

가시없는 블랙베리(*Rubus fruticosus* L. cv. BB21)의 근맹아를 이용한 다경유도와 절간배양을 통한 식물체 증식조건의 확립

이강섭 · 김효진 · 박대현 · 오승철 · 조한직 · 김이엽

Establishment of optimal conditions for micropropagation by node culture and multiple shoots formation from sucker explants of thornless Blackberry (*Rubus fruticosus* L. cv. BB21)

Kang Seop Lee · Hyo Jin Kim · Dae Hyun Park · Seung Cheol Oh · Han Jig Cho · Ee Youb Kim

Received: 26 April 2018 / Revised: 12 June 2018 / Accepted: 12 June 2018

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract This study was conducted to develop a simple, rapid, and reliable method for *in vitro* propagation of disease-free and true-to-type clones from sucker explants of thornless blackberry (*Rubus fruticosus* L. × *R. parvifolius* L.). To induce multiple shoots, the sucker explants were sterilized in 1% NaOCl solution, and then were aseptically cultured on the full and 1/2 MS solid medium supplemented with BAP (0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L). After six weeks of culture, the highest frequency (85.4%) of shoot formation from sucker explants was obtained on the full-strength MS medium with 1.0 mg/L BAP. Node explants obtained from multiple shoots were cultured on the various media of full- or half-strength of AD, B5, MS, SH, QL, WPM media, respectively. After 30 days of culture, plant growth was good on the half-AD, half-QL medium. After 90 days of culture, plant growth was good on the full MS and full SH medium. The survival rate of the plantlets after transfer to plastic pots containing soil mixture (sand: soil: vermiculite was 1:1:1, vol.) in the greenhouse was 98%. The results indicate that a multiple-shoot

procedure can be applied for an efficient mass propagation of *Rubus fruticosus* L. × *R. parvifolius* L.

Keywords Blackberry, Node culture, multiple shoots, Sucker, *Rubus fruticosus*

서 언

나무딸기는 장미과 나무딸기 속(*Rubus*)에 속하는 관목성 식물로서, 이 속에 속하는 식물로는 400여종이며 북반구의 온대와 한대지방에 널리 분포하고 있으며, 품종 개량된 재배종은 Rapsberry, Blackberry, Juberry 계통으로 분류되고 있다 (Thompson, 1997). 국내 주요 나무딸기 종에는 북분자딸기 (*Rubus coreanus* Miquel), 산딸기(*Rubus crataegifolius* BUNGE), 명석딸기(*Rubus parvifolius* LINNAEUS), 곰딸기(붉은 가시딸기, *Rubus phoenicolasius* MAXIMOWICZ), 장딸기(*Rubus hirsutus* THUNBERG), 수리딸기(*Rubus corchorifolius* L. fil), 섬딸기 (*Rubus ribesioideus* MAISUMURA), 겨울딸기(*Rubus buergeri* MIQUEL), 줄딸기(*Rubus oldhamii* MAXIMOWICZ)가 있다. 주요 성분으로 플라보노이드(Kim et al. 1997), 탄닌(Kim et al. 1996; Kim et al. 2000), 페놀성 화합물 β-시스토스테롤(Wang and Lin 2000) 등을 함유하고 있어, 향산화 작용(Kim et al. 2000; Wang and Lin 2000; Cho et al. 2004)과 항암작용(Casto et al. 2002; Kresty et al. 2006)이 높은 것으로 보고되어 있다.

블랙베리의 증식방법에는 종자번식, 경삽, 근삽 그리고 조직배양의 방법 등이 있다. 종자번식은 배의 발육과 후숙이 잘 이루어지지 않는 결실종자이므로 발아율이 저조하고,

[†]These authors contributed equally to this work.

K. S. Lee[†] · H. J. Kim (✉) · D. H. Park · S. C. Oh · H. J. Cho · E. Y. Kim
농업회사법인 주식회사 바이오플러스 기업부설연구소
(Bioplus Co., LTD, 312, Changjogwan, 224, Wanjusandan 6-ro, Bongdong-eup, Wanju-gun 55315, Korea)
e-mail: cattleya77@naver.com

K. S. Lee[†] · H. J. Kim (✉)
농업회사법인 주식회사 바이오플러스
(Bioplus Co., LTD, 312, Changjogwan, 224, Wanjusandan 6-ro, Bongdong-eup, Wanju-gun 55315, Korea)

발아가 되더라도 열매의 수확시기가 늦어져 초기 수확량이 감소된다. 삼목의 경우 낮은 발근율로 인하여 얻을 수 있는 개체수가 적고, 시간이 오래 걸리는 단점이 있다. 그러나 조직배양기술을 이용하면 위에서 언급한 번식방법의 여러 단점들을 극복할 수 있다(Bobrowski et al. 1996; Debmath 2004; Meng et al. 2004). 나무딸기류에서 배양을 통한 식물체의 재생에 관한 보고를 보면, 가지 없는 나무딸기의 shoot tip을 재료로 다양한 배지와 식물생장조절물질을 사용하여 다경과 발근을 유도한 바있다(Skirvin et al. 1981). 나무딸기의 뿌리에서 유래한 신초의 절편체(Fernandez and Clark 1991), 잎과 옆병 절편체(Meng et al. 2004), 기내의 액아로부터 다경을 유도하거나(Debnath 2004), 기내에서 배양된 잎으로부터 신초를 재생시킨 경우가 있다(Turk et al. 1994). 이와 같이 기존연구에서 다양한 실험재료를 사용하였지만 생장이 왕성한 근맹아(根萌芽, sucker)를 절편체로 사용한 경우는 일부 블랙베리 품종에서 보고되고 있으나 극히 빈도가 저조한 실정이다(Shin et al. 2005; Shin et al. 2008).

본 연구의 실험재료로 사용한 *Rubus fruticosus* L. cv. BB21은 *Rubus fruticosus* L. × *R. parvifolius* L. 교잡 블랙베리 V3품종을 모본으로 방사선돌연변이 육종에 의해 선발된 V9품종의 조직배양체에 방사선을 처리하여 선발육종된 품종이다. BB21 품종의 특징은 가시가 없고, 과실이 크고, 과중과 당도가 각각 4.81 ~ 8.03 g/개, 8 ~ 14 brix로 높아서 농촌 소득작물로서 부가가치가 높아 이에 대한 품종의 적합한 번식방법이 시급히 필요하다. 따라서 본 연구는 근맹아 절편 배양을 통한 BB21 품종의 묘목을 대량으로 번식시키기 위한 체계의 확립이 절실히 요구되는 바, 조직배양기법을 통한 우량계통의 신속한 증식방법 및 효과적인 환경 조성을 구명하고자 배지 및 성장조절물질 등의 단일 및 혼합처리를 시도하였다.

재료 및 방법

식물재료

사용된 재료는 (주)바이오플러스 부설농장에서 시험재배되고 있는 신품종중 *Rubus fruticosus* L. cv. BB21 품종으로 명명한 개체로서, 땅속에서 채집된 근맹아 절편체를 본 실험에 사용하였다. 시험 재배되고 있는 품종들은 가지없는 블랙베리 품종(*Rubus fruticosus* L. cv. Black V3)을 모본으로 방사선돌연변이 육종에 의해 선발된 V5, V7 V9품종과 V9품종의 조직배양체에 방사선을 처리하여 선발육종된 품종들 10여종이 재배되고 있다. BB21품종은 ^{60}Co 감마선 80Gy 처리구에서 선발한 품종이다.

소독방법 및 배양조건

3월경에 채취된 근맹아 재료는 일차적으로 세척제와 흐르는 물을 이용하여 30분 처리하였다. 2차 소독은 70% EtOH에 1분, sodium hypochlorite 1% 용액에 15분간 침적하여 표면 살균한 후, 멸균수로 3-4회 세척한 다음, 멸균된 filter paper 상에서 수분을 제거하였다. 약 3×3 mm의 크기로 세절한 재료는 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지에 치상하였다. 배지는 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L BAP (6-benzylaminopurine)를 첨가한 다음 pH 5.8로 조정하고 30 g/L sucrose, 4 g/L gelrite를 첨가한 후 121°C, 1.2 기압 하에서 15분간 고압 증기 멸균하였다. 멸균된 배지를 페트리디쉬 (Φ90 × 15 mm, 또는 90 × 40 mm)에 20 mL씩 분주하여 사용하였으며, 배양은 온도 24±1°C, 광도 46 μmol/cm²/sec, 광주기 16/8 시간 조건에서 실시하였다.

근맹아로부터 다신초유도

소독이 끝난 근맹아를 3×3 mm의 크기로 세절하여, 절편체는 식물생장조절물질로 BAP (6-benzylaminopurine), Kinetin (6-furfurylaminopurine), 2iP (6-γ-γ-(dimethylallylamino)-purine)가 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L가 각각 첨가된 MS배지에 치상하였다. 치상은 페트리디쉬 당 10개씩 3반복으로 6주간 배양하였다(Fig. 1).

절간배양으로부터 신초형성에 미치는 식물생장조절물질의 영향

근맹아 절편체로부터 형성된 신초를 약 6주간 배양하여 충분히 성장시켜 무균상태조건하에서 유식물체 절간의 절편체를 3×3 mm의 크기로 세절하여 (0, 0.1, 1.0 mg/L) IBA와 사이토키닌으로는 (0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L) BAP, Kinetin, 2iP를 각각 조합, 첨가한 배지에서 6주간 배양하였다.

신초로부터 절간배양 및 순화

기내에서 유도된 다경(multiple shoot)으로부터 소식물체의 증식을 위해 절간배양(node culture)을 수행하고자, 유도된 신초를 재료로 잎을 제거하여 절간의 크기를 3×3 mm로 하여 배지의 조건을 0.1 mg/L BAP가 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962), SH (Schenk and Hildebrandt 1972), AD (Anderson 1980), B5 (Gamborg 1968), WPM (Lloyd and McCown 1981), QL (Quoirin and Lepoivre 1977)배지와 상기 배지의 농도를 1/2로 희석한 배지를 사용하여 30일, 90일간 배양하여 배양기간의 영향을 비교하였다. 식물체의 토양 순화는 신초와 뿌리가 잘 발달된 정상적인 식물체를 모래, 토양, 그리고 버미큘라이트가 혼합된 토양(1:1:1, v/v)에 직접 이식하여 온실에서 실시하였다.

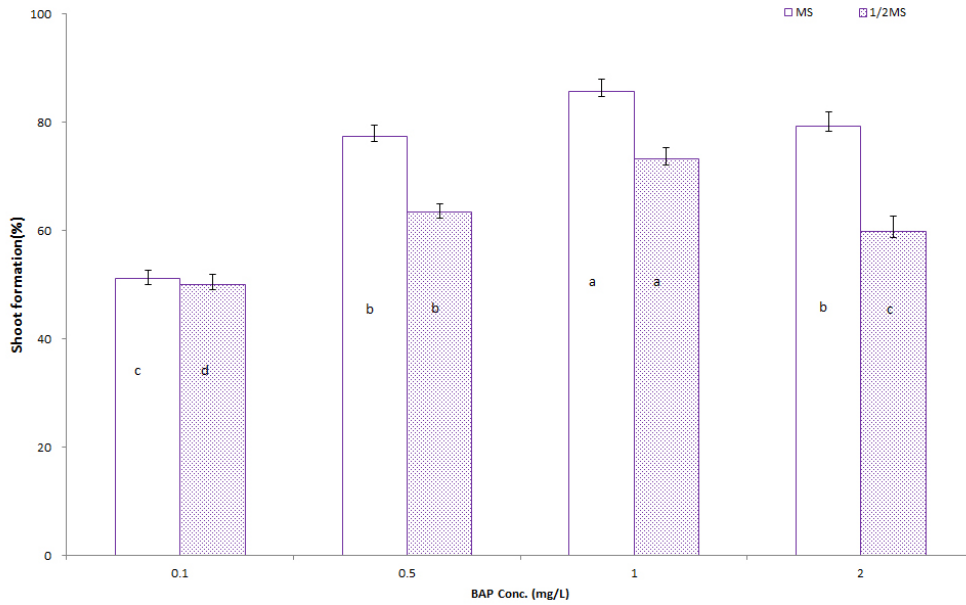


Fig. 1 Frequency of multiple-shoot formation from sucker explant cultured on MS and 1/2 MS medium containing BAP after six weeks of culture

*Means with the same letters are not significantly different at $p = 0.05$ according to the Duncan's multiple-range test

결과 및 고찰

근맹아로부터 신초유도

본 실험에 사용된 식물체는 방사선을 이용한 돌연변이 육종으로 개발한 *Rubus fruticosus* L. cv. BB21 품종으로서 본 연구에 사용한 근맹아 절편체는 겨울과 이른 봄 사이에 사용할 수 있는 특히, 다경의 유도에 매우 적합한 재료로 생각할 수 있다(Shin et al. 2005). 근맹아 절편체에 1.0, 2.0 mg/L BAP가 첨가된 MS기본배지에 6주간 배양한 결과, 두 가지 조건의 배지 모두에서 50% 이상의 다경이 유도되었다(Fig. 2). 근맹아는 분열조직으로서 생장이 왕성하기 때문에 배지에 첨가한 BAP의 영향으로 인한 신초 형성이 빠르게 이루어졌다. 이와 같은 결과는 다른 종의 블랙베리에서도 유사하게 관찰되는 현상이다(Bobrowski 1996).

또한 MS배지에 0.5, 1.0, 2.0 mg/L BAP 처리구에서 모두 75% 이상의 다경형성률을 1/2MS배지에서는 약 60%정도 다경형성률을 나타내었다. 이와 같은 결과는 블랙베리(*Rubus fruticosus*)의 다경유도에서 BAP를 단독처리 한 것이 IBA와 BAP를 복합처리 한 것보다 높다는 보고와 일치하였다(Shin et al. 2005). 여러 품종의 블랙베리를 재료로 한 연구에서 BAP의 단독 처리는 BAP와 다른 호르몬의 복합 처리의 경우에 비하여 신초 증식률이 높았는데(Bobrowski et al. 1996), 이것은 대부분 식물의 기내증식에 있어서 신초의 유도 및 증식은 처리된 사이토키닌의 영향을 크게 받으며 BAP의 처리가 가장 주효하다는 보고(Cuenca et al. 1999; Han et al. 2004)와 일

치한다. 그러나 TDZ가 BAP보다 더 효과가 높다는 보고가 있으며(Turk et al. 1994), 또한 블랙베리의 품종 사이에서도 다경 증식률의 차이가 있다(Bobrowski et al. 1996). 이러한 현상은 기본적으로 종과 품종의 차이에 기인하는 것으로 Wu et al. (2009)이 언급한 바와 같이 *Rubus*에는 다양한 품종이 존재하거나 개발되고 있기 때문에 적절한 연구는 꾸준히 이루어져야 함을 제시하고 있다.

절간배양으로부터 신초형성에 미치는 식물생장조절물질의 영향

근맹아 절편체로부터 형성된 다신초를 충분히 성장시켜 무균상태의 유식물체로부터 절간을 6주간 배양하여 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L BAP, Kinetin, 2iP를 각각 단독처리한 배지에서 신초형성률은 BAP처리구에서 가장 높게(97.6%) 나타났으며, 2iP, Kinetin 순으로 형성되었다. 그리고 BAP처리구의 경우 농도에 비례하여 발생된 신초의 수가 증가하였고, Kinetin 처리구의 경우도 농도가 높아짐에 따라 신초의 수가 소폭 증가(80%)함을 알 수 있었다. 그러나, 2iP처리구의 경우는 농도가 높아질수록 형성된 신초의 수가 줄어드는 경향을 보였다(data 미제시). 처리한 사이토키닌 단독처리구에 0, 0.1, 1.0 mg/L IBA를 첨가한 결과 신초형성률은 오히려 감소하였다(Fig. 2). 또한 BAP농도보다 IBA의 농도가 높은 처리구에서는 캘러스가 형성되어 신초의 형성은 이루어지지 않았다. 이러한 경향은 BAP의 단독 처리구와 달리 BAP와 다른 식물생장조절물질의 혼용 처리가 신초 증식률이 높은 경향을 나타낸다는 보고(Bobrowski et al. 1996)와는 상반되나, BAP에

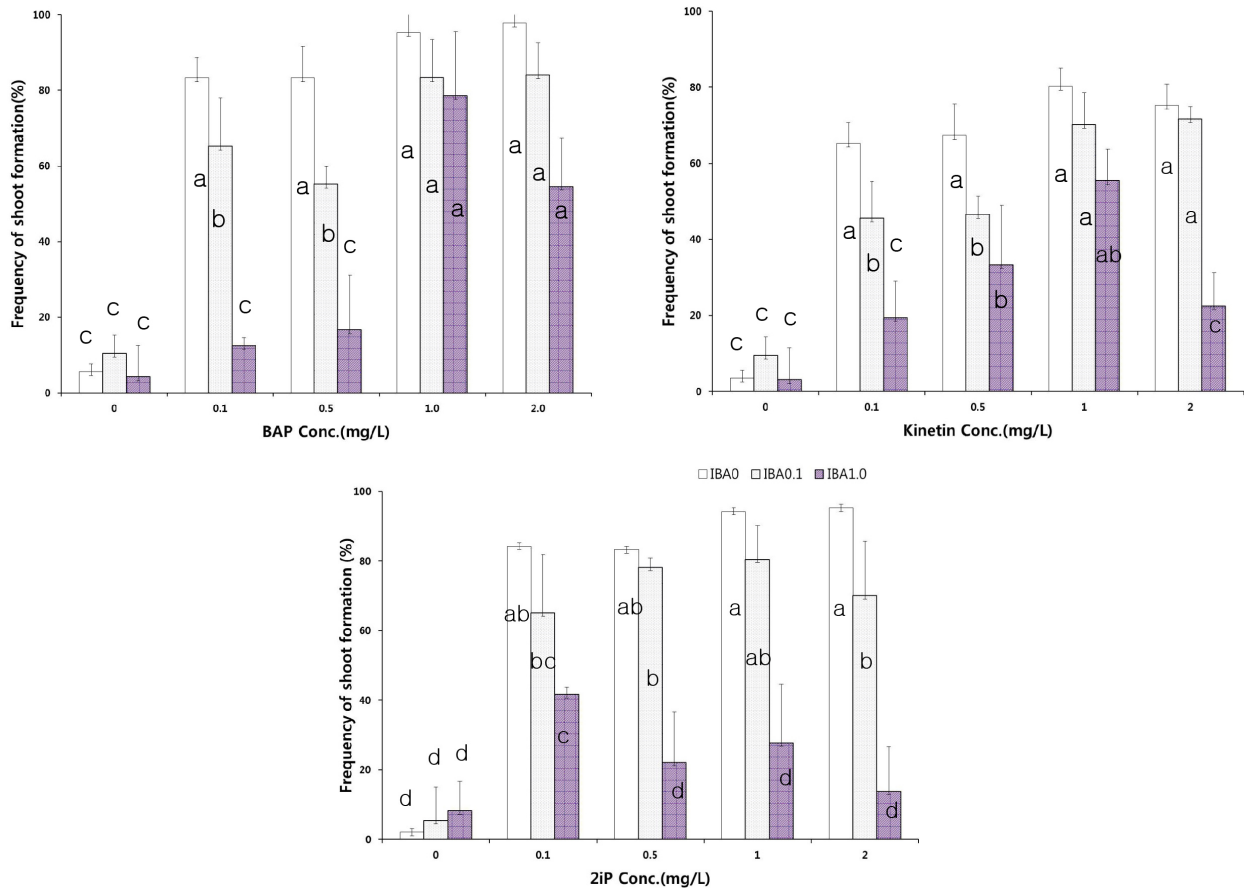


Fig. 2 Effects of BAP and IBA on shoot formation from node explants of *Rubus fruticosus* L. cv. BB21 after six weeks of culture

IBA를 혼용 처리시 효과적이 않다는 보고와는 일치한다 (Shin et al. 2005). 이것은 대부분 식물의 기내증식에 있어서 신초의 유도 및 증식은 처리된 사이토키닌의 영향을 크게 받으며 BAP의 처리가 가장 주효하다는 보고(Cuenca et al. 1999; Han et al. 2004)와 일치한다. 이와 같이 사이토키닌에 대한 반응은 Turk et al. (1994)이 보고한 여러 품종의 블랙베리를 재료로 한 연구에서 BAP보다는 TDZ가 효과적이며, 다양한 품종 사이에서 다경형성률의 차이가 있음이 보고(Bobrowski et al. 1996)되고 있어, 종과 품종의 차이에 따라 반응하는 다양성으로 인한 결과라 사료되며, 차후에도 품종과 배양조건에 따른 연구는 계속되어야 할 것으로 사료된다.

신초로부터 절간배양 및 순화

Rubus 속의 종과 품종에 있어서 식물체의 재생률이 저조하여 실용화의 어려운 점이 있어, 이를 극복하고자 기내에서 빠른 신초의 발생을 위해 다양한 배지와 식물생장조절물질에 관한 연구가 진행되고 있다(Wu et al., 2009). 본 연구에 있어서도 기내에서 유도된 다경의 소식물체의 안정적인 증식을 위해 절간배양을 AD (Anderson 1980), B5 (Gamborg. 1968), MS (Murashige and Skoog. 1962), SH (Schenk and Hildebrandt. 1972),

QL (Quoirin and Lepoivre. 1977), WPM (Lloyd and McCown. 1981)배지와 이들 배지의 각각의 무기염류의 수준을 절반으로 한 1/2배지에서 시도하였다. 배지 별 배양결과, 초기의 생육(30일)에 있어서 생장은 배지 간에 차이를 관찰할 수 있었다. 특히, 1/2AD, 1/2QL 배지에서 가장 양호하여, 초장 생장은 각각 평균 13.8 mm, 14.0 mm를 나타내었으며, 절간수도 각각 약 3.8, 4.4개를 나타내었다. 그리고 뿌리 및 생중량 다경유도 모두 양호하였다(data 미제시). 본 연구에 사용된 블랙베리의 절간배양 시 초기생장기간에 있어서는, 상기 배지 종류별 1/2배지의 경우에 양호하였으나, 90일간 장기배양할 경우에는 1/2배지에서 보다 full strength의 배지에 배양한 경우에 양호한 성장을 나타내었다(Fig. 3). 초기 생장에서는 1/2AD, 1/2QL 배지가 양호한 반면, 90일간 배양한 경우 생장에서는 MS배지가 초장의 길이가 약 20.9 mm로 가장 양호하였으며, AD, SH 순으로 양호하였다. 절간수는 AD배지에서 가장 많이 형성되었으며 SH, MS 순으로 나타났다. 그리고 뿌리, 생중량, 다경유도 모두 MS 배지에서 양호하였다. 이와 같은 결과는 초기 생장에는 작은 절편체에서 생장에 필요한 영양분의 흡수로 인해 무기염류가 1/2로 감소된 수준의 배지에서 양호하였으나, 계속된 배양으로 인해 소식물체의 성장과 배지내의 무기염류와 탄소원의 감소로 인하여 소식물

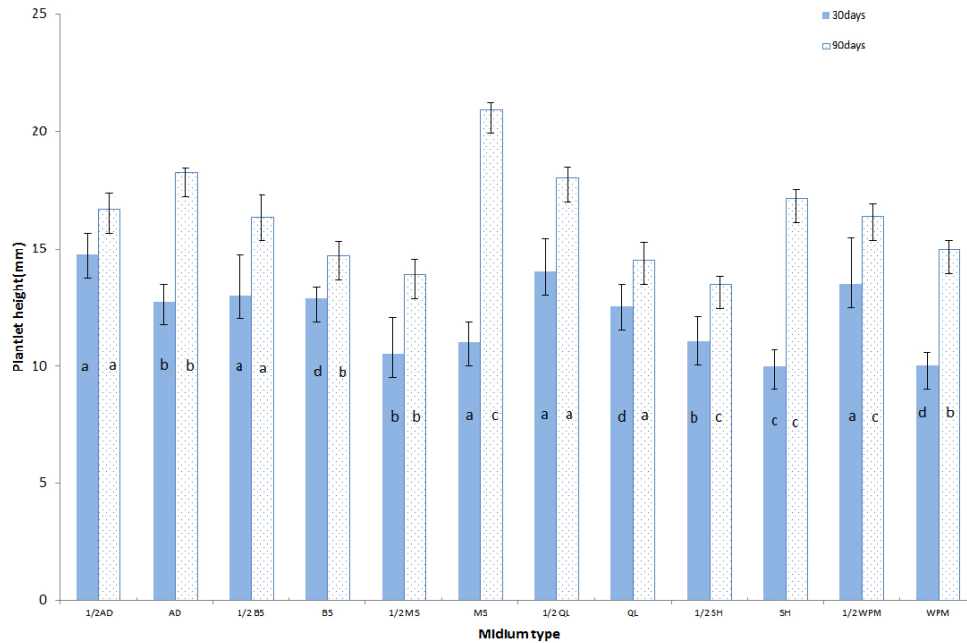


Fig. 3 Effects of different culture mediums and culture period on shoot height from node culture of *Rubus fruticosus* L. cv. BB21. Data represent the mean \pm SE of three replicates. Means with the same letter are not significantly different at $p = 0.05$ according to the Duncan's multiple-range test

체의 성장이 늦게 진행되는 반면, 기내에서 배양기간이 길어짐에 따라서 소식물체의 성장은 배지내의 무기물의 함량이 많은 배지에서 원활한 성장이 이루어진 것으로 사료된다. 배양 과정중 소식물체의 엽색을 관찰한 결과, 다른 처리구의 배지에서 성장하는 소식물체들의 잎은 진한 초록색을 나타낸 반면, 1/2SH배지 처리구에서 성장한 소식물체는 백화현상이 관찰되었다. 이러한 백화현상을 제거하기 위한 시도는 Wu et al. (2009)이 빛의 세기를 조절함으로써 극복하고자 하였는데, 본 연구에서의 결과에 나타난 바와 같이 배지의 선택을 함으로써 백화현상을 극복할 수 있음이 관찰되었다. 이와 같은 결과는 다경유도시 포플러에서는 MS 보다 1/2MS 배지가 더 높은 다경 형성률을, 산사나무의 다경유도시엔 WPM과 MS 배지보다 LS 배지가 다경 형성률이 양호한 경우가 있어 배지의 무기염류양과 종류에 따라 다경유도시 발생되는 신초의 형성률에 차이가 있을 수 있다(Kang et al. 2004). 나무딸기의 여러 품종에서는 MS 배지와 1/2MS 사이에 유의한 차이가 없다는 보고도 있어(Turk et al. 1994), 재로 식물의 종류나 배양체의 종류에 따라서 다른 결과가 나타날 수 있다고 사료된다.

나무딸기류 중에서 가지 없는 블랙베리는 Broome and Zimmerman (1978)에 의하여, 블랙라스베리(black raspberry)는 Harper (1978)에 의해 최초로 기내배양이 수행된 후에, 많은 보고들이 이루어지고 있다. 지난 몇 년 동안 배양증식기술의 발전에도 불구하고 기존의 품종과 새로 나온 품종간의 낮은 증식율과 유전적 다양함으로 인하여 조직배양에 어려운 점이 있는 실정이다(Zawadzka and Orlikowska 2006; Wu et

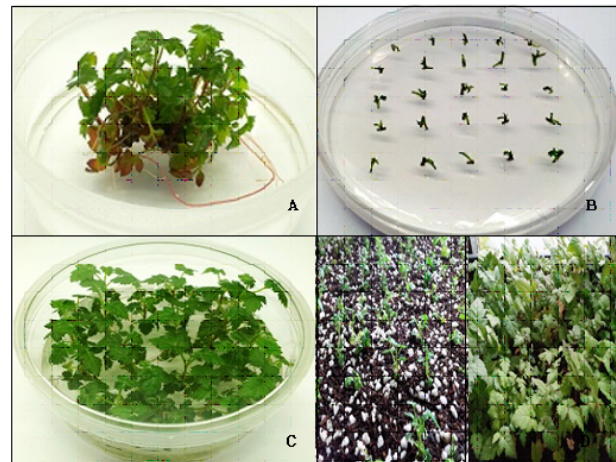


Fig. 4 Multiple shoot induction and acclimatization. A, multiple shoots obtained from sucker explant after six weeks of culture. B, shoots obtained from node explants after six weeks of culture. C, plantlets regenerated from node explants. D, plantlets acclimatized in pots containing vermiculite in the greenhouse after six weeks of planting (right)

al. 2009). 따라서 상업적인 품종의 경우엔 다양한 품종에 대하여 다양한 배지와 식물생장조절물질의 사용 등과 같은 여러 요인에 관한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서 기내에서 유도된 다경(multiple shoot)의 소식물체의 증식을 위해 기내에서 유도된 신초로부터 절간배양(node culture)을 수행하였다(Fig. 4). 근맹아 절편체로부터 얻어진 신초(Fig. 4A)의 잎을 제거하여 절간의 크기를 3×3 mm

로 세절하고 배양하여 신초를 유도하고(Fig. 4B), 이를 $\Phi 90 \times 40$ mm의 배양접시에서 신초와 뿌리가 잘 발달된 유식물체를 유도하였다(Fig. 4C). 생장이 좋은 유식물체를 모래, 토양, 그리고 버뮤클라이트가 각각 혼합된 토양(1:1:1, v/v)에 이식하여 약 6주간 순화를 유도하였다(Fig. 4D). 순화된 식물체를 토양에 이식하였을 경우 약 98%의 생존율을 나타내었으며, 안정적으로 순화되어 성장됨을 확인 할 수 있었다. 이상의 결과를 통하여 육종을 통한 블랙베리 묘목은 대량생산이 가능하고, 관련 농가에 원활한 공급이 가능할 것으로 예상된다.

적 요

본 연구에 사용한 식물체는 *Rubus fruticosus* L. cv. BB21은 *Rubus fruticosus* L. \times *R. parvifolius* L. 교잡 블랙베리 V3품종에서 방사선을 처리하여 돌연변이로 선발 육종된 V9계통 중 다시 방사선을 처리하여 선발육종된 품종이다. 이러한 우량계통의 신속한 증식을 이루기 위하여 조직 배양을 통한 효과적인 방법을 구명하고자 배지 및 성장조절물질 등의 처리에 따른 안정적인 생산을 위해 본 연구가 수행되었다. 망속에서 채집된 근맥아 절편체를 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L BAP가 첨가된 MS와 1/2MS 배지에 치상하여 6주간 배양한 후, 다경의 형성률을 조사하였다. 형성된 다경으로부터 산업적으로 이용하기 위한 안정된 생산을 위하여, 신초의 잎을 제거한 후 절간배양을 수행하여 다수의 소식물체를 증식하고자 여러 종류의 배지 즉, AD (Anderson 1980), B5 (Gamborg 1968), MS (Murashige and Skoog 1962), SH (Schenk and Hildebrandt 1972), QL (Quoirin and Lepoivre 1977), WPM (Lloyd and McCown 1981)배지와 상기의 각각의 동일배지의 무기염류의 수준을 절반으로 한 1/2배지에 배양하였다. 초기의 생육(30일간 배양 시)에 있어서 생장은 배지 간에 차이를 나타내어 1/2AD, 1/2QL 배지에서 가장 양호한 초장을 나타내었으며, 절간수도 약 3.8, 4.4개를 나타내었으며, 뿌리, 생중량 다경유도 모두 양호하였다. 90일간 배양한 경우에는 MS배지가 초장이 가장 양호하였으며 AD, SH 순으로 양호한 결과를 나타내었다. 식물체의 토양 순화는 신초와 뿌리가 잘 발달된 정상적인 식물체를 모래, 토양, 그리고 버뮤클라이트가 혼합된 토양(1:1:1, v/v)에 각각 직접 이식하여 실시한 결과, 식물체의 발근율과 생존률(약98%)을 나타내었다. 이상의 결과를 통하여 블랙베리 묘목의 대량생산이 가능하여 농가에 원활한 공급이 가능할 것으로 예상된다.

사 사

본 연구는 농림축산식품부 농림수산식품기술기획평가원의 농생명산업기술개발사업의 연구비 지원에 의해 수행되

었습니다(315025-03).

References

- Anderson (1980) Tissue culture propagation of red and black raspberries (*Rubus idaeus* and *R. occidentalis*) Acta Hort. 112:13-20
- Bobrowski VL, Mello-Farias PC and Peters JA (1996) Micropropagation of blackberries (*Rubus* sp.) cultivars. Rev. Bras. de Agrociencia 2: 17-20
- Broome OC, Zimmerman RH (1978) *In vitro* propagation of blackberry. HortSci 13:151-153
- Casto BC, Kresty LA, Kraly CL, Pearl DK, Knobloch TJ, Schut HA, Stoner GD, Mallery SR and Weghorst CM (2002) Chemoprevention of oral cancer by black raspberries. Anticancer Res. 22:4005-4015
- Cho MJ, LR Howard, RL Rrior and JR Clark (2004) Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. J SCI Food AGR 84(13):771-1782
- Cuenca S, JB Amo-Marco and R Parra (1999) Micropropagation from inflorescence stems of the Spanish endemic plant *Centaurea paui* Loscos ex Willk. (Compositae). Plant Cell Rep 18:674-679
- Debnath SC (2004) Clonal propagation of dwarf raspberry (*Rubus pubescens* Raf.) through in vitro axillary shoot proliferation. Plant growth regul 43:179-186
- Fernandez GE and JR Clark (1991) *In vitro* propagation of the erect thornless 'Navaho' blackberry. Hortscience 26(9):12-19
- Gamborg. O., Miller, R and Ojima, K. (1968) Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. Experimental Cell Research (50):151-158
- Han MS, HK Moon, YJ Kang, WW Kim, BS Kang and KO Byun (2004) Micropropagation of an endangered species, *Stellera rosea* Nakai by tissue culture. Korean J Plant Biotechnol 31: 31-35
- Harper PC (1978) Tissue culture propagation of blackberry and tayberry. Hortic Res 18:141-143
- Kang HD, HK Moon, IS Park and MS LEE (2004) Effect of TDZ (Thidiazuron) on shoot proliferation of Peace poplax. Korean J Plant Biotechnol 31:49-53
- Kim KH, Lee YA, Kim JS, Lee DI, Choi YW, Kim HH and Lee MW (2000) Antioxidative activity of tannins from *Rubus coreanum*. Yakhak Hoeji 44:354-357
- Kim MS, GC Pang and MV Lee (1997) Flavunoids from the leaves of *Rubus coreanum*. Yakhak Hoeji 40: 666-669
- Kim MS, KC Pang and MW Lee (1996) Tannins from the leaves of *Rubus coreanum*. Yakhak Hoeji 40:666-669
- Kresty LA, Frankel WL, Hammond CD, Baird ME, Mele JM, Stoner GD and Fromkes JJ (2006) Transitioning from preclinical to clinical chemopreventive assessments of lyophilized blackberries: interim results show berries modulate markers

- of oxidative stress in Barrett's esophagus patients. *Nutrition and Cancer* 54:148-156
- Linsmaier EM, Skoog F (1975) Organic growth factor requirements of tobacco, *Physiol. Plant* 18:100-127
- Lloyd G. and Mccown B. (1981) Commercially feasible micro-propagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *Combined Proceeding of the International plant Propagation Society* 30:421-426
- Meng R, Chen THH, Finn CE and Li YH (2004) Improving *in vitro* plant regeneration from leaf and petiole explants of 'Marion' blackberry. *Hortscience* 39(2):316-320
- Murashige T and F Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497
- Quoirin M, Lepoivre P (1977) Improved medium for in vitro culture of *Prunus* sp, *Acta Hortic* 78:437-442
- Schenk T, Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50:199-204
- Shin JS, JC Lee, LK Sim, TY Yoon, HJ Cho and EY Kim (2008) Plant regeneration via multiple shoot formation from sucker explant of hybrid blackberry (*Rubus fruticosus* L. × *R. parvifolius* L.). *Korean J Plant Resource* 21(2):111-116
- Shin JS, OK Sim, JC Lee, HJ Cho, EY Kim and KS Lee (2005) Plant regeneration via multiple shoot formation from sucker explants of *Rubus fruticosus* L. *Korean J Plant Resource* 18(3):456-461
- Skirvin RM, MC Chu and E Gomez (1981) *In vitro* propagation of thornless trailing blackberries. *Hortscience* 16(3):310-312
- Thompson MM (1997) Survey of chromosom number in *Rubus* (Rosaceae: Rosoideae). *Ann Mol Bot Garden* 84:129-165
- Turk BA, HJ Swartz and RH Zimerman (1994) Adventitious shoot regeneration from *in vitro*-cultured leaves of *Rubus* genotypes. *Plant Cell Tiss Org cult* 38:11-17
- Wang SY and HS Lin (2000) Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J Agr Food Chem* 48(2): 140-146
- Wu J-H, SA Miller, HK. Hall, PA Mooney (2009) Factors affecting the efficiency of micropropagation from lateral buds and shoot tips of *Rubus* *Plant Cell Tiss Org* (2009) 99:17-25
- Zawadzka M and T Orlikowska (2006) Increase in the quality of raspberry cultures under the influence of FeEDDHA. *Acta Hortic* 725:161-164