기술에 대한 그동안의 노하우와 새로운 기술의 적용으로 이러한 문제점들이 점차 극복되고 있다 (Bonga et al. 2010; Park et al. 2010). 성숙목의 배양은 보다 유시적인 재료의 선택 이를테면 근부의 재료를 사용, 근맹아지 사용, epicormic shoot를 이용할 수 있으며, 재유령화의 방법으로는 어린 대목으로의 반복접목, 성장조절제 전처리, 황화처리, 강도 높은 전정, 산울타리 조성 (hedging), 삼목 발근, 여러 가지 스트레스 처리를 통한 기내배양, 기내 미세접목 기술이 적용될 수 있다. 특히 암술 및 수술을 포함하는 화기조직과 같은 기관은 성숙목 클로닝의 좋은 재료가 된다. 이러한 재료의 선택은 절편 채취의 최적 시기를 결정해야하고 한편으로는 분화능이 좋은 개체 (유전자형)를 선별해야 한다. 최근 우수한 형질을 가진 성숙목의 기내배양 체계확립을 위해 다양한 기초연구가 이루어지고 있다 (Park et al. 2010). 이러한 체포배 유도 기술의 적용이 침·활엽수의 여러 수종에서 시도되어 좋은 결과를 얻고 있다. 체세포배 유도기술은 형질전환의 좋은 재료가 되며, 초저온저장 등 생식질 보존의 좋은 재료도 된다. 산림수종, 그 중에서도 용재 수종의 기내번식을 위한 체세포배 기술의 개발은 산림과학 연구에서 계속 중요한 위치를 차지할 것으로 보인다.

인용문헌

- Aitken-Christie J (1984) Micropropagation of *Pinus radiata*. The Plant Propagator 30:9-11
- An CH, Yi JS, Kim YW, Moon HK (2010) Somatic embryo germination and the related biochemical changes of *Liriodendron tulipifera* by bioreactor immersion time. J Korean For Soc 99:423-431
- Bergmann BA, Moon HK (1997) *In vitro* adventitious shoot production in *Paulownia*. Plant Cell Rep 16:315-319
- Bonga JM, Klimaszewska K, von Aderkas P (2010) Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. Plant Cell Tiss Org Cult 100:241-254
- Cheong EJ, Moon HK (1999) Light, cytokinins and explant's position on adventitious bud induction from the leaf segments of *Populus euphratica* Olive. J For Sci 62:92-98
- Cheong EJ, Moon HK, Kwon YJ, Youn Y, Noh ER (1997) *In vitro* shoot proliferation and ex vitro rooting of *Populus euphratica* Olive. Res Rep For Gen Res Inst Korea 33:81-86
- Driver D, Kuniyuki A (1984) *In vitro* propagation of Paradox Walnut rootstock. HortScience 19:507-509
- Dunstan DI, Tautorus TE, Thorpe TA (1995) Somatic embryogenesis in woody plants. In: *In Vitro Embryogenesis in Plants*. pp471-538. (ed. TA Thrope). Dordrecht: Kluwer Academic Pub
- Giannino D, Ticconi C, Frugis G, Mele G, Florio S, Santini L, Cozza R, Bitonti MB, Innocenti AM, Mariotti D (1999) Characterisation of juvenile and adult stages in woody species by means of ddRT-PCR markers and genes from heterologous species. Congress on "Application of Biotechnology to Forest Genetics" in Vitoria-Gasteiz, Spain, 22-25 September 1999. Book of Abstracts
- Girl CC, Shyamkumar B, Anjaneyulu C (2004) Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. Trees 18:115-135
- Greenwood MS (1987) Rejuvenation of forest trees. Plant Growth Regul 6:1-12
- Greenwood MS (1995) Juvenility and maturation in conifers: current concepts. Tree Physiol 15:433-438
- Greshoff PM, Doy CH (1972) Haploid *Arabidopsis thaliana* callus and plants from anther culture. Aust J Biol Sci 25: 259-264
- Gupta PK, Timmis R, Mascarenhas AF (1991) Field performance of micropropagated forestry species. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 27:159-164
- Han MS, Park SY, Moon HK, Kang YJ (2010) Micropropagation of a rare tree species, *Empetrum nigrum* var. *japonicum* K. Koch via axillary bud culture. J Korean For Soc 99:568-572
- Harfouche A, Meilan R, Altman A (2010) Tree genetic engineering and applications to sustainable forestry and biomass production. Trends in Biotechnol-842 (In press)
- Hartmann HT, Kester SE, Davis Jr FT, Geneve RL (2002) Plant propagation - Principles and Practices (seventh edition). Prentice Hall Press pp 880
- Hong SH, Shim SY, Park HS, Kwon SW, Lee SJ (1986) *In vitro* plantlet regeneration from adventitious buds induced on cutting of peeled twigs of *Betula costata* Traut. Res Rep Inst For Gen Korea 22:35-39
- Hyun YI, Moon HK, Lee SK (1991) *In vitro* of 4 plus tree clones of *Quercus acutissima*. Res Rep Inst For Gen Korea 27:69-74
- Kang HD, Moon HK (2001) Shoot proliferation of *Populus euramericana* (*Populus deltoides* x *P. nigra*) through *in vitro* tissue culture. Plant Res 4:111-120
- Kang HJ, Moon HK, Yi JS (2003) Micropropagation of *Coryopsis coreana* by thidiazuron treatment. Kor J Plant Biotechnol 30:263-267
- Kim CS, Kang YJ (1992) Vegetative propagation of *Machilus thunbergii* through *in vitro* and cuttings. Res Rep Inst For Gen Korea 28:58-62
- Kim JA, Moon HK, Kim YW (2005a) Effect of growth regulators and osmoticums on somatic embryogenesis and plants regeneration in *Aralia elata* cultivar 'Zaoh'. Kor J Plant Biotechnol 32:129-134
- Kim JA, Moon HK, Kang HD (2005b) Effect of BA and NAA

- on adventitious bud induction from *in vitro* germinant *Eucalyptus pellita*. Korean J Plant Biotechnol 32:201-207
- Kim JA, Moon HK (2006) Effect of light-emitting diodes (LEDs) and ventilation on the *in vitro* shoot growth of *Eucalyptus pellita*. J Kor For Soc 95:716-722
- Kim JH, Lee SK, Chun YW (1981) Mass propagation of tree species through *in vitro* culture. I. Bud culture of *Populus alba* × *P glandulosa* F₁. Res Rep Inst For Gen Kor 17:57-63
- Kim JH, Hyun SK, Lee SK, Lee KY, Kim KC (1982a) Mass clonal propagation of *Pinus rigida* × *P taeda* F₁ by embryo culture. Res Rep Inst For Gen Kor 18:74-79
- Kim JH, Shim SY, Noh EW, Park JI (1982b) Mass production of selected poplar clones through bud culture. Res Rep Inst For Gen Korea 18:80-85
- Kim JH, Moon HK, Park JI (1986) Somatic embryogenesis using *in vitro* germinants of *Tilia amurensis*. Abstract No 11. Proceed Kor For Soc pp 17
- Kim JH, Park JI (1987) Shoot formation in culture of mature *Pinus densiflora*. Res Rep Inst For Gen Korea 23:123-127
- Kim JH, Moon HK, Park JI, Lee BC (1988) Somatic embryogenesis and plant regeneration in callus from hypocotyl segments of *Tilia amurensis*. In: Genetic manipulation of woody plants. JW Hanover and DE Keathley (eds.). Plenum Press, New York, pp 473-474
- Kim SJ, Park SY, Moon HK, Lee WY (2010) Use of the temporary immersion bioreactor system for mass production of *Eucalyptus pellita* plus tree. J Korean For Soc 99:125-130
- Kim YW, Lee SK, Lee BC, Jang SS (1992a) Somatic embryogenesis and plant regeneration from mature embryos of *Quercus acutissima*. Korean J Plant Tiss Cult 19:363-368
- Kim YW, Lee SK, Lee BC, Lee JS, Jang SS (1992b) Somatic embryogenesis and plant regeneration from mature zygotic embryos of *Hibiscus syriacus* L. Korean J Breed 24:28-34
- Kim YW, BC Lee, SK Lee, SS Jang (1994) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Quercus acutissima*. Plant Cell Rep 13:315-318
- Kim YW, Youn Y, Noh ER, Song WS (1995a) Analysis of variation by floral size, petal color, and PCR between ramet and the emblings derived from somatic embryos of *Hibiscus syriacus* 'Bulsae'. Res Rep Inst For Gen Korea 31:141-146
- Kim YW, Youn Y, Noh ER (1995b) Somatic embryogenesis and germination from immature embryos of *Quercus variabilis*. Res Rep Inst For Gen Korea 31:147-152
- Kim YW, Youn Y, Noh ER, Kim JC (1997) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of five families of *Quercus acutissima*. Plant Cell Rep 16:869-873
- Kim YW, Youn Y, Noh ER, Kim JC (1999) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of Japanese larch (*Larix leptolepis*). Plant Cell Tiss Org Cult 55:95-101
- Kim YW, Moon HK (2005) Plant regeneration from cell suspension culture using leaf callus in *Actinidia deliciosa* × *A. arguta* clone 118. Kor J Plant Biotechnol 32:287-292
- Kim YW, Moon HK, Son SG (2006) Repetitive somatic embryogenesis and plant regeneration in *Zizyphus jujuba* M. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 42:247-251
- Kim YW, Moon HK (2007a) Regeneration of plant by somatic embryogenesis in *Pinus rigida* × *P. taeda*. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 43 335-342
- Kim YW, Moon HK (2007b) Plant regeneration from leaf derived callus of hybrid kiwi (*Actinidia deliciosa* × *A. arguta*). J Korean For Soc 96:34-39
- Kim YW, Moon HK (2007c) Enhancement of somatic embryogenesis and plant regeneration in Japanese larch (*Larix leptolepis*). Plant Cell Tiss Org Cult 88:241-245
- Kim YW, Park SY, Park IS, Moon HK (2007) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature seeds of *Magnolia obovata* T. Plant Biotechnol Rep 1: 237-242
- Kitaya Y, Ohmura Y, Kubota C, Kozai T (2005) Manipulation of the culture environment on *in vitro* air movement and its impact on plantlets photosynthesis. Plant Cell Tiss Org Cult 83:251-257
- Kwon YJ, Youn Y, Lee SK, Hyun YI, Lee JJ, Lee MH (1990) *In vivo* rooting of shoots propagated by bud culture on *Juglans*. Res Rep Inst For Gen Korea 26:63-68
- Kwon YJ, Youn Y, Lee SK (1992) Clonal propagation of *Betula schmidtii* plus trees by tissue culture I. Shoot proliferation and root induction for the mass-propagation of a plus tree (Kyungbuk No.11). Res Rep Inst For Gen Korea 28:48-57
- Kwon YJ, Youn Y, Lee SK, Kim JS (1994) Effect of cultural conditions on clonal propagation of *Betula costata* plus trees by tissue culture. Kor J Breed 26:435-446
- Lee BC, Kim JH, Park JI (1985) Induction of plantlets by bud culture in *Quercus acutissima*. Res Rep Inst For Gen Korea 21:104-108
- Lee BC, Kim JH, Park JI, Lee SK (1986a) Rapid micropropagation of *Betula* spp. through *in vitro* tissue culture. Res Rep Inst For Gen Korea 22:132-138
- Lee MH, Ahn CY, Park CS (1986b) *In vitro* propagation of *Juglans sinensis* Dode from bud culture. Res Rep Inst For Gen Korea 22:164-168
- Lee MH, Ahn CY, Shim SY, Park CS (1986c) *In vitro* propagation of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder through axillary bud shoot-tip cultures. Res Rep Inst For Gen Korea 22:164-168
- Lee BC, Lee SK, Kim JH (1987a) *In vitro* mass-propagation of *Lagerstroemia indica* for. *alba* Rehder. Res Rep Inst For Gen Korea 23:128-131
- Lee MH, Ahn CY, JO JG, Chung HJ (1987b) *In vitro* propagation of *Actinidia arguta* planchon from bud culture. Res Rep Inst For Gen Korea 23:173-177
- Lee BC, Shim SY, Lee SK (1988) Mass propagation and germination of somatic embryos in *Juglans regia* L. (English walnut). Res Rep Inst For Gen Korea 24:99-106

- Lee BC, Lee SK, Kim TS, Lee JS, Kim YW (1990) Encapsulation of *in vitro* shoot buds with alginate in *Betula davurica*. Res Rep Inst For Gen Korea 26:69-74
- Lee BC, Kim YW, Lee SK, Song WS, Kim TS (1991) Plant regeneration from adult tree explants via somatic embryogenesis and organogenesis in *Hibiscus syriacus* (Bulsae). Res Rep Inst For Gen Korea 27:85-90
- Lee BC, Kim SC, Kwon HM (1995) *In vitro* propagation of a rare species, *Forsythia koreana* for *aureoreticulata* and *Salix hallaisanensis*. Res Rep Inst For Gen Korea 31:129-133
- Lee JS, Moon HK, Kim YW (2003) Mass propagation of *Liriodendron tulipifera* L. via somatic embryogenesis. Korean J Plant Biotechnol 30:359-363
- Lee MH, Ahn CY, Hwang MS, Park CS, Hur DS (1989) *In vitro* rapid propagation of *Vitis amurensis* Rupr. from bud Culture. Res Rep Inst For Gen Korea 25:171-176
- Lee SK (1985) Induction of plantlet and callus using plant hormone treatment in bud culture of *Paulownia tomentosa*. Res Rep Inst For Gen Korea 21:96-103
- Li CH, Kiu BG, Kim TD, Moon HK, Choi YE (2008) Somatic embryogenesis and plant regeneration in elite genotypes of *Picea koraiensis*. Plant Biotechnol Rep 2:259-265
- Lindemann EGP, Gunckel JE, Davidson OW (1970) Meristem culture of *Cattleya*. Am Orchid Soc Bull 39:100-127
- Lloyd G, McCown B (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Int Plant Prop Soc Proc 30:42
- McCown BH (2000) Recalcitrance of woody and herbaceous perennial plants: dealing with genetic predeterminism. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 36:149-154
- Merkle SA, Dean J FD (2000) Forest biotechnology. Curr Opin in Biotechnol 11:298-302
- Merkle SA, Nairn CJ (2005) Hardwood tree biotechnology. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 41:602-619
- Moon HK, Kim JH, Park JI (1987) Position effect of axillary buds on shoot multiplication and rooting in bud culture of *Quercus acutissima*. J Kor For Soc 76:370-375
- Moon HK, Youn Y, Lee SK (1990) *In vitro* regeneration by axillary bud culture of *Crataegus pinnatifida*. Res Rep Inst For Gen Korea 26:75-77
- Moon HK, Youn Y, Hyun YI, Lee SK (1991a) *In vitro* propagation using stool shoots of mature *Betular platyphylla* var. *japonica*. J Korean For Soc 80:416-419
- Moon HK, Youn Y, Hyun YI, Lee SK (1991b) *In vitro* shoot proliferation from seedlings of half-sib families of sawtooth oak (*Quercus acutissima* Carr.) Res Rep Inst For Gen Korea 27:75-79
- Moon HK (1993) Micropropagation of adult *Sorbus commixta* H. Res Rep Inst For Gen Korea 29:74-78
- Moon HK, Youn Y, Son SH, Lee SK, Lee JS (1993a) *In vitro* shoot proliferation by pulse treatment from shoot cultures of *Q. acutissima* and *ex vitro* root induction using peat plug systems in *Quercus* spp. J Kor For Soc 82:221-226
- Moon HK, Youn Y, Son SH, Lee SK, Lee JS (1993b) Micropropagation of oak seedlings from 37 plus tree half-sib families. J Korean For Soc 82:26-33
- Moon HK, Han MS, Lee SK (1994) Plant regeneration through somatic embryogenesis of *Zizyphus jujuba* M. Korean J Breed 26:265-270
- Moon HK, Kim CS (1996) Somatic embryogenesis and germination of *Melia azedarach* var. *japonica* through immature embryo culture. Res Rep For Gen Res Inst Korea 32:58-63
- Moon HK, Youn Y (1996) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured immature zygotic embryos of *Tilia mandshurica* Rupr. Res Rep For Gen Res Inst Korea 32:64-71
- Moon HK, Youn Y, Yi JS (1997a) Micropropagation of juvenile and mature trees of sawtooth oak (*Quercus acutissima*). J Korean For Soc 86:391-398
- Moon HK, Suk JY, Kim CS (1997b) Micropropagation of a rare species, *Forsythia saxatilis* N. through tissue culture. J Korean For Soc 86:430-434
- Moon HK, Youn Y, Yi JS (1998) Somatic embryogenesis, plant regeneration, and field establishment from tissue culture of winter buds of 10-year-old *Aralia elata*. J Korean For Soc 87:57-61
- Moon HK, Youn Y (1999) Somatic embryogenesis from winter buds of 10-year-old *Aralia elata*. In: SM Jain, PK Gupta, RJ Newton (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Vol 5, 129-134. Kluwer Academic Pub
- Moon HK, Suk JY, Kwon YJ, Son SH (1999) Micropropagation of a rare species, *Abeliophyllum distichum* Nakai. via axillary bud culture. Kor J Plant Tiss Cult 26:133-136
- Moon HK, Noh EW, Ha YM, Shim KK (2002a) Micropropagation of juvenile and mature tree of *Corylopsis coreana* by axillary bud culture. Kor J Plant Biotechnol 29:117-121
- Moon HK, Kim SH, Kim BK (2002b) Micropropagation of *Kalopanax pictus* Nakai via axillary bud cultures. J Korean For Soc 91:775-780
- Moon HK, Kim JA, Lee HS, Kang HD (2003) Micropropagation via axillary bud induction of *Eucalyptus pellita*. Korean J Plant Biotechnology 30:269-273
- 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, Kim JA, Park SY, Kim YW, Kang HD (2006) Somatic embryogenesis and plantlet formation from a rare and endangered tree species, *Oplopanax elatus*. J Plant Biogeo 49:320-325
- Moon HK, Kim YW (2008) *In vitro* propagation of a rare and endangered species, *Echinosphora koreensis* Nakai, axillary bud culture. J Plant Bioetchnol 35:229-234
- Moon JI, Moon HK (1999) Micropropagation of mature *Betular davurica* by bud cultures. Korean J Plant Tiss Cult 26: 271-274
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497
- Nehra NS, Becwar MR, Rottmann WH, Pearson L, Chowdhury

- K, Chang S, Wilde HD, Kodrzycki RJ, Zhang C, Gause KC, Parks DW, Hinchee MA (2005) Forest biotechnology : Innovative methods, emerging opportunities. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 41:701-717
- Noh ER, Lee SK, Koo YB, Chung KH (1988) A mass propagation method of aspen (*Populus davidiana Dode*) using tissue culture and juvenile techniques. *Res Rep Inst For Gen Korea* 24:20-27
- Park SY, Ahn JK and Lee WY (2003) High frequency shoot induction from root segments of *Albizia coreana*. *J Korean For Soc* 92:626-631
- Park SY, Ahn JK, Lee WY, Murthy HN, Paek KY (2005) Mass production of *Eleutherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. *Plant Sci* 168:1221-1225
- Park SY, Moon HK, Kim YW, Kim SJ, Yi JS (2008a) Application of open-type liquid culture for large-scale production of mature plus tree of *Eucalyptus pellita*. *J Kor For Soc* 97:650-655
- Park SY, Kim YW, Moon HK, Murthy HN, Choi YH, Cho HM (2008b) Micropropagation of *Salix pseudolasiogyne* from nodal explants. *Plant Cell Tiss Org Cult* 93:341-346
- Park SY, Kim MJ (2010) Development of embryos and seedlings is affected by radiation spectral compositions from light emitting diode (LED) system in chestnut. *J Korean For Soc* 99:750-754
- Park SY, Klimaszewska K, Park JY, Mansfield SD (2010) Lodgepole pine: the first evidence of seed-based somatic embryogenesis and the expression of embryogenesis marker genes in shoot bud cultures of adult trees. *Tree Physiol* 30:1469-1478
- Park YS, Barrett JD, Bonga JM (1998) Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: Deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 34:231-239
- Park YS (2002) Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Ann For Sci* 59:651-656
- Pijut PM, Woeste KE, Vengadesan G, Michler CH (2007) Technological advances in temperate hardwood tree improvement including breeding and molecular marker applications. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 43:283-303
- Rao PS, Suprassana P, Ganapathi TR, Bapat VA (2000) Status of somatic embryogenesis in Indian forest trees. In: *Somatic embryogenesis in Woody plant* Vo.1 6 (eds. Jain SM, Gupta PK, Newton RJ), Kluwer Academic Publishers p 142-192
- Son SG, Cho YJ, Moon HK (2004) Effect of BA and NAA on adventitious shoot formation from mature zygotic embryos of *Stewartia koreana* N. *Korean J Plant Res* 17:272-277
- 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 Korean For Soc* 94:39-44
- Son SH, Hur SD, Kim JH, Lee YH, Kim MH, Park JS, Lee YW, Moon HK, Youn Y, Lee SK (1995) Micropropagation of superior variety of Japanese pepper tree (*Zanthoxylum piperitum* Dc.) *Korean J Plant Tiss Cult* 22:127-130
- Sutton B (2002) Commercial delivery of genetic improvement to conifer plantations using somatic embryogenesis. *Ann For Sci* 59:657-661
- Teasdale RD, Dawson PA, Woolhouse HW (1986) Mineral nutrient requirements of a loblolly pine (*Pinus taeda*) cell suspension culture. *Plant Physiol* 82:942-945
- van der Linden CGW, Russ-Kortekaas MJM, Smulders R (1999) MADS-box genes as putative markers for juvenile and mature phase in woody species. Congress on "Application of Biotechnology to Forest Genetics" in Vitoria-Gasteiz, Spain, 22-25 September 1999. Book of Abstracts
- von Aderkas PV, Bonga JM (2000) Influencing micropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiol* 20:921-928
- Youn Y, Ishii K, Saito A, Ohba K (1988) *In vitro* plantlet regeneration from axillary buds of mature trees of *Tilia cordata*. *Jpn J For Soc* 70:315-317
- Youn Y, Ishii K, Saito A, Ohba K (1989) *In vitro* plantlet regeneration by bud culture and its multiplication in *Tilia amurensis* seedlings. *Jpn J For Soc* 71:61-64
- Youn Y, Ohba K (1990) *In vitro* plantlet regeneration from axillary buds of *Tilia amurensis* mature trees and clonal variation in tissue culturability. *J Korean For Soc* 79:109-114
- Youn Y, Lee SK, Park JI (1992a) *In vitro* propagation of a rare species- *Berchemia berchemiaefolia*. *Res Rep Inst For Gen Korea* 28:63-67
- Youn Y, Kwon YJ, Moon HK, HAN MS, Lee SK (1992b) *In vitro* propagation of ash tree (*Fraxinus mandshurica* L.). *Korean J Plant Tiss Cult* 19:75-79
- Zimmermann RH (1971) Flowering in crabapple seedlings: Methods of shorting the juvenile phase. *J Amer Soc Hort Sci* 96:404-411