

# 에케베리아 라우이(*Echeveria laui*)와 엘레강스(*Echeveria elegans*)의 대량증식을 위한 조직배양 및 순화 조건 확립

김윤희 · 이지영 · 김혜형 · 이재홍 · 정재홍 · 이상덕

## Establishment of tissue culture and acclimatization method for *in vitro* mass propagation of *Echeveria laui* and *Echeveria elegans*

Youn Hee Kim · Gee Young Lee · Hye Hyeong Kim · Jae Hong Lee · Jae Hong Jung · Sang Deok Lee

Received: 18 March 2019 / Revised: 21 March 2019 / Accepted: 21 March 2019

© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** The objective of this study was to investigate the suitable parts for callus induction and optimal concentrations of growth regulators contained in the medium affecting shooting and rooting *Echeveria laui* and *Echeveria elegans* for *in vitro* mass production. To determine the suitable plant parts for callus induction, the leaves were divided into upper, medium and bottom parts and cultured on MS medium at different concentrations with 0 ~ 2 mgL<sup>-1</sup> NAA and 0 ~ 4 mgL<sup>-1</sup> BA. The upper and middle parts of leaves both showed 100% callus formation rate with NAA 1 mgL<sup>-1</sup> and BA 1 mgL<sup>-1</sup> treatment in *E. laui*. The middle parts of leaves showed 83.3% callus formation rate at NAA 2 mgL<sup>-1</sup> and BA 4 mgL<sup>-1</sup> treatment in *E. elegans*. The shoot induction rate from callus was highest at NAA 0.1 mgL<sup>-1</sup> and BA 3 mgL<sup>-1</sup> treatment in *E. laui* and NAA 0.3 mgL<sup>-1</sup> in *E. elegans*. In addition, the number of shoots formation was 10.4 shoots high in NAA 1 mg L<sup>-1</sup> and BA 1 mgL<sup>-1</sup> treatment in *E. laui* and 12.0 shoots in most effective NAA 1 mgL<sup>-1</sup> and BA 0.1 mg L<sup>-1</sup> treatment in *E. elegans*. In the case of acclimatization of regenerated plant, growth characteristics did not show any significant difference (35 ~ 55%) shading with respect to the

different ratio of substrate mixture, and it was determined that would be appropriate considered plant height and appearance preference of *E. laui* and *E. elegans*. It was established that the optimization of culture condition was responsible for the mass propagation *in vitro* cultures of *E. laui* and *E. elegans*.

**Keywords** Acclimatization, *Echeveria*, Growth regulators, Propagation, Regenerated shoot

### 서론

다육식물(多肉植物)은 줄기나 잎, 뿌리에 수분을 많이 함유하고 있는 유조직, 즉 저수 조직이 발달하여 두꺼운 육질을 이루고 있는 식물을 말한다. 식물분류학상 약 50과 1만종이 넘는 식물이 있으며, 아프리카 남부를 중심으로 아프리카 대륙 전체, 마다가스카르섬, 아메리카 남서부, 멕시코 등지에 분포하고 있다(Park et al. 2008). 에케베리아(*Echeveria*)는 멕시코를 중심으로 한 남아메리카가 원산지(Jorge et al. 2003)이며 140여종으로 매우 다양하다(Eric 1972). 전 세계적으로 600여종의 에케베리아 품종이 생산·판매되고 있으며(Lorraine et al. 2005), 최근 국내외에서 가장 많이 유통되고 있는 다육식물 중 하나이다. 대부분의 에케베리아는 로제트형의 다육식물로 잎이 다양한 색상을 가지고 있으며 잎 무늬가 있거나 백분이 있는 종, 광택이 있는 종, 솜털이 있는 종 등 다양하고, 다른 분화작물에 비해 삽목 번식과 재배관리가 용이한 장점이 있다(Attila et al. 2004). 그러나 에케베리아 중 증식율이 낮은 라우이(*Echeveria laui*)는 로제트형으로 백분 발생이 많은 식물로 관상가치가 높으나, 엽삽으로 번식 할 때

† Contributed equally

Y. H. Kim (✉) · G. Y. Lee · J. H. Lee · J. H. Jung · S. D. Lee  
경기도농업기술원 선인장다육식물연구소  
(Cactus and Succulents Research Institute, GARES, Goyang-si,  
Gyeonggi-do, Republic of Korea)  
e-mail: sky3884@gg.go.kr

H. H. Kim  
경기도농업기술원 원예연구과  
(Horticultural Research Division, GARES, Hwaseong, 18388,  
Korea)

재배기간 중 고사율이 높아 증식에 어려움이 있는 식물이고, 엘레강스(*Echeveria elegans*)는 원산지인 멕시코 멸종 위기종으로 지정되어 있다(Arias et al. 2005). 이에 대량증식이 가능한 종묘생산기술(Guadalupe et al. 1999)로서 조직배양이 하나의 대안으로 주목 받고 있으나 고부가 다육식물인 에케베리아에 관한 조직배양 연구는 미미한 실정이다.

국내에서는 돌나물과(Crassulaceae)에 속하는 세덤 속(*sedum*) 다육식물의 기내 재분화 연구는 돌나물(*Sedum sarmentosum*)의 잎 절편으로부터 캘러스 형성 연구(Ahn and Lee 2004), 홍경천(*Rhodiola sachalinesis*)의 엽육 절편으로 캘러스 형성 및 식물체 분화에 미치는 영향(Bae et al. 2005), 둥근잎평의비름(*Sedum rotundifolium*)의 식물체 재분화에 미치는 식물 성장조정제 영향(Kwon and Yoon 2010), 주걱비름(*sedum tosaense*)의 잎 절편으로부터 기내 식물체 재분화 및 토양 순화 연구(Ko et al. 2013) 등이 보고 되었으며, 국외에서는 에케베리아 엘레강스(*Echeveria elegans*)의 액아 배양 연구(Solis et al. 2013), 크라슐라 헬름시(*Crassula helmsii*)의 기내 재분화 연구(Kane et al. 1993), 칼랑코에 적토이(*Kalanchoe tomentosa*) 재분화 형성 연구(Saifullan et al. 2006) 및 세덤속의 멸종 위기식물인 세일 돌나물(*Hylotelphium sieboldii*)의 부정아 발생 연구(Nakano et al. 2005), 썬페르비름속의 텍토룸(*Sempervivum tectorum*)의 캘러스 유도 및 신초 재분화 형성 연구(Dobos et al. 1994) 등의 기내 재분화에 대하여 연구한 바 있으나, 에케베리아 기내 대량증식과 종묘활용에 관한 연구는 많지 않다. 또한, 조직배양에서 얻은 식물체는 잎의 왁스층과 기공의 발달이 매우 부진하여 건조한 외부 환경과 접촉 시 수분의 손실에 대해 방어를 할 수 없을 정도로 조직 배양 중의 잎은 약해 있는 상태로 유식물체의 기외 순화단계에서 고사하는 경우가 많으므로 재분화체의 순화연구도 필수적으로 동반된다(Grout and Aston 1977; Sutter and Langhans 1982; Wetzstein and Sommer 1982).

따라서 본 연구는 에케베리아 라우이(*Echeveria laui*)와 엘레강스(*Echeveria elegans*)의 균일묘 대량생산을 위한 기내 대량증식 조건을 확립하고 재분화체의 기외 순화조건을 구명하고자 본 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 배양조건

실험에 사용한 *E. laui*와 *E. elegans*는 경기도 고양시 지역의 농가 수집종으로 경기도농업기술원 선인장다육식물연구소에서 재배 관리하면서 식물재료로 사용하였다. 조직배양에 사용한 식물재료인 잎은 흐르는 수돗물에 2~3회 수세한 후 70% EtOH에서 30초간 소독과 증류수 수세를 3회 반복한 후 Tween-20을 첨가한 0.3% NaOCl 용액에 침지하여 15분간 교반하였다. 전처리가 완료된 시료는 클린벤치 내에서 멸균된 증

류수로 3회 세척하고 물기를 제거한 후 성장조정제가 처리된 배양배지에 치상하였고 광주기 16/8시간(광/암), 광도  $60 \pm 0.2 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , 온도  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지되는 조건에서 배양하였다.

### 배지

MS (Murashige and Skoog, 1962) 배지에 3% sucrose와 0.7% agar를 첨가한 후 옥신류인 NAA (Naphthaleneacetic acid)와 사이토닌류인 BA (6-Benzylaminopurine)를 단용 또는 혼용 첨가하여 배지를 조제하였고, pH는  $5.7 \pm 0.1$ 로 조정하였다. 실험에 사용한 모든 배지는  $121^\circ\text{C}$ , 1.5기압으로 15분간 멸균하였고 배양용기(100×40 mm)에 분주하여 사용하였다.

### 캘러스 유도

캘러스 유도에 적합한 잎의 부위를 선발하고자 기부로부터 상부(upper), 중부(middle), 하부(bottom)로 3등분 한 후 0.5~1 cm 길이로 절단하여 NAA 0, 1, 2  $\text{mgL}^{-1}$ 와 BA 0, 1, 2, 3, 4  $\text{mgL}^{-1}$ 를 각각 농도별로 조합처리하였다. 잎 절편은 각 처리별 15개씩 4반복하여 배양하였고 배양 16주 후 캘러스 형성율을 조사하였다.

### 신초 유도

식물체 재분화에 미치는 성장조정제의 농도를 구명하기 위해 잎으로부터 형성된 캘러스를  $0.5 \times 0.5 \text{ cm}$  크기로 절단하여 NAA 0, 0.1, 1  $\text{mgL}^{-1}$ 와 BA 0, 0.1, 1, 2, 4  $\text{mgL}^{-1}$ 를 각각의 농도별로 조합 처리한 배지에서 신초 분화를 유도하였다. 각 처리별 15개씩 4반복으로 치상하였으며 배양 16주 후 신초 발생율을 조사하였다.

### 신초 증식 및 발근유도

신초로부터 신초의 증식 및 발근을 유도하기 적합한 성장조정제의 종류와 적정 농도를 구명하기 위해 뿌리를 절단한 약 2 cm의 신초를 NAA 0, 0.1, 1  $\text{mgL}^{-1}$ 와 BA 0, 0.1, 1, 2, 4  $\text{mgL}^{-1}$ 를 각각의 농도별로 치상하여 신초 증식과 발근을 유도하였다. 각각 배양용기(100×40 mm)에 15주씩 4반복하여 완전한 식물체로 판단되는 신초의 증식 개체수, 엽수, 발근율을 배양 12주(*E. laui*), 16주 후(*E. elegans*) 조사하였다.

### 식물체 순화

뿌리와 신초가 정상적으로 발달한 기내 식물체의 순화에 적합한 방법을 구명하기 위하여 혼합 용토와 흑색 차광막 3수준으로 처리를 하였다. 식물체를 정식하기 전에 차광 55%에서 1일간 기외 순화를 거친 후 배지를 흐르는 물에 깨끗이 씻

은 뒤 혼합 용토에 정식하였다. 혼합 용토는 질석 : 펄라이트 = 1:1(v:v), 질석 : 펄라이트 = 1:2(v:v), 질석 : 펄라이트 : 피트모스 = 1:1:1(v:v:v), 질석 : 펄라이트 : 피트모스 = 1:1:2(v:v:v)로 처리하였으며, 순화에 적합한 차광 정도를 구명하고자 차광막은 흑색 차광막 35, 55, 75%를 3수준으로 정식하였다. 순화된 식물체는 7 cm 사각포트에 심어 20주씩 5반복으로 습도 72±2%, 온도 23±2°C 조건에서 재배하였으며 정식 3주 후에 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 캘러스 유도

*E. laui*와 *E. elegans*의 캘러스 유도에 적합한 성장조정제의 적정 농도 및 배양부위를 선별하고자 잎 상부, 중부, 하부로 구분하여 NAA와 BA의 농도별로 배양한 결과는 Table 1과 같다.

*E. laui*의 캘러스 형성율은 엽상부에서는 NAA 1 mgL<sup>-1</sup> +

BA 1 mgL<sup>-1</sup>, NAA 2 mgL<sup>-1</sup> + BA 1~2 mgL<sup>-1</sup> 혼용배지에서 100%, 엽중부에서는 NAA 1 mgL<sup>-1</sup> + BA 1 mgL<sup>-1</sup> 혼용배지에서 100%, 엽하부에서는 NAA 2 mgL<sup>-1</sup> + BA 1 mgL<sup>-1</sup> 혼용배지에서는 86.7%로 가장 높은 캘러스 형성을 하였다. 따라서 *E. laui*의 캘러스 유도에는 엽상중부의 캘러스 형성율이 높았던 NAA 1 mgL<sup>-1</sup> + BA 1 mgL<sup>-1</sup> 혼용배지를 이용하는 것이 효율적으로 판단되었다.

*E. elegans*는 *E. laui*보다는 전반적으로 캘러스 형성율이 낮은 편이었으며, 캘러스 형성율은 엽상부와 엽중부에서는 NAA 2 mgL<sup>-1</sup> + BA 4 mgL<sup>-1</sup> 혼용배지에서 각각 66.7%, 83.3%, 엽하부에서는 NAA 2 mgL<sup>-1</sup> + BA 2 mgL<sup>-1</sup> 혼용배지에서 53.3%로 높았다. 반면, 무처리와 엽중하부 BA 단용배지에서 캘러스가 전혀 형성되지 않았으며, 캘러스 형성시 *E. elegans*에서는 *E. laui*보다는 고농도의 BA가 요구되었다. 또한 무처리에서는 녹색 잎 절편에 엽록소가 없어지는 백화현상(白化現象)을 보여 캘러스 형성에는 식물성장조정제가 필요한 것으로 생

**Table 1** Effect of growth regulators on callus formation from *in vitro* part of leaf segment of *Echeveria laui* and *Echeveria elegans*

Cultivar	Growth regulators (mgL <sup>-1</sup> )		Callus formation (%)		
	NAA	BA	Leaf upper	Leaf medium	Leaf bottom
<i>E. laui</i>	0	0	0i	0k	0i
	0	1	46.7g	33.3i	0i
	0	2	40.0h	46.7h	0i
	0	3	46.7g	20.0j	0i
	0	4	73.3d	43.3i	6.7h
	1	0	6.7i	46.7h	13.3g
	1	1	100a	100a	60.0b
	1	2	86.7c	83.3de	46.7c
	1	3	66.7e	66.7f	33.3e
	1	4	66.7e	86.7d	33.3e
	2	0	53.3f	43.3i	33.3e
	2	1	100a	96.7b	86.7a
	2	2	100a	86.7d	40.0d
	2	3	93.3b	90.0c	40.0d
	2	4	53.3f	63.3g	13.3g
	<i>E. elegans</i>	0	0	0g	0h
0		1	0g	0h	0g
0		2	0g	0h	0g
0		3	6.7d	0h	0g
0		4	20.0d	0h	0g
1		0	0g	43.3e	13.3e
1		1	0g	56.7cd	6.7f
1		2	13.3e	33.3f	0g
1		3	6.7d	20.0g	0g
1		4	13.3e	40.0e	20.0d
2		0	20.0d	56.7cd	33.3c
2		1	20.0d	60.0c	20.0d
2		2	40.0b	73.3b	53.3a
2		3	33.3c	33.3f	20.0d
2		4	66.7a	83.3a	40.0b

<sup>a</sup>Cultured on MS medium containing various plant growth regulators for 30 days

<sup>b</sup>Mean separation within columns by Duncan's multi range test (P=0.05)

각된다. 이러한 결과로 캘러스 형성율이 가장 높았던 엽중부를 이용하여 NAA 2 mgL<sup>-1</sup>+BA 4 mgL<sup>-1</sup> 혼용배지가 캘러스 형성에 유리할 것으로 판단되었으며, 행운목(*Dracaena fragrans*)의 잎 절편 배양의 경우에도 잎상부, 중부, 하부 중에 중부잎의 NAA 0.5 mgL<sup>-1</sup> + BA 1.0 mgL<sup>-1</sup> 혼용배지에서 70%이상의 캘러스 형성을 보인 연구결과(Ko et al. 2011)와 일치하였다. 이와 같이 엽 치상부위 및 배지에 첨가하는 생장조정제의 종류와 농도에 따라 캘러스의 양상이 크게 다르게 나타나며 (Rha et al. 1992) 캘러스 유도과 성장에는 세포의 성장과 분열을 촉진하는 옥신이 필수적이고, 사이토키닌은 세포 분화를 촉진하는 작용을 한다고 보고되고 있다(Delvlin 1975; Skoog et al. 1965). 돌나물과 *sedum*속 식물인 주걱비름(*sedum tosaense*)의 잎 절편으로부터 NAA 1 mgL<sup>-1</sup>+BA 2 mgL<sup>-1</sup> 혼용배지에서 100%의 캘러스 형성을 보인 연구결과(Ko et al. 2013), 둥근잎 평의비름(*Sedum rotundifolium*)의 캘러스 유도에는 잎 절편체

에서 NAA 1.0~2.0 mgL<sup>-1</sup>+BA 1.0 mgL<sup>-1</sup> 혼용배지에서 100%의 캘러스 형성을 보인 연구결과(Kwon and Yoon 2010), 안개초(*Gypsophila paniculata*)의 경정과 마디배양에서 NAA 1 mgL<sup>-1</sup> + BA 0.5~1.0 mgL<sup>-1</sup> 혼용배지에서 캘러스 유도에 적합한 조합이라는 연구결과(Cheong et al. 2004), 지황(*Rehmannia glutinosa*)의 엽육조직에서 NAA 0.5 mgL<sup>-1</sup>+BA 2.0 mgL<sup>-1</sup> 혼용배지에서 100%의 캘러스 형성을 보인 연구결과(Park et al. 1998)를 나타냈다. 이와 유사하게 본 연구에서도 *E. elegans*의 잎 절편으로부터 NAA와 BA 혼용배지에서 캘러스 형성이 높은 경향을 보였다.

신초 유도

캘러스로부터 신초 유도에 적합한 NAA 및 BA 농도를 단용 및 혼용 처리한 결과 Table 2와 같다. *E. laui*는 배양 4주 후 캘

**Table 2** Effect of plant growth regulators on shoot formation from callus of *Echeveria laui* and *Echeveria elegans*

Cultivar	Growth regulators (mgL <sup>-1</sup> )		Shoot formation rate (%)	Root formation rate (%)
	NAA	BA		
<i>E. laui</i>	0	0	0.38e	11.7a
	0	1.5	0g	0f
	0	3.0	0g	0f
	0	4.5	0g	0f
	0.1	0	0g	0f
	0.1	1.5	0.65b	6.7c
	0.1	3.0	0.98a	1.7e
	0.1	4.5	0.63b	0f
	0.2	0	0g	0f
	0.2	1.5	0.58bc	3.3d
	0.2	3.0	0.6bc	1.7e
	0.2	4.5	0.5cd	1.7e
	0.3	0	0g	0f
	0.3	1.5	0.47de	8.3b
	0.3	3.0	0.6bc	3.3d
	0.3	4.5	0.27f	1.7e
<i>E. elegans</i>	0	0	0.7e	100a
	0	1.5	3.3cd	88.3a
	0	3.0	0.8e	100a
	0	4.5	2.0cde	74.7ab
	0.1	0	5.8ab	100a
	0.1	1.5	1.5e	100a
	0.1	3.0	0e	100a
	0.1	4.5	0e	52.2b
	0.2	0	6.0ab	100a
	0.2	1.5	2.3cde	100a
	0.2	3.0	0.2e	0c
	0.2	4.5	0.8e	93.3a
	0.3	0	7.3a	100a
	0.3	1.5	4.2bc	100a
	0.3	3.0	0e	100a
	0.3	4.5	0.2e	46.7b

<sup>a</sup>Cultured on MS medium containing various plant growth regulators for 12 (*E. laui*), 16 (*E. elegans*) weeks

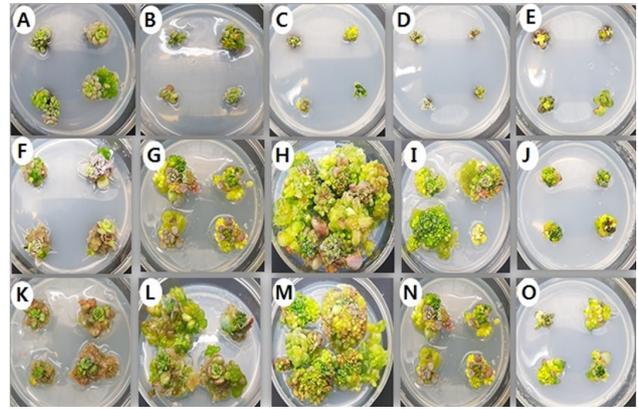
<sup>b</sup>Mean separation within columns by Duncan’s multi range test (P=0.05)

리스에서 신초 발생이 관찰되었으며, 캘러스로부터 신초가 형성된 처리구는 무처리, NAA 0.1 ~ 0.3 mgL<sup>-1</sup> + BA 1.5 ~ 4.5 mgL<sup>-1</sup> 혼용배지에서 신초가 발생하였으며 NAA와 BA 단용배지에서는 신초가 전혀 발생하지 않았다. *E. laui*의 신초 유도를 위해서는 NAA와 BA의 혼용처리가 요구되었으며, 신초 형성율이 0.98%로 가장 높았던 NAA 0.1 mgL<sup>-1</sup> + BA 3 mgL<sup>-1</sup> 혼용배지가 적합할 것으로 판단되었다(Table 2 and Fig. 5A). 돌나물(*Sedum sarmentosum*)의 잎 절편에서 NAA 0.2 mgL<sup>-1</sup> + BA 3 mgL<sup>-1</sup> 혼용배지에서 9.2개의 신초 발생을 보인 연구결과(Ahn and Lee 2004), 사과나무(*Malus domestica*)의 잎 조직에서 NAA 0.5 mgL<sup>-1</sup> + BA 6 mgL<sup>-1</sup> 혼용배지에서 93.3%의 신초 재분화율을 보인 연구결과(Jun et al. 1997), 할미꽃(*Pulsatilla koreana*)의 정단분열조직 배양을 통해 NAA 1 mgL<sup>-1</sup> + BA 5 mgL<sup>-1</sup> 혼용배지에서 62%의 신초 형성을 보인 연구결과(Ko and Kim 2008), 맥문동(*Liriope platyphylla*) 식물체 재분화를 위해서 NAA 0.5 mgL<sup>-1</sup> + BA 2 mgL<sup>-1</sup> 혼용배지에서 34.2%의 재분화율을 보인 연구결과(Kim et al. 1996), 도라지(*Platycodon grandiflorum*)의 신초 발생은 NAA 0.5 mgL<sup>-1</sup> + BA 1 mgL<sup>-1</sup> 혼용배지에서 600%이상의 재분화 효율을 보인 연구가 보고되었다(Han et al. 2014). 본 연구에서는 *E. laui* 캘러스 배양에서 NAA 0.1 mgL<sup>-1</sup> + BA 3 mgL<sup>-1</sup> 혼용배지에서 0.98%의 신초 분화로 가장 우수하였으며, 이는 많은 작물의 신초 발생 연구에서 BA가 매우 효과적이라고 하는 결과와 일치하고 있다(Maikk and Saxena 1992; Wright et al. 1986).

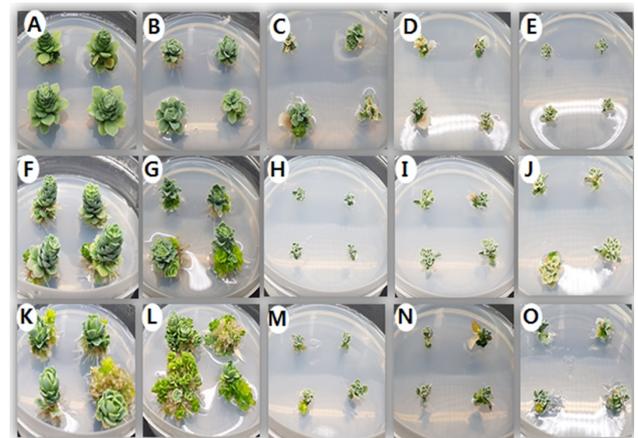
*E. elegans*는 배양 8주 후 캘러스로부터 신초 발생이 관찰되었으며, NAA 0.1 mgL<sup>-1</sup>, NAA 0.2 mgL<sup>-1</sup>, NAA 0.3 mgL<sup>-1</sup> 단용배지에서는 신초 발생율이 각각 5.8%, 6.0%, 7.3%로 나타났으며, *E. laui*는 NAA와 BA 혼용배지에서 신초가 발생하는데 반해, *E. elegans*의 신초 발생에 있어서는 NAA 농도가 높을수록 신초 발생율이 높아지는 경향을 보였다. 다육식물 하월시아 만상(*Haworthia maughanii*)의 기내 대량증식 연구(Kim et al. 2018)에서는 NAA 0.1 mgL<sup>-1</sup> 단용배지에서 22.0개의 신초가 발생한 연구결과를 보고한 바 있다. 이와 유사하게 *E. elegans*도 NAA 0.3 mgL<sup>-1</sup> 단용배지에서 신초 형성율이 가장 높은 경향을 보여 *E. elegans*는 캘러스에서 신초 재분화 효율을 높이는 데 사이토키닌이 신초 분화에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다. 이와 같이 식물의 조직배양을 통한 재분화의 효율은 주로 배지에 첨가된 식물생장조정제와 식물체 자체에 함유하고 있는 내생 물질의 조성 및 균형, 절편체의 분화능, 식물종의 genotype에 의해 결정되며, 이들은 같은 속 혹은 동일 종에서도 품종에 따라 상당한 차이를 보인다(Koroch et al. 2002; Ryu et al. 1992).

### 신초 증식 및 발근 유도

캘러스로부터 발생한 신초를 이용하여 신초의 증식과 발근을 유도하기 위해 NAA와 BA를 단용 및 혼용 처리하여 재분



**Fig. 1** Effect of plant growth regulators on multiple shoot induction from shoot of *Echeveria laui*. (A) Explants were cultured on MS medium supplemented without growth regulators; (B) with 0.1 mgL<sup>-1</sup> BA; (C) 1 mgL<sup>-1</sup> BA; (D) 2 mgL<sup>-1</sup> BA (E) 4 mgL<sup>-1</sup> BA; (F) 0.1 mgL<sup>-1</sup> NAA; (G) 0.1 mgL<sup>-1</sup> NAA and 0.1 mgL<sup>-1</sup> BA; (H) 0.1 mgL<sup>-1</sup> NAA and 1 mgL<sup>-1</sup> BA; (I) 0.1 mgL<sup>-1</sup> NAA and 2 mgL<sup>-1</sup> BA; (J) 0.1 mgL<sup>-1</sup> NAA and 4 mgL<sup>-1</sup> BA; (K) 0.2 mgL<sup>-1</sup> NAA; (L) 1 mgL<sup>-1</sup> NAA and 0.1 mgL<sup>-1</sup> BA; (M) 1 mgL<sup>-1</sup> NAA and 1 mgL<sup>-1</sup> BA; (N) 1 mgL<sup>-1</sup> NAA and 2 mgL<sup>-1</sup> BA; (O) 1 mgL<sup>-1</sup> NAA and 4 mgL<sup>-1</sup> BA; all inductions of shoots on agar medium were photographed 12 weeks after culture



**Fig. 2** Effect of plant growth regulators on multiple shoot induction from shoot of *Echeveria elegans*. (A) Explants were cultured on MS medium supplemented without growth regulators; (B) with 0.1 mgL<sup>-1</sup> BA; (C) 1 mgL<sup>-1</sup> BA; (D) 2 mgL<sup>-1</sup> BA (E) 4 mgL<sup>-1</sup> BA; (F) 0.1 mgL<sup>-1</sup> NAA; (G) 0.1 mgL<sup>-1</sup> NAA and 0.1 mgL<sup>-1</sup> BA; (H) 0.1 mgL<sup>-1</sup> NAA and 1 mgL<sup>-1</sup> BA; (I) 0.1 mgL<sup>-1</sup> NAA and 2 mgL<sup>-1</sup> BA; (J) 0.1 mgL<sup>-1</sup> NAA and 4 mgL<sup>-1</sup> BA; (K) 0.2 mgL<sup>-1</sup> NAA; (L) 1 mgL<sup>-1</sup> NAA and 0.1 mgL<sup>-1</sup> BA; (M) 1 mgL<sup>-1</sup> NAA and 1 mgL<sup>-1</sup> BA; (N) 1 mgL<sup>-1</sup> NAA and 2 mgL<sup>-1</sup> BA; (O) 1 mgL<sup>-1</sup> NAA and 4 mgL<sup>-1</sup> BA; all inductions of shoots on agar medium were photographed 16 weeks after culture

화 식물체의 염수와 증식된 신초수를 조사한 결과는 Table 3과 같다. *E. laui*는 배양 4주 후부터, 일부 혼용 처리에서 캘러스가 발생되면서 신초로 형성되기 시작하였고, *E. elegans*는 배양 10주 후부터 신초 형성이 관찰되었다. *E. laui*에서 가장 많은 신초 증식을 보인 배지는 NAA 1 mgL<sup>-1</sup> + BA 1 mgL<sup>-1</sup> 혼

**Table 3** Effects of plant growth regulators on multiple shoot formation and rooting formation from shoot of *Echeveria laui* and *Echeveria elegans*

Cultivar	Growth regulators (mgL <sup>-1</sup> )		Number of leaves (per explant)	Number of multiple shoots (per explant)	Root formation rate (%)
	NAA	BA			
<i>E.laui</i>	0	0	26.9fe	1.8ed	44b
	0	0.1	23.1fge	1.5ed	83a
	0	1	17.4fg	1.3ed	0d
	0	2	9.7g	1.7ed	0d
	0	4	9.6g	0e	0d
	0.1	0	28.0fde	2.1ed	25c
	0.1	0.1	49.1bc	3.2cd	0d
	0.1	1	58.7b	6.5b	0d
	0.1	2	36.2cde	5.2bc	0d
	0.1	4	29.4fde	1.6ed	0d
	1	0	24.1fe	1.4ed	0d
	1	0.1	49.7bc	2.8d	0d
	1	1	73.6a	10.4a	0d
	1	2	41.8cd	3.1cd	0d
1	4	31.8fde	2.2de	0d	
<i>E.elegans</i>	0	0	31.8cd	2.3b	100a
	0	0.1	17.4de	2.4b	100a
	0	1	13.6e	2.0bc	100a
	0	2	12.8e	0c	0e
	0	4	12.3e	0c	0e
	0.1	0	61.4b	3.8b	100a
	0.1	0.1	45.6c	2.7b	100a
	0.1	1	31.7cd	1.7bc	40bc
	0.1	2	12.8e	0c	15d
	0.1	4	13.5e	0c	0e
	1	0	35.8c	1.7bc	50b
	1	0.1	93.6a	12.0a	100a
	1	1	13.0e	1.8bc	0e
	1	2	12.1e	0c	0e
1	4	10.8e	0c	0e	

<sup>a</sup>Cultured on MS medium containing various plant growth regulators for 12 (*E. laui*), 16 (*E. elegans*) weeks

<sup>b</sup>Mean separation within columns by Duncan’s multi range test (P=0.05)

용처리가 73.6개의 엽수와 10.4개의 신초(multiple shoot)를 형성하였으며(Fig 1M), 반면 BA 2 mgL<sup>-1</sup> 이상의 처리구에서는 신초는 발생되었지만 신초가 기형으로 변화되어 정상적인 개체로 증식하지 못하였다(Fig. 1). *E. laui*에서 형성된 신초는 무처리와 NAA 0.1 mgL<sup>-1</sup>, BA 0.1 mgL<sup>-1</sup> 단용배지에서만, 일부 발근이 되고 나머지 처리는 발근이 되지 않았다. 이러한 결과는 신초 절단면으로부터 방출되는 페놀성분 등 배양억제물질이 있었기 때문으로 생각되었으며, 형성된 신초를 생장조절제가 없는 배지에 옮겨 배양시 발근이 이루어지는 것으로 보아 *E. laui*의 경우는 신초 형성 후 생장조절제가 없거나 페놀성분을 억제하는 배지에 계대 배양할 필요가 있을 것으로 판단된다.

*E. elegans*는 무처리와 BA농도가 1 mgL<sup>-1</sup> 이하의 배지에서 신초가 발생하였으며, 특히 NAA 1 mgL<sup>-1</sup>+ BA 0.1 mgL<sup>-1</sup> 혼용 처리에서 가장 많은 엽수(93.6개)와 신초(12.0개)가 발생하였다(Fig. 2L). 반면, BA 1 mgL<sup>-1</sup> 이상의 단용 및 혼용 처리구

에서는 신초가 황화(etiolation)되면서 탈리(abscission)되는 현상을 보였으며, 생장이 저조하고 정상적인 개체로 증식하지 못하였다(Fig. 2). 또한, 무처리와 NAA 단용배지에서는 초장이 1.8 ~ 1.9 cm로 식물체가 도장하는 경향(Fig. 2F)을 보여 신초 증식에 적합하지 않은 것으로 판단되었다. Skoog와 Miller(1957)가 식물의 기관형성은 옥신과 사이토키닌의 균형에 의하여 좌우된다고 보고한 이래, 옥신과 사이토키닌을 혼용으로 첨가하여 신초를 증식하는 방법이 많은 화훼류에서 보고되고 있다. 일반적으로 신초 증식은 배지에서 저농도의 옥신과 고농도의 사이토키닌을 혼용으로 첨가하였을 때 촉진된다는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 Kim 등(1997)의 쇠무릎(*Achyranthes japonica*)의 액아를 이용 하였을 때 NAA 0.5 mgL<sup>-1</sup>+ BA 1 mgL<sup>-1</sup> 혼용 처리구에서 19.7개의 신초 형성을 얻은 연구결과와 행운목(*Dracaena fragrans*)의 잎 절편 배양에서 NAA 0.5 mgL<sup>-1</sup>+ BA 1 mgL<sup>-1</sup> 혼용 처리에서 5 ~ 8개의 신초를 얻은 연구결과(Ko et al. 2011), 매화마름(*Ra-*

*munculus kazusensis*)의 NAA 0.5 mgL<sup>-1</sup>+BA 1 mgL<sup>-1</sup> 혼용 처리가 47.6개의 신초 증식을 보인 연구결과를 보고(Park et al. 2017b) 한 반면, 본 실험에서는 NAA 1 mgL<sup>-1</sup>+BA 0.1 mgL<sup>-1</sup> 혼용 처리에서 12.0개의 정상적인 신초 발생 결과를 얻어 식물의 종에 따라 반응의 차이가 다양함을 알 수 있었다.

옥신류의 식물호르몬은 발근 유도에 직접 영향을 끼치는 것으로 널리 알려져 있는데(Scott 1972) 팔손이(*Fatsia japonica*)의 신초로부터 발근을 유도하기 위해서는 IBA 단용처리로만 발근이 이루어지고(Choi et al. 2005), 백하수오(*Cynanchum wilfordii*)의 발근유도에는 NAA가 IBA보다 효과적인 것으로 보고(Lee et al. 2011)되며, 시로미(*Empetrum nigrum*)의 발근에는 고농도의 IBA 처리에서 발근이 되었다는 연구가 있으나(Han et al. 2010), 본 연구에서 *E. elegans* 형성된 신초의 경우 성장조정제 무처리와 BA 0.1 ~ 1 mgL<sup>-1</sup>, NAA 0.1 mgL<sup>-1</sup>, NAA 0.1 ~ 1 mgL<sup>-1</sup> + BA 0.1 mgL<sup>-1</sup>의 혼용배지에서 100%의 발근이

관찰되었다. 또한 *E. elegans* 발근에서 직근의 잔뿌리가 많이 발생되었다. BA 2 mgL<sup>-1</sup> 이상의 단용배지, NAA 0.1 mgL<sup>-1</sup> + BA 4 mgL<sup>-1</sup>, NAA 1 mgL<sup>-1</sup> + BA 1 ~ 4 mgL<sup>-1</sup> 혼용배지에서는 발근이 전혀 이루어지지 않았다. 이러한 결과는 식물종류에 따라 그리고 배지 및 옥신의 농도에 따라 기내 발근에 차이가 크다는 것을 시사하는 것이다. 따라서 *E. elegans*는 NAA 1 mgL<sup>-1</sup> + BA 0.1 mgL<sup>-1</sup> 혼용 처리에서 가장 많은 신초 발생과 100% 발근을 보여 신초 증식에 적합한 배지로 판단하였다.

#### 식물체 순화

재분화 식물체의 기외 순화조건을 구명하기 위해 피트모스 등의 혼합용토와 흑색 차광막 35, 55, 75%의 3수준으로 정식 3주 후 조사한 결과는 Table 4와 같다. 정식 7일후부터, *E. laui*는 발근 되기 시작하여 앞에서 백분이 발생하였고, *E. elegans*

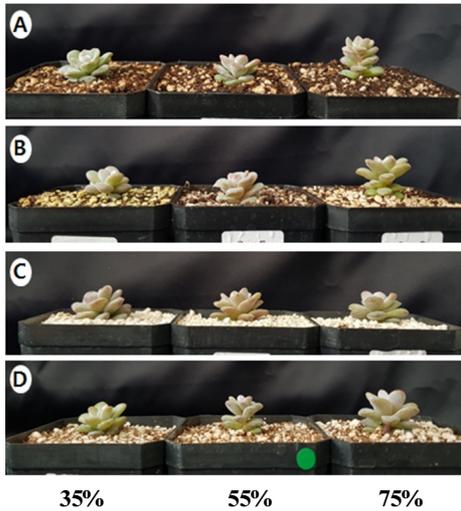
**Table 4** Effect of *Echeveria laui* and *Echeveria elegans* growth on different mixed soils media

Cultivar	Shading level (%)	Treatment	Plant height (cm)	Plant width (cm)	Number of leaves	Survival rate (%)
<i>E. laui</i>	35	Vermiculite:perlite=1:1	1.3	2.3	14.0	100
		Vermiculite:perlite=1:2	1.3	2.3	15.5	100
		Vermiculite:perlite:peatmoss=1:1:1	1.4	2.2	14.6	100
		Vermiculite:perlite:peatmoss=1:1:2	1.4	2.7	14.7	100
	55	Vermiculite:perlite=1:1	1.4	2.3	14.4	100
		Vermiculite:perlite=1:2	1.4	2.3	14.2	100
		Vermiculite:perlite:peatmoss=1:1:1	1.5	2.1	15.1	93.3
		Vermiculite:perlite:peatmoss=1:1:2	1.5	2.2	14.9	100
	75	Vermiculite:perlite=1:1	1.6	2.2	14.1	90
		Vermiculite:perlite=1:2	1.7	2.3	14.2	100
		Vermiculite:perlite:peatmoss=1:1:1	1.5	2.2	15.1	96.7
		Vermiculite:perlite:peatmoss=1:1:2	1.6	2.1	13.8	100
Shading		*	ns	ns	ns	
Soil		ns	ns	ns	ns	
Shading*Soil		ns	ns	ns	ns	
<i>E. elegans</i>	35	Vermiculite:perlite=1:1	1.0	1.6	23.7	100
		Vermiculite:perlite=1:2	1.0	1.3	21.3	100
		Vermiculite:perlite:peatmoss=1:1:1	1.1	1.4	22.5	96.7
		Vermiculite:perlite:peatmoss=1:1:2	1.0	1.2	19.7	90.0
	55	Vermiculite:perlite=1:1	1.2	1.6	24.3	96.7
		Vermiculite:perlite=1:2	1.2	1.4	23.1	96.7
		Vermiculite:perlite:peatmoss=1:1:1	1.3	1.4	21.2	93.3
		Vermiculite:perlite:peatmoss=1:1:2	1.2	1.3	21.6	100
	75	Vermiculite:perlite=1:1	1.3	1.6	22.8	86.7
		Vermiculite:perlite=1:2	1.4	1.4	22.9	93.3
		Vermiculite:perlite:peatmoss=1:1:1	1.4	1.6	23.4	93.3
		Vermiculite:perlite:peatmoss=1:1:2	1.4	1.6	24.1	93.3
Shading		**	ns	ns	ns	
Soil		ns	ns	ns	ns	
Shading*Soil		ns	ns	ns	ns	

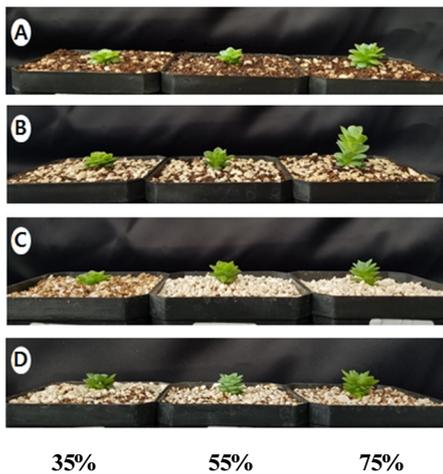
<sup>a</sup>Cultured on containing different soil for 3weeks

<sup>b</sup>Mean separation within columns by Duncan's multi range test (P=0.05)

<sup>c</sup>Nonsignificant or significant at P=0.05



**Fig. 3** Acclimatization of regenerated *Echeveria laui* in the soils (A) Vermiculite:perlite = 1:1 (v:v), (B) Vermiculite:perlite = 1:2 (v:v), (C) Vermiculite:perlite:peatmoss = 1:1:1 (v:v:v), (D) Vermiculite:perlite:peatmoss = 1:1:2(v:v:v)



**Fig. 4** Acclimatization of regenerated *Echeveria elegans* in the soils (A) Vermiculite:perlite = 1:1 (v:v), (B) Vermiculite:perlite = 1:2 (v:v), (C) Vermiculite:perlite:peatmoss = 1:1:1 (v:v:v), (D) Vermiculite:perlite:peatmoss = 1:1:2 (v:v:v)

는 정식 5일경 발근이 시작되어 정식 2주 경에 발근이 완료되었다(사진 미제시). *E. laui*와 *E. elegans*의 순화시 용토간에는 생육에 큰 차이를 보이지 않았으며, 초장만 차광 정도에 따른 유의한 차이를 보였다. 한편, 차광 정도 35~55%에서는 생존율이 90~100%였고 초장이 *E. laui*는 1.3~1.5 cm, *E. elegans*는 1~1.3 cm로 차광 75%에 비하여 식물체가 도장되지 않고 관상 가치가 유지되어 재분화 식물체의 정상적인 생육을 위해서는 차광막 35~55%에서 순화하는 것이 적합하다고 판단되었다(Fig. 3 and 4).

조직배양토 순화는 인공배양토, 순화용기, 기내 발근 여부, 습도 등 순화환경 등이 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Clapa and Fira 2007). 또한 재분화 식물체는 달라진 환경으



**Fig. 5** Regeneration of *Echeveria laui*. (A) Shoot induction of callus ( $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  NAA and  $3 \text{ mgL}^{-1}$  BA). (B) Effects of plant growth regulators on shoot multiplication of *E. laui* ( $1 \text{ mgL}^{-1}$  NAA and  $1 \text{ mgL}^{-1}$  BA); (C) Shoot induced from the excised shoot segment (B) cultured on MS medium for 2 months later; (D) Acclimatized *E. laui* plants in pot from regenerated plant for 2 months



**Fig. 6** Regeneration of *Echeveria elegans*. (A) Shoot induction of callus ( $0.3 \text{ mgL}^{-1}$  NAA); (B) Effects of plant growth regulators on shoot multiplication of *E. elegans* ( $1 \text{ mgL}^{-1}$  NAA and  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  BA); (C) Shoot induced from the excised shoot segment (B) cultured on MS medium for 1 month later; (D) Acclimatized *E. elegans* plants in pot from regenerated plant for 2 months

로부터 각종 스트레스를 받게 되어 배양묘 식물의 생리대사 과정이 기내 배양상태와는 매우 달라지게 된다. 이러한 스트레스로부터 재분화 식물체의 생존율을 높이려면 단시간 내에 달라진 외부환경에 적응하고 순화기간에 생장이 촉진 되도록 증식 배양단계에서 환경스트레스에 강하고 광합성 능력이 높은 식물체로 순화하는 것이 중요하다(Kozai 1992).

Bae 등(2012)은 돌나물과인 홍경천(*Rhodiola sachalinensis*)의 순화시험에서 피트모스와 펠라이트 혼합배양토와 펠라이트 단용 배양토 간의 이식 후 유묘의 생장이 차이가 없었다는 연구 결과, 안스리움(*Anthurium andreaeanum*)의 기내번식 연구에서 펠라이트와 버미큘라이트가 1:1 혼합된 용토에서 98% 생존율이 높았으며, 초장, 뿌리 등의 처리간 차이가 없

었다는 연구결과(Han and Goo 2003), 알로카시아(*Alocasia cadieri*)의 재분화 식물체의 순화시험에서 용토간에 신초수와 엽수에서 차이가 없었다는 연구결과(Han et al. 2004), 필로덴드론(*Philodendron cannifolium*)의 식물체 순화는 펄라이트 및 버미큘라이트의 1:1 혼합용토에서 100% 생존율을 보였으며, 식물체의 초장과 뿌리길이는 용토간 차이가 없었다는 연구보고(Han et al. 2008)와 유사하였다.

반면, Ko 등(2013)의 희귀수종 주걱비름(*sedum tosaense*)의 토양 순화시 피트모스와 펄라이트 혼합용토에서 재분화체 생존율이 100%로 가장 우수하다는 연구결과와, 둥근잎평의비름(*Sedum rotundifolium*)의 재분화체는 질석과 펄라이트를 2:1로 혼합한 용토에서 100%의 생존율을 보였으며(Kwon and Yoon 2010), 매듭풀(*Kummerowia striata*)은 질석과 펄라이트(1:1)에서 길이생장과 생존율이 가장 높았던 연구결과(Park et al. 2017a)와 포도(*Vitis vinifera*) 조직배양묘의 기외 순화에 가장 적합한 순화용토는 버미큘라이트 70%와 피트모스 30%에서 가장 우수한 연구결과(Hong et al. 2002)는 식물에 따라 순화조건이 다를 수 있다는 걸 보여주는 것이다.

## 적 요

에케베리아 라우이(*Echeveria laui*)와 엘레강스(*Echeveria elegans*)의 기내 식물체 대량생산을 위하여 캘러스와 신초 유도, 신초생장과 발근에 영향을 미치는 성장조절제 종류 및 농도를 구명하고 형성된 식물체의 기외 순화조건을 구명하고자 본 연구를 수행하였다. 캘러스 유도에 적합한 부위를 구명하기 위해 잎을 상부, 중부, 하부로 나누어 NAA와 BA의 농도별로 치상한 결과, *E. laui*는 엽상중부를 이용 하였을 때 NAA 1 mgL<sup>-1</sup> + BA 1 mgL<sup>-1</sup>의 혼용처리에서 캘러스가 100% 형성되었으며, *E. elegans*는 엽중부에서 NAA 2 mgL<sup>-1</sup> + BA 4 mgL<sup>-1</sup> 혼용배지가 83.3%로 가장 높은 캘러스 형성을 보여 캘러스 형성에 효율적인 것으로 생각된다. 캘러스로부터 신초 형성율은 *E. laui*에서는 NAA 0.1 mgL<sup>-1</sup> + BA 3 mgL<sup>-1</sup> 혼용배지, *E. elegans*는 NAA 0.3 mgL<sup>-1</sup> 단용배지에서 가장 높았다. 또한 신초의 증식에 적합한 배지는 *E. laui*는 NAA 1 mgL<sup>-1</sup> + BA 1 mgL<sup>-1</sup> 혼용배지에서 신초가 10.4개, *E. elegans*는 NAA 1 mgL<sup>-1</sup> + BA 0.1 mgL<sup>-1</sup> 혼용배지에서 12.0개로 신초가 가장 많이 형성되었으며, 형성된 재분화체는 정상적인 식물체로 성장하였다. 기외 순화조건의 경우, 용토에 따라 생육은 큰 차이를 보이지 않았으며, 관상가치를 고려하여 차광막 35~55%에서 순화 처리하는 것이 적합할 것으로 판단된다. 이러한 결과는 최적의 기내 배양 조건 및 재분화 식물체 순화조건 체계 확립을 통해 고부가 다육식물인 *E. laui*와 *E. elegans*의 대량생산이 가능할 것으로 기대된다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 국제공동연구사업(과제번호: PJ01242901)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## Reference

- Ahn JH, Lee SY (2004) Effect of growth regulators on callus induction and Plant regeneration from leaf explants of *sedum sarmentosum*. Korean J Plant Biotechnol. 31(1):25-29
- Arias S, Guzman U, Mandujno MS, Soto Galvan M, Golubov J (2005) Mexican cacti species at risk of extinction, A comparison between the listed NOM-059-ECOL 2001 (Mexico), The Red list (IUCN) and CITES, Mexican Cacti and Succulents 50: 100-125 (in Spanish)
- Atila K, Rudolf S (2004) Succulents : Care and Propagation. p. 12-200. Schulz Publishing.
- Bae KH, Ko MS, Kim NY, Song JM, Song GP (2012) *In vitro* propagation and multiple shoot induction of *Rhodiola rosea* L. by axillary bud culture. J Plant Biotechnol 39:114-120
- Bae KH, Yoo JA, Yoon ES (2005) Effect of growth regulators of plant regeneration from *Rhodiola sachalinensis* leaf segments. Korean J Plant Res 18(3):410-416
- Cheong DC, Jeong JS, Chang CJ, Lee EJ, Choi EU, Park HB (2004) Shoot regeneration of callus from shoot Tip and Node Culture of *Cypsophila paniculata* L. 'Bristol Fairy'. Korean. J. Hort. Sci. Technol. 22(1):100-106
- Choi KM, Hwang SJ, Ahn JC, Lee HY, Kim JH, Hwang B (2005) *In vitro* propagation from axillary bud explants of *Fatsia japonica* Decne.et Planch. Korean J. Medicinal Crop Sci. 13(6):300-303
- Clapa D, Fira A (2007) Tissue culture and ex-vitro acclimatization of *Rhododendron* sp. Buletin USAMV-CN. 64
- Devlin RM (1975) Plant growth hormone, In: Plant physiology (3<sup>rd</sup>), (ed.) D. Van Norstrand Company, New York. pp 411-517
- Dobos E, Danos B, Laszlo Bencsik A (1994) Callus induction and shoot regeneration in *Sempervivum tectorum*. Plant Cell. Tissue and Organ Culture 36:141-143
- Eric W (1972) *Echeveria*. California Academy of Sciences. p. 7-60
- Grout BWW, Aston MJ (1977) Transplanting cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Walter loss and water transfer related to changes in leaf wax to xylem regeneration Hor. Res. 17:1-7
- Guadalupe M, Humberto S, Ralph B (1999) *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. Scientia Horticulturae 81:71-87
- Han BH, Goo DH (2003) *In vitro* propagation of *Anthurium andreaeanum* 'Atlanta' developed for pot culture. Korean J Plant Biotech 30(2):179-184
- Han BH, Park BM (2008) *In vitro* micropropagation of *Philodendron cannifolium*. J Plant Biotechnol 35(3):203-208
- Han BH, Yae BW, Goo DH, Yu HJ (2004) *In vitro* propagation of

- Alocasia cadieri* Chantrier. Korean J Plant Biotechnol 31 (1):61-65
- Han EU, Son YW, Kim MB, Shin YW, Cho YS, Lee SW (2014) Establishment of tissue culture and acclimation of white balloon flower (*Platycodon grandiflorum* DC.cv. Jangback) for the raising of *in vitro* propagated seedlings. J Plant. Biotechnol. 41:134-139
- Han MS, Park SY, Moon HK, Kang YJ (2010) Micropagation of a rare tree species, *Empetrum nigrum* var. japonicum K. Koch via Axillary bud culture. Jour Korean For 99(4):568-572
- Hong SY, Kim SD, Lee YS, Choi SY (2002) Selection of transplanting soil for acclimatization on *in vitro* cultured grapevine plantlets. Kor J Hort Sci Tehchnol 20(1):38-41
- Jorge MG, Lilian LC (2003) Las crasulaceas de Mexico. Sociedad Mexicana de Cactologia A.C. p. 123-201
- Jun JH, Yae BW, Yang MH, Park JB (1997) Influence of growth regulators on adventitious shoot regeneration from tissue of *Malus domestica* cv. ‘Galq’ *in vitro*. Korean J. Plant Tissue Culture 24(3):125-128
- Kane ME, Philman CA, Bartuska DB, Conell (1993) Growth regulation effects on *in vitro* shoot regeneration of *Crassula helmsii*, J Aqaut. Plant Manage 31:59-64
- Kim KS, Seong NS, Kim MW, Pyo BS, Hwang B (1997) Micropropagation of *Achyranthes japonica* through axillary buds culture. Korean J Plant Tissue Culture 24(6):357-360
- Kim YC, Kim SM, Lee SH, Kwon YC, Kim HY (1996) Callus induction and plant regeneration efficiency according to tissue culture conditions in *Liriope platyphylla*. Korean J Breed 28(2):194-198
- Kim YH, Kim HH, Lee GY, Lee JH, Jung JH, Pablo DS, Lee SD (2018) Effect of growth regulators on *in vitro* mass propagation of *Haworthia maughanii*. J Plant Biotechnol 45:369-374
- Ko JA, Kim HS (2008) Effective micropropagation of *pulsatilla cernua* var. koreana through apical meristem culture. Korean J Plant Res 21(5):362-367
- Ko JA, Kim YG, Kim HS, Kim HM, Seo BS (2011) Mass propagation of *Dracaena fragrans* from leaf explants culture. Journal of Agriculture & Life Sciences 42(2):8-14
- Ko MS, Bae KH, S G, So IS (2013) Plant regeneration and soil acclimatization through photoautotrophic culture from leaf explant for a rare species in *Sedum tosaense* Makino J Plant Biotechnol 40:79-87
- Koroch A, Juliani HR, Kapteyn J, Simon JE (2002) *In vitro* regeneration of *Echinacea purpurea* from leaf explants. Plant Cell Tissue Organ Cult 69:79-83
- Kozai T (1992) Environmental control in photosutotrophic plant tissue culture. Environ.Control Biol 30:193-1797
- Kwon HK, Yoon KE (2010) Effect of plant growth regulators on plant regeneration from the *Sedum rotundifolium* D. Lee. J. Plant Biotechnol 37:84-88
- Lee SG, Lee SH, Kang HD (2011) *In vitro* propagation of wild *cynanchum wilfordii* through axillary bud culture. Jour Korean For Soc 100(2):172-177
- Lorraine S, Atilla K (2005). *Echeveria* Cultivars. Schulz Publishing p 6-44
- Malik KA, Saxena PK (1992) Regeneration in *Phaseolus vulgaris* seedling by N6-benzylaminopurine and thidiazuron. Planta 186:384-389
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15:473-497
- Nakano M, Nagai M, Tanaka S, Nakata M (2005) Adventitious shoot regeneration and micropropagation of the Japanes endangered *Hylotelephium sieboldii* (Sweet ex Hook) H. Ohba and *H. sieboldii* var *ettyuense*(Tomida) H. Ohba, Plant Biotechnology 22(3):221-224
- Park CH, Seong NS, Paek KY, Lee CH (1998) Microparopagation through callus culture in Chinese Foxlove (*Rehmannia glutinosa*). Korean. J. Plant Tissue Culture 25(3):171-175
- Park DJ, Kim HG, Yang WH, Yong SH, Im HJ, Choi MS (2017a) Influence of culture medium and plant growth regulators on *in vitro* propagation of drought tolerant plants. Journal of Agriculture & Life Science 51(6):23-24
- Park IT, Jo CH, Jung JY, Hone SM, Lee JJ (2008) Cactus and Succulent plant. Research Organization Korea Cactus. p 231-238
- Park WM, Pyu SH, Nam SH, Bae KH (2017b) *In vitro* shoot propagation of *Ranunculus katusensis* Makino, an endangered aquatic plant. J Plant Biotechnol 44:325-329
- Rha JH, Doo HS, Kwon TH (1992) Induction of haploid plants by anther culture in sesame (*Sesamum indicum* L.) Effects of growth regulators and difference between genotype on callus induction. Kor J Plant Biotech 19:171-177
- Ryu JH, Doo HS, Kwon TH (1992) Induction od haploid plants by anther culture in sesame (*Sesam indicum* L.) Effect of growth regulators and difference between genotype on callus induction. Kor J Plant Biotech 19:171-177
- Saifullan K, Sheeba N, Kashif A, Samreen Z (2006) Direct organogenesis of *Kalanchoe tomentosa* (Crassulaceae) from shoot -tips, Pak. J Bot 38(4):977-981
- Scott TK (1972) Auxin and roots. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 28:235-258
- Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organfomation. Sym Soc Exp Bool 11:118-131
- Skoog F, Strong FM, Miller CO (1965) Cytokinins. Science 148: 532-533
- Solis JJ, Reyna M, Feria M, Cardona MA, Rohas D (2013) *In vitro* propagation of *Echeveria elegans*, a species of the flora endangered Mexican. Journal of Environmental Science and Engineering B2 : 555-558
- Sutter E, Langhas RW (1982) Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture. Can J Bot 60:2896-2902
- Wetzstein HY, Sommer HE (1982) Leaf anatomy of tissue cultured *Liquidambar styraciflua* (Hammelidaceae) during acclimatization. Amer J Bot 69:1579-1586
- Wright MS, Koehler SM, Hinchee MA, Carnes MG (1986) Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max*. Plant Cell Rep 5:150-154