

ABA 및 삼투압제 종류 및 농도에 따른 낙엽송 (*Larix kaempferi*) 체세포배 유도, 발아 및 식물체 재분화 효과

김 용 욱*

국립산림과학원 산림생명공학과

Effect of Abscisic Acid, Kinds and Concentrations of Osmoticum on Somatic Embryo Induction, Germination and Plantlet Regeneration in *Larix kaempferi*

Yong Wook Kim*

Biotechnology Division, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-847, Korea

요 약: 본 연구는 낙엽송 체세포배 유도, 발아 및 식물체 재분화에 영향을 미치는 배지종류, 앱시식산(abscisic acid, ABA)의 농도, 삼투압제의 종류 및 농도 효과를 조사하기 위해 수행되었다. 체세포배 유도를 위한 배양기간, ABA 및 삼투압제 농도 비교에서 60 μM ABA+0.2 M sucrose에서 4주 배양으로 가장 많은 체세포배(191개/g 조직)가 유도되었으나, 4 μM ABA+0.1 M sucrose에서는 배양 기간에 관계없이 3.5~23.5 개로 아주 저조한 유도 결과를 보였다. 체세포배 발아 비교에서는 60 μM ABA+0.2 M sucrose 처리구에서 5 주간 배양으로 유도된 체세포배가 자엽(90.9%), 하배축(95.8%) 및 뿌리발생율(96.5%)이 가장 높았으나, 4 μM ABA+0.1 M sucrose 처리구 유래 체세포배의 발아 정도는 매우 저조한 것으로 나타났다. 삼투압제 농도 및 종류에 따른 체세포배 발아 및 식물체 재분화 비교에서는 0.2 M sucrose 처리구의 체세포배의 자엽(98.3%), 하배축(78.4%), 뿌리(57.5%) 발생률 및 식물체 재분화율(54.8%)로 가장 높게 나타났다.

Abstract: This study was conducted to examine effects of concentrations of abscisic acid (ABA) or /kinds of osmotica on induction of somatic embryos (SEs), germination and plantlet regeneration in Japanese larch (*Larix kaempferi*). In comparison of duration of culture, concentrations of ABA and osmoticum, the highest induction number (191/g tissue) of the SE was showed in 60 μM ABA+0.2 M sucrose for 4 weeks culture. However, the lowest number (3.5~23.5) of SEs was induced from 4 μM ABA+0.1 M sucrose, regardless of culture duration for SEs induction. In comparison of germination efficiency of SEs, the highest induction frequencies of cotyledon (90.9%), hypocotyl (95.8%) and root (96.5%), respectively, were obtained from the SEs that cultured from the treatment of 60 μM ABA+0.2 M sucrose with 5 weeks culture. In contrast, the lowest germination response was showed in SEs that induced from the treatment of 4 μM ABA+0.1 M sucrose. In comparison of effect of different kinds/concentrations of osmotica for germination and plantlet regeneration, the best response was obtained from the treatment of 0.2 M sucrose with induction of cotyledon (98.3%), hypocotyl (78.4%), root (57.5%) and plantlet regeneration (54.8%), respectively.

Key words : abscisic acid, germination, Japanese larch, osmotica, somatic embryo

서 론

전통적인 무성번식 기술(접·삽목)로 증식이 어려운 주요 임목수종은 현재 체세포배 유도라는 획기적인 클론증식 기술개발로 독일가문비나무를 비롯한 여러 주요 수종에서 상업적 대량생산까지 이루어진 반면, 아직도 대부분

임목수종의 체세포배의 대량 유도는 가능하지만 그로부터 자엽, 하배축 및 뿌리 등으로의 기관 발달이 잘 이루어지지 않아 결국은 식물체 재분화가 힘든 경우가 많다. 이것은 체세포배 유도 시스템을 이용한 우수 클론묘의 대량 생산 실용화 달성에 가장 큰 걸림돌로 작용하며, 대부분 침엽수종의 문제점으로 작용하고 있다. 이에 대한 주요인은 침엽수종의 경우 배발생조직으로부터 체세포배 유도 시 배지 내 고농도의 ABA 첨가가 필수적인데 그로부

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

터 발생된 체세포배의 경우 조직 내에 고농도의 ABA 잔존으로 인해 차후 발아과정을 통한 식물체의 분화 시 억제요인으로 작용하기 때문이다. 따라서 이를 극복하기 위한 많은 연구가 이루어져 왔는데, 그중 *Picea mariana* 및 *P. abies* 수종의 체세포배 탈수처리(Bomal and Tremblay, 2000) 및 *Pinus elliotti* 체세포배의 저온 전처리(Liao and Amerson, 1995) 등의 물리적 처리를 통한 발아증진 효과에 관한 보고 등이 있다. 또한 Klimaszewska와 Smith (1997b)는 *Pinus strobus*의 체세포배를 고농도의 gelrite 배지에서 배양으로 발아율 증진효과를 보고하고 있는데, 이는 배지내의 수분유용성을 조절해서 조직 내의 ABA 양을 감소시킨 결과로 기인된다고 설명하고 있다. 또한 Tremblay와 Tremblay(1991)는 *Picea mariana* 및 *P. rubens*의 체세포배를 배지 고형제의 종류 및 농도, 질산암모늄 농도 및 명·암배양 등 조건을 달리함으로써 체세포배의 발아율 차이를 보고하는 등 체세포배 발아율 증진을 위한 다양한 시도가 이루어졌다. 그 외에도 해송 및 삼나무의 배발생조직 라인 간 발아 및 식물체 재분화 비교(Maruyama *et al.*, 2005a, b), glutamine 첨가에 따른 체세포배 발아 시 부위 별 발생율 비교(Khlifi and Tremblay, 1995) 등이 있다. *Larix* 속 수종의 경우 *L. laricina* (Klimaszewska *et al.*, 1997a) 및 *L. leptoeuropaea* (Lelu *et al.*, 1994b) 체세포배 발아의 성공 유무는 체세포배 유도 배지내 ABA 및 삼투압제의 적정 농도로 좌우됨을 보고하고 있고, Lelu와 Label(1994)는 *L. leptoeuropaea*에서 첨가된 ABA 농도가 높을수록 체세포배 유도 수는 높아 지지만 발아율과는 상관관계가 없음을 보고하고 있어 ABA 농도외의 요인이 발아율에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 또한 *L. leptoeuropaea*의 체세포배를 탈수처리 후 체세포배 내의 내생 ABA 양을 감소시켜 발아율을 높였으며(Dronne *et al.*, 1997; Lelu *et al.*, 1995), Lelu-Walter와 Paques(2009)는 *L. leptoeuropaea*에서 체세포배 발생 시 첨가된 gelrite 농도에 따른 발아 및 식물체 재분화율 효과에 관한 연구가 있다. 또한 ABA 첨가배지에서의 배양 기간에 따른 체세포배 발아율 비교에서 *L. leptoeuropaea*의 경우 3주 이상 배양 할 경우 발아율과 식물체 전환율은 급격히 낮아진다고 보고하고 있어 배양기간 또한 발아율에 중요한 요인으로 작용함을 알 수 있다 (Lelu *et al.*, 1994a).

최근 목재수요의 지속적인 증가로 인한 경제수종의 육성에 대한 관심이 높아지고 있는바 그중 체세포배 배양기술을 이용한 클론묘 생산 또한 목재수요를 충족할 수 있는 한 가지 대안이 될 수 있다. 기존의 낙엽송 체세포배 유도 및 식물체 재분화 연구(Kim *et al.*, 1999; Kim and Moon, 2007)의 경우 체세포배 유도에 관여하는 ABA, 삼투압제의 적정 농도 및 종류 등의 요인구명으로 체세포배

발생을 위한 조건은 어느 정도 확립되었으나, 본 연구에서는 특히 발생된 체세포배의 차후 식물체 재분화에 영향을 미치는 ABA, 삼투압제 종류, 농도 및 처리기간 효과 등에 관한 연구이다. 따라서 본 연구는 체세포배로부터 건전한 식물체 재분화 연구가 가능하도록 체세포배 발아에 영향을 미치는 요인들을 구명하여 차후 클론묘 육성을 위한 자료를 제공하는데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

1. 식물재료

배발생조직 유도를 위한 재료는 충북 충주에 위치한 국립산림품종관리 센터 내 낙엽송클론 채종원에서 7월초 미숙과를 채취하여 멸균 후 종자내의 미숙배만을 분리하여 배양하였다.

2. 배발생조직 유도 및 증식

배발생조직 유도는 LM(Litvay *et al.*, 1985) 배지에 2.0 mg/L 2,4-D, 1.0 mg/L BA, 1,000 mg/L L-glutamine 및 3.0% sucrose를 첨가하였고, 0.4% gellan gum(Sigma)을 첨가시켜 반고형 배지로 만들어 사용했다. 배양환경은 25±1°C, 암소에서 8주 동안 새로운 배지교환 없이 이루어졌으며, 배발생조직 증식은 유도배지 조성과 동일하였고 약 0.5 cm 정도 크기의 조직을 새로운 배지로 이식함으로써 증식시켰다.

3. 체세포배 유도

체세포배 유도의 배지 조성은 염류의 양을 반으로 줄인 ½LM 액체배지에 배발생조직을 현탁 한 후 5.5 cm 크기의 종이필터(Whatman) 위로 3 mL 정도의 세포현탁액(90 mg)을 깔아준 후 진공펌프를 이용하여 약 5초간 액체배지만을 제거하였다. 그 후 배발생조직이 포함된 종이필터를 체세포배 유도배지에 치상하여 체세포배를 발생시켰고, 배양조건은 25±1°C, 암소에서 이루어졌으며, 배양과정 동안 새로운 배지 교환은 하지 않았다.

1) ABA, 삼투압제 농도 및 배양기간에 따른 체세포배 유도 효과

체세포배 유도에 영향을 미치는 두 종류의 ABA, 삼투압제 농도 및 배양기간에 따른 효과를 비교하였다. 첫 번째는 ½LM 배지에 0.1 M sucrose+4 µM ABA+0.4% gelrite (LLA)가 첨가된 처리구이고 두 번째는 0.2 M sucrose+60 µM ABA+0.4% gelrite(LLB)이다. 각 처리구에서 3, 4 및 5 주 배양 후 각각의 체세포배 유도 효과를 비교하였고, 배양반복 수는 각 처리구 당 10반복(페트리디시) 배양하였다.

2) ABA, 삼투압제 농도 및 배양기간에 따른 체세포배 발아 효과

상기(上記)한 ABA, 삼투압제 농도 및 배양기간에 따라 유도된 체세포배의 발아 효과를 알아보기 위해서 수행되었다. 각 첨가물 및 배양기간 별로 유도된 체세포배를 1/2LM 배지에 2% sucrose 및 0.4% gelrite가 첨가된 발아 배지에 배양하여 발아체로 분화시켰으며, 발아 배양 6주 후 체세포배로부터 자엽, 하배축, 뿌리 발생을 및 식물체 전환을 등을 조사하였다. 배양반복 수는 각 처리구(배지 종류 및 배양기간 별) 당 10반복(페트리디시) 배양하였고, 페트리디시 당 체세포배를 7개씩 발아 유도하였다.

3) 삼투압제 종류 및 농도에 따른 발아 효과

본 실험은 Figure 2에서 보는바와 같이 총 10종류의 삼투압제 처리구로 부터 유도된 체세포배 발아율 비교를 위해 수행되었다. 본 실험에서 삼투압제 처리구는 0.2~0.4 M sucrose 혹은 maltose, 그리고 0.1 M sucrose+0.1 M maltose, 0.2 M sucrose 혹은 maltose+5% polyethyleneglycol (PEG, Sigma, MW 3,350) 등 10조합으로 이루어졌다. 발아 배양 6주 후에 자엽, 하배축, 뿌리 발생을 및 식물체 전환율을 각각 조사하였고, 배양반복 수는 각 처리구(삼투압제 처리구 별) 당 10반복(페트리디시) 배양하였으며 페트리디시 당 체세포배를 7개씩 발아 유도하였다.

결과 및 고찰

1. ABA, 삼투압제 농도 및 배양기간에 따른 체세포배 유도 효과

Figure 1은 ABA, 삼투압제 농도 및 배양기간에 따른 체세포배 유도 수 비교에 관한 것으로서 최대 체세포배 유도 수는 LLB 배지의 4주 배양으로 가장 높은 유도 수 (191개/g 조직)를 보였고, 3주(186개) 혹은 5주(187.5개) 배양은 큰 차이가 없었다. 그러나 LLA 배지의 경우 배양기간에 관계없이 3.5~23.5개로 유도 수가 매우 저조하였으

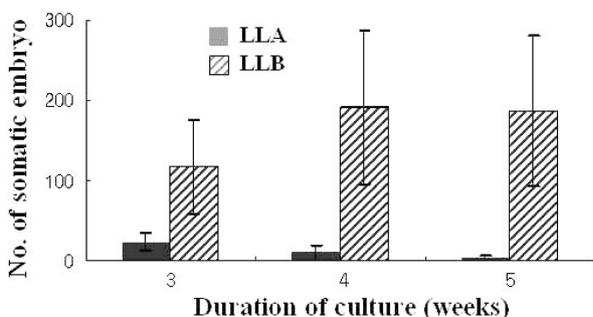


Figure 1. Effects of 2 kinds culture media and culture duration on somatic embryo production in *L. kaempferi*. (±: standard error)
LLA: 1/2LM+0.1 M sucrose+4 μ M ABA+0.4% gelrite
LLB: 1/2LM+0.2 M sucrose+60 μ M ABA+0.4% gelrite

며, LLB 배지와 비교하여 유도배지에 첨가된 ABA 및 sucrose 양에 따라 큰 차이를 보였다(Figure 1).

대부분 침엽수종의 체세포배 유도 시에는 ABA 첨가가 필수적인데 그 효과로서는 유도된 체세포배의 조기발아 억제 및 정상 체세포배로의 발달 촉진, 저온에 견딜 수 있는 Late Embryogenesis Abundant(LEA) 단백질 합성 (Beardmore and Charest, 1995), triglycerides 및 lipids (Attree *et al.*, 1992) 축적 등을 들 수 있다.

Larix 속의 ABA 효과에 관한 연구는 Kim and Moon (2007)이 낙엽송 체세포배 유도 시 60 μ M ABA+0.8% gelrite 조건에서 최대의 체세포배 유도를 보고하였고, Lelu-Walter와 Paques(2009)는 *L. leptoeuropaea* 및 *L. marschlinii*의 체세포배 유도 시에도 60 μ M ABA+0.2 M sucrose를 첨가하여 최적의 체세포배 유도 조건을 보여 본 실험의 결과와 유사하였다. 그러나 *L. larcina*의 경우, 40 μ M ABA+0.2 M sucrose+5% polyethylene glycol(PEG)를 처리하여 최대 수의 체세포배를 유도하였고(Klimaszewska *et al.*, 1997), *L. leptoeuropaea*의 경우 20 μ M ABA+0.2 mg/L IBA+0.2 M sucrose 처리구에서 최대의 체세포배 유도를 보고 하고 있어(Lelu *et al.*, 1994b) 체세포배 유도를 위한 ABA 및 삼투압제의 적정조건은 *Larix* 속 수종에 따라 매우 다양하게 나타났다.

배양기간에 따른 체세포배 유도 효과에 관한 연구보고는 그리 많지 않은데, *L. leptoeuropaea*의 경우 3주 배양으로 최대의 체세포배 유도 효과를 보여(Lelu and Label, 1994; Lelu *et al.*, 1994b) 본 연구의 결과와 유사하였으나, Lelu 등(1994b)은 체세포배 유도기간이 3주 이상 4, 5주 이상으로 길어지면 차후 발아율과 식물체 전환율이 급격히 감소하는 결과를 보여 차후 유도한 체세포배로부터 높은 식물체 재분화율을 고려한다면 고농도 ABA 첨가 배지에서의 적정배양 기간이 구명되어야 할 것이다.

2. ABA, 삼투압제 농도 및 배양기간에 따른 체세포배 발아 효과

Table 1은 체세포배 발생배지내의 ABA, 삼투압제 농도 및 배양기간에 따라 유도된 체세포배의 발아 효과를 조사한 것으로서, 최대 자엽(LLB, 5주 배양, 90.9%), 하배축(LLB, 3주 배양, 95.8%), 및 뿌리 발생율(LLB, 5주 배양, 96.3%) 등은 LLB배지에서만 관찰되고 있으며, 배양기간에 따른 기관 발생율은 다소 차이를 보였다. 따라서 낙엽송의 경우, LLB 배지에서 5주 배양으로 유도된 체세포배의 발아 시 각 기관 발생율은 최적인 것으로 나타났다. 그리고 식물체 전환율은 LLB 배지에서 3주(87.6%) 및 5주(87.9%) 배양으로 동일하였으나 4주 배양 (86.1%) 또한 높은 전환율을 보여 LLB 배지에서의 배양기간에 따른 식물체 전환율 차이는 거의 없었다(Table 1). 그러나 LLA 배

Table 1. Effects of 2 kinds culture media and culture duration on somatic embryo germination or plantlet regeneration in *L. kaempferi*.

SE induction medium	Duration of culture (weeks)	Cotyledon (%)	Hypocotyl (%)	Root (%)	Plant regeneration (%)
LLA ^a	3	0	0	28.9±3.3	0
LLA	4	0	0	14.4±1.6	0
LLA	5	0	0	0	0
LLB ^b	3	89.5±1.2	95.8±1.9	92.0±0.7	87.6±3.9
LLB	4	88.9±5.1	91.5±1.6	93.0±0.7	86.1±2.3
LLB	5	90.9±1.5	94.8±3.3	96.3±2.7	87.9±6.4

^aLLA: ½LM+0.1 M sucrose+4 µM ABA+0.4% gelrite

^bLLB: ½LM+0.2 M sucrose+60 µM ABA+0.4% gelrite

지의 경우 배양기간에 관계없이 자엽 및 하배축 분화는 전혀 이루어지지 않았으며, 뿌리 발생 또한 단지 LLA 배지에서 3주 배양일 경우 28.9% 정도로 저조하였다. 그리고 LLA 배지 유래의 식물체 전환은 배양기간에 상관없이 전혀 이루어지지 않아 LLA 배지 내의 ABA 및 삼투압제 조성으로는 식물체 재분화에 유리한 건전한 체세포배 발생은 사실상 불가능한 것으로 보였다. 따라서 체세포배로부터 높은 식물체 재분화율 획득은 체세포배 유도의 배양기간 보다는 배지 내 고농도 삼투압제 및 ABA 첨가배지 유래의 체세포배 획득이 보다 필수적인 요인으로 보였다 (Table 1).

Larix 속 체세포배 발아 및 식물체 재분화 연구는 *L. laricina*의 경우 40 µM ABA 첨가 시 47.8%로 가장 높고 ABA 및 삼투압제 농도에 좌우되며(Klimaszewska *et al.*, 1997), *L. leptoeuropaea*의 체세포배 발아율의 경우 체세포배 발생에 첨가된 ABA 농도와는 연관성은 없으나 식물체 전환율에는 많은 영향을 끼치며(Label and Lelu, 1994), 특히 60 µM ABA 농도에서는 38%의 낮은 전환율을 보여 *Larix* 속 타 수종보다는 ABA 농도에 훨씬 민감함을 알 수 있다. 그리고 50% 발아율을 획득하기 위해선 12~13일 정도의 배양기간이 필요해 낙엽송보다는 훨씬 짧은 배양 기간을 요한다고 보고하고 있다. 또한 Lelu와 Label(1994)에 따르면 *L. leptoeuropaea*의 경우 60 µM ABA 배지에서 2~3 주 배양으로 발생된 체세포배는 최대 90%의 발아율 및 70%의 식물체 전환율을 보여 본 실험과 거의 일치하는 결과를 보였다. 그리고 Lelu 등(1995)은 *L. leptoeuropaea*의 체세포배를 4 및 59%의 상대습도 조건 하에서 탈수처리를 하였을 경우, 73% 및 41%의 발아율과 식물체 전환율을 각각 보고해 탈수처리로 체세포배의 발아율 증진에 효과가 있음을 보고하고 있다.

3. 삼투압제 종류 및 농도에 따른 발아 효과

체세포배 발아율은 ABA 농도 및 삼투압제 종류 및 농도에 크게 좌우됨을 알 수 가 있었는데, 따라서 Figure 2는 앞의 Figure 1과 Table 1의 결과를 근거로 하여 그중

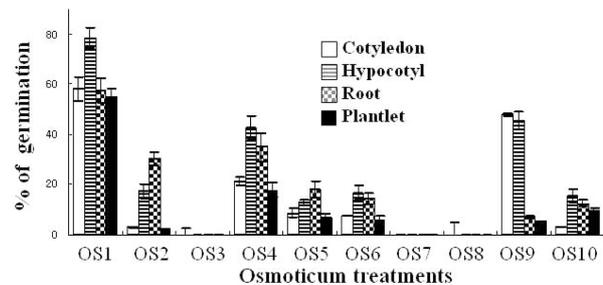


Figure 2. Effects of 10 treatments of osmoticum on somatic embryo germination or plantlet regeneration in *L. kaempferi*. (±: standard error)

OS1: 0.2 M sucrose, 2: 0.3 M sucrose, 3: 0.4 M sucrose, 4: 0.2 M maltose, 5: 0.3 M maltose, 6: 0.4 M maltose, 7: 0.2 M sucrose+5% *PEG, 8: 0.2 M maltose+5% PEG, 9: 0.1 M sucrose+0.1 M maltose, 10: 0.2 M sucrose+0.2 M maltose *Polyethyleneglycol (MW 3,350)

다양한 삼투압제 종류 및 농도를 달리한 처리구로부터 유도된 체세포배의 발아 및 식물체 전환율에 관한 비교 결과이다. Figure 2에서와 같이 최고의 자엽(58.3%), 하배축(78.4%), 뿌리 발생율(57.5%) 및 식물체 재분화율(54.8%)은 0.2 M sucrose 처리구에서 나타났는데, 이것은 삼투압제 종류 및 농도에 따라 체세포배의 발아율 및 식물체 전환율 차이를 보이는 중요한 요인으로 작용한다는 것을 의미한다. 특히 고농도의 0.4 M sucrose, 0.2 M sucrose+5% PEG 및 0.2 M maltose+5% PEG 처리구 등에서 유도된 체세포배의 경우 전혀 기관분화가 이루어지지 않아 0.2 M 이상의 고농도 sucrose 혹은 PEG첨가 등은 정상적인 발아가 어려운 체세포배가 다수 유도됨을 알 수 있다 (Figure 2). 그러나 Klimaszewska 등(1997)은 *L. laricina* 수종에서 0.2 M sucrose+5% PEG+40 µM ABA 처리구로부터 유도한 체세포배 발아의 경우 47.8%로 가장 높은 발아율을 보고하고 있어 다른 수종에서와는 달리 PEG 첨가가 발아에 유효함을 보인 반면, 0.2 M sucrose 처리구로부터는 25% 정도의 낮은 발아율을 보여 PEG 첨가가 다소 효과가 있었다. 또한 Lelu-Walter and Paques(2009)는 *L. xeurolepis*의 체세포배 발아 실험에서 1.0%의 gelrite 첨가 배지로부터 96.7 및 69.3%의 최대 발아율 및 식물체 전환

율을 보고해 삼투압제 종류 및 농도 등의 요인 외에도 배지의 gelrite 농도를 높임으로써 발아율을 높일 수 있는 가능성을 보고하고 있다. 낙엽송의 경우 Kim and Moon (2007)은 60 μ M ABA+0.8% gelrite에서 유도한 체세포배의 식물체 전환율 또한 최대 35.5%를 보여 체세포배 유도 혹은 발아 시 고농도의 gelrite 첨가 효과는 크게 나타남을 알 수 있다. 따라서 수종에 따른 최적 체세포배의 발아요인은 매우 다양하게 나타나기 때문에 체세포배 유도의 적정 ABA, 삼투압제 종류 및 농도에 관한 최적의 조건은 실험을 통해 구명되어야 할 것으로 사료된다.

인용문헌

1. Attree, S.M., Pomeroy, M.K. and Fowke, L.C. 1992. Manipulation of conditions for the culture of somatic embryos of white spruce for improved triacylglycerol biosynthesis and desiccation tolerance. *Planta* 187: 395-404.
2. Beardmore, T. and Charest, P.J. 1995. Black spruce somatic embryo germination and desiccation tolerance. II. Effect of an abscisic acid treatment on protein synthesis. *Canadian Journal of Forest Research* 25: 1773-1782.
3. Bomal, C. and Tremblay, F.M. 2000. Dried cryopreserved somatic embryos of two *Picea* species provide suitable material for direct plantlet regeneration and germplasm storage. *Annual Botany* 86: 177-183.
4. Dronne, S, Label P. Lelu MA. 1997. Desiccation decreases abscisic acid content in hybrid larch (*Larix× leptoeuropaea*). *Physiologia Plantarum* 66: 433-438.
5. Khelifi, S. and Tremblay, F.M. 1995. Maturation of black spruce somatic embryos. I. Effect of L-glutamine on the number and germinability of somatic embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 41: 23-32.
6. Kim, Y.W., Youn, Y., Noh, E.R. and Kim, J.C. 1999. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 55: 95-101.
7. Kim, Y.W. and Moon, H.K. 2007. Enhancement of somatic embryogenesis and plant regeneration in Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 88: 241-245.
8. Klimaszewska, K., Devantier, Y., Lachance, D., Lelu, M.A. and Charest, P.J. 1997a. *Larix laricina* (tamarack): somatic embryogenesis and genetic transformation. *Canadian Journal of Forest Research* 27: 538-550.
9. Klimaszewska, K. and Smith, D.R. 1997b. Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* promoted by a high concentration of gellan gum. *Physiologia Plantarum* 100: 949-957.
10. Label, P. and Lelu, M.A. 1994. Influence of exogenous abscisic acid on germination and plantlet conversion frequencies of hybrid larch somatic embryos (*Larix×leptoeuropaea*). *Plant Growth Regulation* 15: 175-182.
11. Lelu, M.A., Bastien, C., Klimaszewska, K. and Charest, P.J. 1994a. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix×leptoeuropaea*): Part 2. Control of germination and plantlet development. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 36: 117-127.
12. Lelu, M.A., Klimaszewska, K., Ward, C. and Charest, P.J. 1994b. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix×leptoeuropaea*): Part 1. Somatic embryo maturation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 36: 107-115.
13. Lelu, M.A., Klimaszewska, K., Pflaum, G. and Bastien, C. 1995. Effect of maturation duration on desiccation tolerance in hybrid larch (*Larix×leptoeuropaea* Densler) somatic embryos. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 31: 15-20.
14. Lelu, M.A. and Label, P. 1994. Changes in the levels of abscisic acid and its glucose ester conjugate during maturation of hybrid larch (*Larix×leptoeuropaea*) somatic embryos, in relation to germination and plantlet recovery. *Physiologia Plantarum* 92: 53-60.
15. Lelu-Walter, M.A. and Paques, L.E. 2009. Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix×eurolepis* and *Larix×marschlinsii*). *Perspectives for breeding*. *Annual Forest Science* 66: 104-117.
16. Liao, Y.K. and Amerson, H.V. 1995. Slash pine (*Pinus elliotii* Engelm.) somatic embryogenesis II. Maturation of somatic embryos and plant regeneration. *New Forests* 10: 165-182.
17. Litvay, J.D., Verma, D.C. and Johnson, M.A. 1985. Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Reports* 4: 325-328.
18. Maruyama, E., Hosoi, Y. and Ishii, L. 2005a. Somatic embryo production and plant regeneration of Japanese black pine (*Pinus thunbergii*). *Journal of Forest Research* 10: 403-407.
19. Maruyama, E., Ishii, K. and Hosoi, Y. 2005b. Efficient plant regeneration of Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*) via somatic embryogenesis. *Journal of Forest Research* 10: 73-77.
20. Tremblay, L. and Tremblay, F.M.. 1991. Effects of gelling agents, ammonium nitrate, and light on the development of *Picea mariana* (Mill) B.S.P. (black spruce) and *Picea rubens* Sarg. (red spruce) somatic embryos. *Plant Science* 77: 233-242.