

멸종위기종 둥근잎평의비름 (*Hylotelephium ussuriense* (Kom.) H. Ohba)의 기내 증식

배기화 · 유경화 · 김지아 · 윤의수

In vitro propagation of endangered species, *Hylotelephium ussuriense* (Kom.) H. Ohba

Kee-Hwa Bae · Kyoung-Hwa Yoo · Ji-Ah Kim · Eui-Soo Yoon

Received: 28 February 2014 / Revised: 3 March 2014 / Accepted: 11 March 2014

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract To establish the system of *in vitro* plant regeneration, the different explants (stem with axillary bud and stem without axillary bud) of *Hylotelephium ussuriense* were cultured on the Murashige and Skoog's medium containing 6-benzylaminopurine (BA) and indolebutyric acid (IBA). The adventitious shoot induction was more effective in the stem with axillary bud explants than the stem without axillary bud explants, and was the best on MS medium containing 3.0 mg/L BA and 0.01 mg/L IBA. Frequency of plantlet growth was not significantly treated on MS and sucrose. Total chlorophyll contents under ventilation treatment were higher than those in control (non-ventilation). This *in vitro* propagation protocol will be useful for conservation and mass propagation of this endangered plant.

Keywords axillary bud culture, *in vitro* propagation, *Hylotelephium ussuriense*, ventilation

서론

둥근잎평의비름(*Hylotelephium ussuriense* (Kom.) H. Ohba)은 식물분류학적으로 돌나물과(Crassulaceae), 평의비름속(*Hylotelephium* spp.)에 속하는 식물로서 경북 청송군 주왕산 인근 계곡의 바위틈에만 분포하는 한국특산식물이다(Chung 1974). 둥근잎평의비름은 초장이 15~25 cm 정도이고 잎은 원형 또는 타원형으로 가장자리가 불규칙한 톱니모양이 있는 것이 특징이다(Seo 1979). 개화기는 7~8월경으로 짙은 자색의 꽃이 피는데 관상용으로 이용 가치가 높아 원예작물로의 개발 가치가 매우 높다. 3~4월경에 어린순을 식용하고 예로부터 한방에서는 전초를 대하증(帶下症)이나 선혈(鮮血) 등의 약재로 사용되어 왔다(Jang 2007). 한국에서도 특히 경북 주왕산 인근에만 자생하고 있는 둥근잎평의비름은 관상용과 약용으로 무분별한 남채와 자생지 내외의 훼손으로 개체수가 급속히 감소됨에 따라 환경부에서는 법적보호종(멸종위기야생동식물 II)으로 지정(MEV 2005)하여 보호, 관리를 하였지만 2012년 환경부에서는 경북지역에 많은 수의 개체군과 개체수가 확인되고 있고, 주로 사람의 접근이 어려운 절벽에 생육하고 있어 종 자체의 소멸 가능성이 낮다는 판단 하에 해제종으로 분류하였다. 한편, 산림청에서는 희귀 및 멸종위기식물(CR, 보존 순위 22위)로 지정하여 지속적으로 보호, 관리하고 있다(Lee and Lee 1997).

한편, 야생에서 둥근잎평의비름은 휴면기를 갖고 있어 안정적인 대량증식체계를 확보하기가 매우 까다로운 식물로 알려져 있고, 이러한 문제점을 타파하기 위해 화학분화와 개화 조절에 관한 연구결과가 몇몇 연구자들에 의해 보고된 바 있다(Jeong 1999; Jeong 2001). 장단일식물인 둥근잎평의비름은 휴면의 타파에 저온보다 일장조건

K. H. Bae
국립생물자원관
(National Institute of Biological Resources, 42 Hwangyeong-ro, Seo-gu, Incheon, 404-708, Korea)

K. H. Yoo · E. S. Yoon (✉)
공주대학교 자연과학대학 생명과학과
(Department of Biology, College of Nature Sciences, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea)
e-mail: yes@kongju.ac.kr

J. A. Kim
국립산림과학원 산림생명공학과
(Division of Forest Biotechnology, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-847, Korea)

이 깊이 관여하며(Jeong 1999), Jeong(2001)은 한계일장인 14시간 이상의 일장에서는 화아분화가 일어나고, 14시간 이하의 일장에서는 화아발달이 이루어진다고 보고한 바 있다. 또한 이렇게 발달된 화아는 21일 이상의 장일처리에서만 형성되고 이로 인해 정상적인 생장을 하여 개화가 된다고 알려져 있다(Jeong and Kwon 2003). 이러한 이유로 인해 둥근잎평의비름의 안정적인 대량생산체계를 구축하는데 어려움이 있다. 식물조직배양은 멸종위기식물의 번식 수단으로 이용이 가능하고, 국내에서도 조직배양의 방법을 통하여 몇 종의 희귀종에 대한 증식연구 결과가 발표된 바 있다(Moon et al. 1999; Yoon 1997; Bae et al. 2009; Bae et al. 2010; Bae et al. 2012a; Bae and Choi 2013; Bae et al. 2013). 돌나물과 식물에서 조직배양을 통한 연구는 평의비름(*Hylotelephium erythrostictum*)의 잎과 줄기 절편(Yoon 1997)으로부터 부정아유도를 통한 식물체 재생에 관한 연구, 돌나물(*Sedum sarmentosum*)의 옆절편으로부터 식물체 재분화에 관련한 연구(Ahn and Lee 2004), 홍경천(*Rhodiola rosea*)의 액아배양을 통한 식물체 생산(Bae et al. 2012b)가 진행되었다. 또한 본 연구자에 의해 동종인 둥근잎평의비름(*H. ussuriense*) 화아 유래 캘러스로부터 식물체 생산(Kwon and Yoon 2010)연구결과 캘러스 유래 식물체를 다수 생산할 수 있었다. 하지만 캘러스 유래 식물체는 생산까지 1년 이상의 시간이 소요되고 캘러스 유래 부정아 출현빈도가 낮아 연구노력에 비해 생산효율이 떨어지는 단점이 있었다. 하지만 무균액아는 무균식물체만 있으면 다량으로 확보가 가능한 배양소재이고 건전한 유식물체를 생산할 수 있는 장점이 있다. 따라서, 본 연구는 멸종위기에 처한 둥근잎평의비름의 보존과 증식을 위하여, 기내 식물체 재분화 체계를 확립하고자 액아 유래 신초 형성과 식물체 재분화에 미치는 식물생장 조절물질 및 배양용기의 환기에 따른 영향을 확인코자 수행되었다.

재료 및 방법

식물재료 및 배양조건

본 연구에 사용된 둥근잎평의비름(*Hylotelephium ussuriense* (Kom.) H. Ohba)의 기내배양 식물체는 Kwon과 Yoon(2010)에 의해 화뢰와 옆절편으로부터 유래된 것을 사용하였다. 모든 배양환경은 1일 16시간 조명($40 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 백색 형광등), $25\pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지되는 조건에서 배양하였으며, 실험에 사용한 모든 배지는 12°C , 1.5기압으로 20분간 멸균하였다. 배지는 Petri-dish(90×15 mm)에 30 mL, Incu Tissue ($72\times 72\times 100$ mm, SPL, Korea)에 각각 100 mL씩 배지를 분주하여 사용하였다.

식물생장조절물질 및 배양부위에 따른 부정아 유도

기내 둥근잎평의비름의 액아(axillary bud) 포함 줄기와 액아 비포함 줄기절편을 각각 2 cm의 길이로 시료를 조제하였다. 부정아 유도배지는 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에 30 g/L sucrose, 0.3 g/L gelrite가 첨가된 고체배지에 0, 0.5, 1.0, 3.0 mg/L의 6-benzylaminopurine (BA)과 0, 0.01, 0.05 mg/L의 Indoleacetic acid (IBA)를 각각의 농도별로 혼용하여 배지를 조제하였다. 절편은 각 처리 당 10 개씩 3 반복하여 치상하였다. 배양 6주 후 절편 당 부정아의 유도수를 조사하였다.

배지 및 sucrose농도에 따른 신초증식

둥근잎평의비름의 액아가 포함된 절편을 6주간 배양하여 유도된 부정아를 절편으로부터 분리하여 신초의 신장 및 발달에 미치는 배지 및 sucrose의 적정농도를 알아보기 위하여 1/2MS, MS, 및 2MS배지에 0, 10, 30, 50 g/L의 sucrose가 첨가된 배지를 조제하여 각 처리구 당 15 개체씩 3 반복하여 치상하였다. 광주기 1일 16시간 조명($40 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 백색 형광등), $25\pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지되는 조건에서 8주간 배양한 후 각 절편 당 줄기와 뿌리의 길이를 조사하였다.

배양용기의 환기에 따른 기내 신초증식

배양용기의 환기 유무가 기내 건전 조직배양묘 생육에 미치는 영향을 확인하기 위해 초장 4 cm의 둥근잎평의비름 유식물체를 재료로 사용하였다. 배양용기의 환기처리 배양용기(가우즈, 대한민국) 뚜껑 중앙에 1 cm의 구멍을 만들고 그 구멍에 환기가 가능한 3M filter tape을 붙인 것을 사용하였다. 비환기처리 용기는 사각배양용기($72\times 72\times 100$ mm, SPL, 대한민국)를 사용하였다. 배양용기 당 10 개체씩 3 반복하여 치상하였고, 6주후에 발달된 줄기와 뿌리의 수와 길이를 조사하였다. 신초증식배지는 1/2MS배지 (sucrose 30 g/L, gelrite 3.0 g/L)를 사용하였다. 배양묘의 건전도를 확인하기 위해 옆절편을 재료로 사용하여 엽록소의 함량을 측정하였다. 옆 절편을 0.5×0.5 cm의 크기로 절단하여 80% acetone용액에 침지하여, 암조건에서 48시간 추출하여 chlorophyll a와 b의 함량을 분광광도계(Shimadzu, UV-1650PC, Japan)를 이용하여 흡광도 663 nm, 645 nm에서 측정하여 Lichtenthaler (1987)의 방법으로 엽록소의 양을 계산하였다.

통계분석

모든 데이터는 means \pm standard deviation으로 표시하였다. 변이들의 집단 간 차이를 알아보기 위해서 one-way ANOVA

를 실시하였고, 유의성이 있는 경우 Duncan's multiple range test로 사후검증을 실시하였다. 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 로 설정하여 분석하였다.

결과 및 고찰

식물생장조절물질 및 배양부위에 따른 부정아유도

등근잎평의비름의 줄기절편의 액아유무에 따른 식물생장조절물질의 종류와 농도에 따른 부정아 유도조건을 알아보기 위해 BA와 IBA가 혼용 처리된 배지에 액아포함 줄기와 액아 미포함 줄기를 치상하여 6주후에 부정아 유도를 조사하였다. 그 결과 3.0 mg/L의 BA와 0.01 mg/L IBA를 혼용처리배지에 액아포함 줄기를 배양하였을 때 절편 당 8.6개의 가장 많은 부정아가 유도되었다(Table 1). 호르몬 무처리 배지에서는 액아포함 줄기(Fig. 1A)와 액아 미포함 줄기(Fig. 1B)에서 6주간 배양한 결과 두 절편 모두 부정아가 유도되지 않았다. 그러나 BA와 IBA를 혼용처리한 배지에 액아 미포함 줄기를 절단하여 6주간 배양한 결과 절단면에서 짙은 초록색의 부정아가 유도된 것을 관찰하였고(Fig. 1C), 액아포함 줄기를 배양 한 경우 액아부분에서 부정아가 다량으로 유도됨을 확인하였다(Fig. 1D). 한편 액아 미포함 줄기를 BA와 IBA가 혼용된 배지에 치상하여 배양한 경우 모든 배지조성에서 절단면 양 끝을 통해 2~3개 정도의 부정아가 유도되었다(Table 1). 등근잎평의비름 액아포함 줄기절편으로부터 부정아를

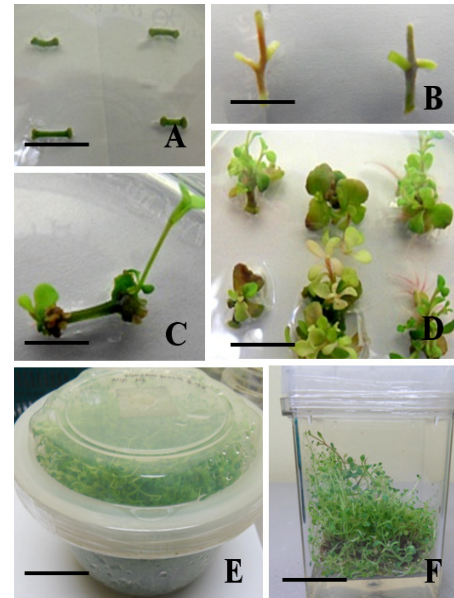


Fig. 1 Adventitious shoot induction and in vitro plant regeneration from stem explants (with axillary bud and without axillary bud) of *H. ussuriense*. (A) Stem without axillary bud explant on MS medium without BA and IBA after 6 weeks of culture (scale bar : 1 cm), (B) Stem with axillary bud explant on MS medium without BA and IBA after 6 weeks of culture (scale bar : 1 cm), (C) Stem without axillary bud explant on MS medium with 3.0 mg/L BA and 0.01 mg/L IBA after 6 weeks of culture (scale bar : 1 cm), (D) Stem with axillary bud explant on MS medium with 3.0 mg/L BA and 0.01 mg/L IBA after 6 weeks of culture (scale bar : 1 cm), (E) in vitro plantlet growth under ventilation after 8 weeks of culture (scale bar : 5 cm), (F) in vitro plantlet growth under non-ventilation after 8 weeks of culture (scale bar : 5 cm)

Table 1 Effect of BA and IBA on adventitious shoot induction from stem with axillary bud and stem without axillary bud of *H. ussuriense* after 6 weeks of culture

Plant growth regulator (mg/L)		No. of adventitious shoot/explant	
BA	IBA	With axillary bud	Without axillary bud
0	0	0.0±0.0 ^{aj}	0.0±0.0 ^b
	0	3.6±1.5 ^{hi}	2.3±0.5 ^a
0.5	0.01	6.9±1.2 ^c	2.8±0.5 ^a
	0.05	7.3±0.6 ^b	3.1±0.6 ^a
	0	3.6±1.1 ^{hi}	2.9±0.5 ^a
1.0	0.01	6.8±1.3 ^{cd}	2.6±0.6 ^a
	0.05	5.1±1.1 ^{ef}	2.1±0.5 ^a
	0	4.2±0.9 ^{gh}	2.6±0.3 ^a
3.0	0.01	8.6±0.6 ^a	2.3±0.4 ^a
	0.05	6.8±0.8 ^{cd}	2.9±0.5 ^a
	0	3.6±0.7 ^h	2.6±0.4 ^a
5.0	0.01	5.6±0.6 ^c	2.5±0.6 ^a
	0.05	4.2±1.1 ^g	2.9±0.4 ^a

*Data are the means ± SD, of three experiments. Different alphabetical letters are significantly different according to Duncan's multiple range test at $P < 0.05$

유도한 경우 BA의 농도는 3.0 mg/L 미만, IBA의 농도는 0.01 mg/L를 처리하였을 때 부정아의 유도개수는 증가하였다. 이러한 결과는 고농도 cytokinin의 처리는 부정아의 정상적인 성장을 억제한다는 연구 보고와 일치하였다 (Moon et al. 1999; Moon et al. 2002). 옥신과 cytokinin은 절편체의 탈분화 및 분화에 있어 필수적인 요소이며 (Chen et al. 1985) 동일 속이라 할지라도 배양에 이용되는 조직 절편체의 종류 및 첨가되는 식물생장조절제의 농도에 따라 캘러스 형성 양상이 크게 다르다 (Ryu et al. 1992). 이와 같이 같은 *Sedum* 속 식물에서도 식물생장조절제에 대한 캘러스 형성 반응이 다른 것은 식물종에 따라서 내생호르몬의 종류 및 함량의 차이가 있기 때문인 것으로 사료된다.

MS배지 및 sucrose농도에 따른 신초증식

MS 배지 및 sucrose농도가 줄기절편 유래 둥근잎평의비름 부정아의 기내 식물체 분화에 미치는 영향을 조사하기 위해 기내 유도된 둥근잎평의비름 부정아를 1/2, 1, 2 MS배지에 0, 30, 50 g/L의 sucrose를 각각 첨가하여 제조된 배지에 치상하여 8주후에 분화율을 확인하였다. 그 결과 2MS에 50mg/L sucrose를 첨가한 실험에서 줄기길이

11.1 cm와 뿌리길이 5.6 cm로 가장 높게 조사가 되었지만, 모든 실험에서 대조구에 비해 유의적인 결과를 나타내지는 못했다 (Table 2). Sucrose는 대사활동에 필요한 에너지원으로 세포벽 구성물질 등으로 이용될 뿐 아니라 식물체 및 배양체의 삼투조절제로서의 역할을 수행한다. 기내 배양시 sucrose 농도의 감소는 고농도의 sucrose에 비해 CO₂를 증가시켜 광합성능을 향상시키는 역할을 수행하며 독립영양체 식물로서의 발달을 도모한다 (Gabriela et al. 2005). 고농도 sucrose는 잎이 발생되지 않고 구근의 비대가 촉진되거나 캘러스가 다량 발생하는 반면 저농도의 sucrose는 배지 내 영양분 흡수를 촉진시키고 생장억제물질의 생성을 감소시킴으로써 구근의 형성 및 엽상인편의 발달을 촉진하는 역할을 수행한다 (Takayama and Misawa 1979; Magdalena and Anna 2005). 이러한 연구결과를 바탕으로 둥근잎평의비름 기내 식물체 재분화에 중요한 영향을 미칠 것으로 예상을 하였으나 배양배지의 농도, sucrose의 농도는 둥근잎평의비름 기내 식물체 재분화에 크게 영향을 주지 않는 것으로 보여진다 (Table 2). 한편, 본 연구에서는 둥근잎평의비름 기내 식물체 분화에 미치는 활성탄 (Activated charcoal, AC)의 영향에 대해서는 연구하지 않았으나, AC의 첨가는 조직배양 시 autoclave 처리 후 gelling제에 의해 pH가 낮아지는 현상을 방지하

Table 2 Effect of medium strength and sucrose concentration on plant regeneration from adventitious shoot of *H. ussuriense* on medium including 30 g/L sucrose after 8 weeks of culture

MS strength	Sucrose (g·L ⁻¹)	Length of shoot/explant (cm)	Length of root/explant (cm)
1/2	0	8.7 ± 2.3 ^a	5.2 ± 1.9 ^a
	30	8.4 ± 2.5 ^a	5.3 ± 1.7 ^a
	50	9.1 ± 2.9 ^a	5.4 ± 1.2 ^a
1	0	8.8 ± 2.2 ^a	5.1 ± 1.3 ^a
	30	9.3 ± 2.6 ^a	5.3 ± 1.9 ^a
	50	8.9 ± 2.3 ^a	5.2 ± 1.3 ^a
2	0	9.8 ± 2.6 ^a	5.6 ± 1.4 ^a
	30	8.9 ± 2.3 ^a	5.2 ± 1.3 ^a
	50	11.1 ± 2.2 ^a	5.6 ± 1.2 ^a

*Data are the means ± SD, of three experiments. Different alphabetical letters are significantly different according to Duncan's multiple range test at P < 0.05

Table 3 Effect of ventilation on growth and chlorophyll contents from regenerated plants of *H. ussuriense* on medium including 30 g/L sucrose after 8 weeks of culture

Treatment	Frequency of growth			Chlorophyll contents (mg/g)		
	Length of shoot (cm)	Length of root (cm)	Fresh weight/explant (g)	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total chlorophyll
Vent.	22.8 ± 3.6 ^{*a}	11.6 ± 4.4 ^a	5.3 ± 0.9 ^a	2.22 ± 0.12 ^a	0.88 ± 0.22 ^a	3.12 ± 0.11 ^a
Non-vent.	11.6 ± 4.6 ^b	10.8 ± 2.3 ^a	2.6 ± 1.2 ^b	2.11 ± 0.88 ^b	0.78 ± 0.19 ^b	2.89 ± 0.22 ^b

*Data are the means ± SD, of three experiments. Different alphabetical letters are significantly different according to Duncan's multiple range test at P < 0.05. Vent. were means Ventilation

며 배지의 pH를 안정화 시켜 세포의 성장과 발달의 영향을 줄 뿐 아니라(Eymar et al. 2000; Pan and van Staden 1998) 신초 형성 및 뿌리 유도를 촉진하는 역할을 한다고 보고 하였다(Dumas and Monteuis 1995). 이러한 선행연구 결과를 바탕으로 차후 실험에서는 활성탄의 효과를 확인하는 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

환기에 따른 기내 증식 및 엽록소 함량 분석에 따른 기내 건전묘 생산

환기처리에 따른 둥근잎평의비름의 성장결과는 Table 3과 같다. 줄기의 신장은 환기처리에 따라 뚜렷한 차이를 보였으며, 환기처리구에서는 22.8 cm, 비환기처리구는 11.6 cm로 조사되었다. 그러나 뿌리길이의 신장은 환기처리구와 비환기처리구에서 유의적인 차이가 없었다(Table 3). 생중량으로 관찰한 식물체의 생장은 환기처리구에서 높게 나타났고, 엽록소 a, b 및 총엽록소 함량은 대체로 환기처리구에서 높게 나타났(Table 3). 환기처리한 배양병에서 생육한 둥근잎평의비름 유식물체는 생육이 양호함을 확인하였다(Fig. 1E). 그러나 비환기처리구는 배양 4주후부터는 생육이 불량함을 확인하였다(Fig. 1F). 기내 배양 시 유식물체의 생장이나 액아의 생육이 억제되는 것은 에틸렌 축적과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다(Gonzalez et al. 1997). 또한, 유칼립투스 펠리타(Kim and Moon 2006)와 덩굴용담(Moon and Park 2008)의 기내배양에서도 유사한 결과가 관찰되었다. 본 실험을 통해 둥근잎평의비름의 기내 건전 식물체 생육을 위해서는 생장은 배양용기 환기의 중요성을 보여주었다. 일반적으로 환기가 불량한 배양용기에서는 상대습도가 높고 이산화탄소의 변동이 크며, 에틸렌이나 다른 유독성 가스가 축적되므로 광합성 효율이 저하되고 호흡, 수분흡수 및 무기염류의 흡수가 저하되고 이산화탄소가 부족해진다. 이러한 상태가 지속되면 암호흡이 증가되어 식물 생장이 저하되고 더불어 기내식물의 생리적, 형태적 기형을 유발한다(Zobayed 2005). 따라서 배양목적에 따라 다를 수 있으나 배양용기의 개선, 특히 환기가 가능한 배양용기의 사용은 보다 건전한 식물체 생산이 가능함을 시사하고 있다.

적 요

멸종위기수종인 둥근잎평의비름 기내 부정아유도에 미치는 식물생장조절물질의 종류 및 배양부위의 영향과 기내생육 및 엽록소함량에 미치는 배지, sucrose 농도 및 배양용기에 따른 환기효과를 연구하였다. 부정아 유도는 3.0 mg/L의 BA와 0.01 mg/L의 IBA가 첨가된 배지에 액아 포함 줄기를 배양하였을 때 가장 효과적이었다. 기내 부

정아의 줄기와 뿌리 신장에 MS배지의 농도와 sucrose의 농도는 영향을 주지 않았다. 환기처리가 기내 건전 식물체 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 기내 환기처리구는 줄기신장에 효과적이었고, 뿌리의 신장은 유의적 차이는 없이 모든 실험구에서 10 cm 이상 증식하였다. 엽록소의 함량은 환기처리 시 총엽록소 함량이 3.12 mg/g으로 높게 나타남을 확인하였다. 둥근잎평의비름의 부정아 유도에 농도와 배양부위가 중요한 요인으로 작용하고 기내 식물체 신장에 미치는 배지 및 sucrose농도의 영향은 크지 않은 것으로 나타났다. 기내 건전식물체의 생산은 환기가 용이한 배양용기하에서 양호한 것으로 나타났다.

References

- Ahn JH, Lee SY (2004) Effects of growth regulators on callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Sedum sarmentosum*. *Kor J Plant Biotechnol* 31:25-29
- Bae KH, Yoo KH, Lee HB, Yoon ES (2012a) Callus induction and plant regeneration of *Iris dichotoma* Pall. in endangered species. *J Plant Biotechnol* 39:182-188
- Bae KH, Ko MS, Kim NY, Song JM, Song G (2012b) In vitro propagation and multiple shoot induction of *Rhodiola rosea* L. by axillary bud culture. *J Plant Biotechnol* 39:114-120
- Bae KH, Choi YE (2013) Factors affecting fruit bearing in natural habitat and in vitro culture of zygotic embryos of *Cypripedium japonicum*. *Prog Ornament Plant* 11:146-152
- Bae KH, Kim CH, Sun BY, Choi YE (2010) Structural changes of seed coats and stimulation of in vitro germination of fully mature seeds of *Cypripedium macranthos* Swartz by NaOCl pretreatment. *Prog Ornament Plant* 10:107-113
- Bae KH, Ko MS, Lee MH, Kim NY, Song JM, Song G (2013) Effects of NaOCl treatment on in vitro germination of seeds of a rare endemic plant, *Oreorchis coreana* Finet. *J Plant Biotechnol* 40:43-48
- Bae KH, Kwon HK, Choi YE (2009) In vitro germination and plantlet conversion from the culture of fully mature seeds of *Cypripedium guttatum* Swartz. *Prog Ornament Plant* 9:160-165
- Chen TH, Lam L, Chen SC (1985) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultures inflorescence of *Oryza sativa* L.. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 21:111-117
- Chung TH (1974) Korean flora (Herb part). Seoul, Academybook, p.283
- Dumas, E, Monteuis O (1995) In vitro rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants influence of activated charcoal. *Plant Cell, Tissue and Org. Cult.* 40:231-235
- Eymar, E, Alegre J, Toribio M, Lopez-vela D (2000) Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine on in vitro nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica*. *Plant Cell, Tissue and Org. Cult.* 63:57-65
- Gabriela, F, Carlos T, Carlos O, Yves D, Jorge MS (2005)

- Exogenous sucrose can decrease in vitro photosynthesis but improve field survival and growth of coconut (*Cocos nucifera* L.) in vitro plantlets. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 41:69-76
- Gonzlez A, Arigita L, Majada J, Snchez Tams R (1997) Ethylene involvement in in vitro organogenesis and plant growth of *Populus tremula* L. *Plant Growth Regul*. 22:1-6
- Jang JG (2001) *Sanyacho Dongeubogam*. Academy press, Seoul, pp.156-157
- Jeong JH (1999) Growth and flowering response of potted *Sedum rotundifolium* to low temperature, photoperiod and GA3. *J Kor Soc Hort Sci* 40:761-764
- Jeong JH (2001) Critical daylength for flower bud formation and development of *Sedum rotundifolium*. *J Basic and Life Res Sci* 1:219-222
- Jeong JH, Kwon ST (2003) Induction daylength period for flower bud formation and development of *Sedum rotundifolium*. *J Kor Flower Res Soc* 11:225-228
- Kim JA, Moon HK (2006) Effect of light-emitting diodes (LEDs) and ventilation on the in vitro shoot growth of *Eucalyptus pellita*. *J Korean For Soc* 95:716-722
- Kwon HK, Yoon ES (2010) Effect of plant growth regulators on plant regeneration from the *Sedum rotundifolium* D. Lee. *J Plant Biotechnol* 37:84-88
- Lee, YM, Lee WY (1997) Illustrated rare and endangered species in Korea. Korea National Arboretum. Po-cheon, Korea. p. 41
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomenbranes. *Meth Enzymol* 148:350-382
- Magdalena, K, Anna B (2005) Morphogenesis of *Lilium martagon* L. explants in callus culture. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. 47:65-73
- Ministry of Environment (MEV). (2005) Enforcement decrees drafted for the Wildlife Protection Act. Gwacheon, Korea. p-83
- Moon HK, Noh EW, Ha YM, Shim KK (2002) Micropropagation of juvenile and mature tree of *Corylopsis coreana* by axillary bud culture. *Kor J Plant Tiss Cult* 29:117-121
- Moon HK, Suk GY, 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, Park SY (2008) Effect of different light sources and ventilation on in vitro shoot growth and rooting of a rare and endangered species, *Tsuru-rindo* (*Tripterospemum japonicum*). *J Plant Biotechnol* 35:215-221
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-479
- Pan, MJ, van Staden J. (1998) The use of charcoal in in vitro culture-a review. *Plant Growth Regulator*. 26:155-163
- Ryu JH, Doo HS, Kwon TH (1992) Induction of haploid plants by anther culture in sesame (*Sesamum indicum* L.). *Kor J Plant Tissue Cult* 19:171-177
- Seo, CB (1979) Illustrated Flora of Korea, Hyangmoonsa, Seoul, Korea. pp.206-209
- Takayama, S, Misawa M (1979) Differentiation in *Lilium* bulb scales grown in vitro. Effect of various cultural conditions. *Physiology Plantarum* 46:184-190
- Yoon ES (1997) Effect of plant growth regulators on plant regeneration from leaf and stem explants cultures of *Sedum erythrostichum* Miq. *Kor J plant Tissue Cult* 24:285-289
- Zobayed SMA (2005) Ventilation in micropropagation. T. Kozai et al. (eds). Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system, Springer, pp.147-186