

## 멸종위기종 두메닥나무(*Daphne pseudomezereum* var. *koreana*)의 줄기 기내배양을 통한 식물체 생산

추예린<sup>ID</sup> · 박상희<sup>ID</sup> · 정은주<sup>ID</sup>\*

강원대학교 산림환경시스템학과

### Propagation of Endangered Species, *Daphne pseudomezereum* var. *koreana* via *in vitro* Bud Culture

Yerin Chu<sup>ID</sup>, Sanghee Park<sup>ID</sup> and Eun Ju Cheong<sup>ID</sup>\*

Department of Forest and Environment System, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

**요 약:** 두메닥나무 (*Daphne pseudomezereum* var. *koreana*)는 강원도, 전라북도, 경상도의 고산지대에 분포하는 한국 자생종이다. 최근 자생지가 축소되어 개체 수가 급격히 줄어들고 있어 멸종위기종으로 지정되었다. 두메닥나무의 추출물은 화장품 등에 유용한 소재로 이용되나 식물체의 번식 효율은 매우 낮은 실정이다. 본 연구는 두메닥나무의 유전자원 보존과 생물소재로 활용을 위해 대량증식법을 확립하고자 하였다. 온실에서 자란 두메닥나무의 액아를 포함한 줄기절편을 생장이 우수했던 WPM 배지를 기본 조성으로 하여 BA와 GA<sub>3</sub>를 혼용 처리한 4가지 배지에서 기내줄기의 정단의 유무에 따른 줄기생장과 신초유도를 비교하였다. 두메닥나무는 정아가 포함된 절편체는 BA 8μM + GA<sub>3</sub>8μM 조성에서 줄기생장이 가장 우수하였으며, 정아가 존재하지 않을 때 BA 8μM + GA<sub>3</sub>8μM 조성에서 신초유도가 가장 우수하였다. 반면 발근 유도는 NAA 1μM, NAA 5μM, NAA 10μM 조성 모두 발근이 발생하지 않은 대신 잎과 줄기가 성장하여 효과가 없는 것으로 나타났다.

**Abstract:** *Daphne pseudomezereum* var. *koreana* is native to Korea and is distributed in Kangwon-do, Jeollabuk do, and Gyeongsang-do. This economically valuable species has experienced a dramatic decrease in natural habitat due to climate change and is difficult to cultivate. In this study, we investigate a mass propagation method for *D. pseudomezereum* through *in vitro* culture and genetic resource preservation. WPM medium was better than the MS medium for shoot growth. As a result, we compared the shoot number and length of apical (W/AP) and non-apical shoots (W0/AP) with BA and GA<sub>3</sub> treatments in WPM medium. Their shoots and length grew well in both BA 8μM + GA<sub>3</sub>8μM-treated apical shoot and without-apical shoot. NAA did not effectively induce rooting of the *in vitro* plantlet.

**Key words:** *Daphne pseudomezereum* var. *koreana*, endangered species, *in vitro* bud culture, shoots production, root induction

## 서 론

두메닥나무(*D. pseudomezereum* var. *koreana*)는 한국의 팔꽃나무과 팔꽃나무 속에 속하는 한국의 자생종으로, 높이가 30~50 cm에 이르는 낙엽활엽관목으로 한라산, 지

리산, 태백산 및 강원도 일대 해발 500~700 m의 고산지대에 자생한다(Lee, 2004). 두메닥나무의 줄기는 회갈색을 띠며, 잎은 호생하고 도피침형으로 길이 3~5 cm, 폭 0.8~1.8 cm로 끝은 둥글거나 뾰족하고 밑 부분은 짧게 모양이다. 암수딴그루로 꽃은 4~6월에 전년지 끝의 엽액에서 발달하며 2~5개의 꽃이 달리고 열매는 장과이며 붉게 익는다. 팔꽃나무(*D. genkwa* Siebold & Zucc.)보다 키가 작고 잎이 어긋나며, 팔꽃나무는 3~5월에 꽃이 잎보다 먼저 피고, 두메닥나무는 잎이 핀 다음에 꽃이 피는 차이점이 있다. 두메닥나무는 삼목번식이 어렵고 종자 번식이 주를 이루지만, 자생지의 개체 수가 적어 종자 확보에

\* Corresponding author

E-mail: ejcheong@kangwon.ac.kr

ORCID

Eun Ju Cheong <sup>ID</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2576-5435>

Yerin Chu <sup>ID</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6763-5068>

Sanghee Park <sup>ID</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8107-6482>

어려움이 있다(Han, 2000). 두메닥나무는 고산지대의 석회암지대에 서식하는 북방형 식물이고, 강한 음지를 선호하며 세계적으로 분포 범위가 좁고 분재용 수목으로 개발 가능성이 크며 학술적, 경제적 가치가 높음에도 불구하고 번식이 까다롭다는 특성 때문에 그 가치를 제대로 인정받지 못하고 있다. 특히 두메닥나무의 잎과 줄기 추출물은 멜라닌 생성을 조절하는 산화효소인 티로시나아제 활성을 저해할 뿐만 아니라(Lee and Lim, 2017), 염증 관련 인자인 질소산화물 및 TNF- $\alpha$ 의 생성 억제를 통해(Oh et al., 2014) 염증성 질환에 효과가 있으며, 지질 대사에 영향을 미쳐 지질 축적을 완화하고, 인슐린 내성을 완화하고 간세포 포도당 섭취를 촉진할 수 있어 만성 간질환인 비알코올성 지방간 질환에 효과가 있는 것으로 보고되었다(Yayun et al., 2019). 두메닥나무 추출물은 헤르니아인, 디오스메틴 등의 유효성분을 포함하고 있어 상업적인 활용 가능성이 클 것으로 판단된다(Konishi et al., 1993). 따라서 두메닥나무를 경제 수종 목적과 유전자원 보존을 위해 대량증식법을 개발할 가치가 있다. 기내번식법을 이용하면 모체와 동일한 유전자를 가진 영양체를 대량으로 생산할 수 있고 우수한 유전자원을 보존할 수 있으므로 유전자원 보존뿐만 아니라 생리활성 원료물질의 안정적인 공급이 가능해 다양한 생리활성을 밝히는 연구가 가능해 상업화로 이어질 수 있을 것이다. 지금까지 두메닥나무의 외부형태학적 특성 및 서식환경에 관한 연구는 이루어졌으나(Lee, 2017) 기내배양을 통한 대량증식에 관한 연구는 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구는 식물체 대량생산을 위한 두메닥나무의 효율적인 기내 대량증식법의 확립을 위한 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 식물 재료

본 연구에 이용된 실험재료는 2015년 8월부터 2016년 9월까지 강원도 일대에서 채집하여 강원대학교 산림자원학과 온실에서 생장한 개체로 2018년 봄에 새로운 줄기를 채취하여 기내배양을 시작하여 본 실험 전 호르몬이 첨가되지 않은 배지에서 한 달간 배양한 후 절편체를 채취하여 사용하였다.

### 2. 기내배양

기내 줄기생장에 적합한 배지를 선정하기 위하여 MS (Murashige and Skoog Medium, 1962)와 WPM(Llyod and McCown Woody Plant Medium, 1981)배지에 sucrose 30 g/L, agar 4.5 g/L, gelrite 1.25 g/L를 첨가한 후 pH는 WPM 5.5, MS 5.8로 조정하고 전자레인지에서 한천을 녹인 후

시험관에 각 8 ml씩 분주한 뒤 고압 멸균기(121°C)에서 20분간 멸균하였다. 절편체는 0.5 cm 길이로 조제하여 각 배지에 치상하였고, 25 $\pm$ 1°C에서 LED (Red : Blue = 4 : 1) 광조건에 16/8 (명/암) 주기로 배양하였으며 배양 1주, 2주, 3주, 4주차에 생장량(생중량과 줄기길이)을 측정했다. 생중량은 무균배양대 내에서 분석용 전자저울을 사용하여 측정했고, 길이는 사진 촬영 후 image-j 프로그램을 이용하여 1 cm 단위를 설정하고 각 식물체의 길이를 측정하였다. 모든 식물체의 배지 조성 조건, 배양환경과 측정 방식은 동일하게 시행했다. 다경신초 유도를 위해 MS 배지와 WPM 배지에 생장호르몬 BA (6-Benzylaminopurine)와 GA<sub>3</sub> (Gibberellic Acid)를 다양한 농도로 조절하여 호르몬의 농도를 다양하게 각각 다르게 한 뒤 4주, 8주차 각각의 생장량을 비교하였다. 처리구는 무처리(대조구), BA 2 $\mu$ M + GA<sub>3</sub> 2 $\mu$ M, BA 4 $\mu$ M + GA<sub>3</sub> 4 $\mu$ M, BA 8 $\mu$ M + GA<sub>3</sub> 8 $\mu$ M 총 4가지로, 두메닥나무의 식물체의 정단이 있는 줄기와 정단이 없는 줄기의 절편체를 각각 0.5 cm 길이로 치상하였다. 발근 유도를 위해선 WPM 배지를 기본 조성으로 하여, 뿌리발생유도 호르몬인 NAA (1-Naphthaleneacetic acid)를 각각 1, 5, 10  $\mu$ M의 농도로 처리하고, pH는 5.5로 조정하였다.

### 3. 통계분석

통계분석으로 둘 이상의 집단 간 평균의 차이를 검증하기 위하여 두 개의 실험요인에 대한 여러 개의 다른 처리 반응에 대한 차이를 검증하는 Two-way ANOVA 분석을 수행했다. SPSS를 이용하여 독립변수 호르몬 처리구와 배양 기간을 기준으로 두메닥나무의 줄기 수와 줄기 길이를 하나의 종속변수로 처리하여 분석을 시행하였다. 각 집단 간 평균의 차이를 검증하기 위해 사후분석으로 Tukey 검증을 수행하였으며, 기초통계량을 산출하고 각 호르몬 처리구간에 동질적 부분집합을 도출하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 기내식물체 유도조건에 따른 생장비교

MS와 WPM배지에 호르몬 처리를 하지 않은 상태로 두메닥나무 절편체를 0.5 cm씩 조제 후 치상하여 4주간 배양한 뒤 식물체의 생장량(생중량과 줄기길이)을 조사하였다. MS배지와 WPM배지 모두 길이가 지속해서 증가했고, 전반적으로 WPM배지에서 생장이 우세하였다 [Figure 1(a)]. 생중량을 비교하였을 때 두 배지 모두 생중량이 지속해서 증가했으나 MS배지는 1주에서 2주차 사이에 0.002 g이 감소하였고, WPM배지는 2주에서 3주차 사이에 0.003 g이 감소했는데 [Figure 1(b)] 이는 다른 수

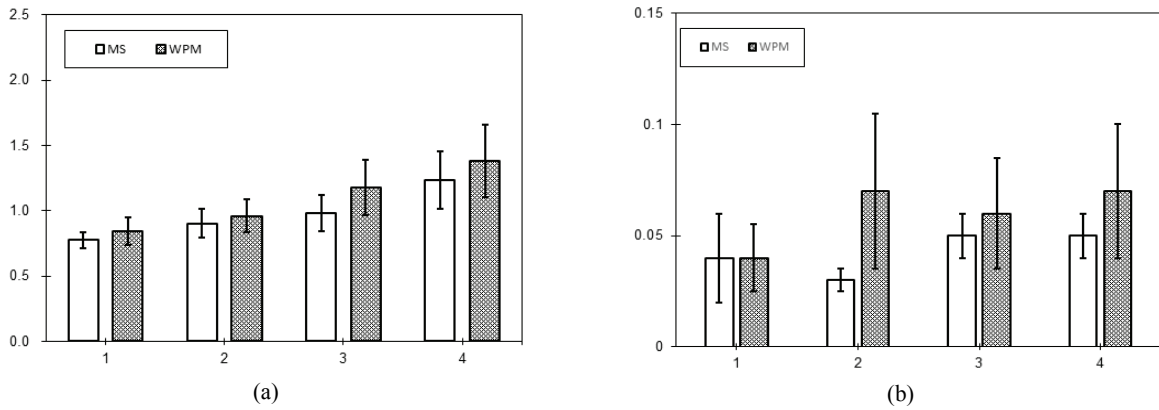


Figure 1. Shoot length (a) and fresh weight (b) on two different media (MS and WPM) for 4 weeks of culture.

Table 1. *D. pseudomezereum* apical shoot length and weight compare in MS and WPM media.

Weeks	Medium	Shoot length (cm)	Fresh weight (g)
1W	MS	0.78±0.021	0.04±0.008
	WPM	0.84±0.036	0.04±0.005
2W	MS	0.90±0.037	0.03±0.002
	WPM	0.96±0.043	0.07±0.018
3W	MS	0.98±0.046	0.05±0.003
	WPM	1.18±0.055*	0.06±0.008
4W	MS	1.23±0.074	0.05±0.004
	WPM	1.38±0.095	0.07±0.009*

\* The different letters in column indicate significantly difference at  $p < 0.05$  by t-test.

종의 기내배양에서 일시적으로 식물체의 무게가 감소한 현상과 같은 결과로 보인다. 생중량의 감소는 배양 식물체의 잎이 탈락한 것이 원인일었고 이후 신초 발생으로 전체적으로 생중량이 증가하였다. 두 배지 모두 잎이 탈락하였고 탈락 시점에 약간의 차이가 있었으나 이후 새로운 잎이 성장하여 생중량이 증가하였다. 기내배양에서 잎이 탈락하는 원인은 배양기간이 길어지면서 기내에 에틸렌이 증가하기 때문으로 알려져 있는데(Goto et al., 1980), 일반적으로 아배양에서 배지의 양분을 흡수하여 기관분화가 일어나기 위해서는 최소 3주일에서 4주일이 소요되므로 배양기간이 짧음에도 불구하고 잎 탈락 현상이 나타난 것은 에틸렌 농도가 증가한 것보다는 절편체의 상처 부위가 새로운 환경의 배지에 접촉하고 양분을 흡수하기 전까지 적응하는 기간에 발생하는 스트레스에 의한 것으로 추측된다. 또한, 배지에서 성장한 줄기의 잎 조기 탈락과 잎 말림 등이 발생해 잎의 탈락과 변색을 막기 위해 MS배지에 황산암모늄 250 mg/L, 황산칼륨 100 mg/L을 첨가해 잎의 활력을 증진한 경우도(Husain and Anis, 2009), WPM과 MS 배지 모두 황산칼륨이 포함되어 있지 않던 낙엽현상이 발생하였다. 그러나 배양기간이 길어짐에

따라 다시 잎이 만들어지고 줄기가 생장하는 것으로 볼 때 새로 조제된 절편체가 배지에 적응하지 못한 결과로 보인다.

독립표본 t 검정법을 사용하여 MS와 WPM의 길이 및 무게 변화를 비교한 결과, 줄기길이는 3주차에 WPM배지에서 생장이 유의한 차이가 있는 것으로 나타났으나 ( $p < 0.05$ ) 4주차에는 유의한 차이가 나타나지 않았고, 줄기 무게는 4주차에 WPM배지에서 무게가 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ) (Table 1).

두 처리구에서 줄기 생장과 생중량 변화에 통계적으로 유의하지 않았으나 길이와 생중량 모두 배양 4주차의 WPM배지에서 생장이 양호했다. 팔꽃나무속의 다른 종들도 각각 MS와 WPM배지에서 생장량 차이를 보이는데, 대표적으로 팔꽃나무가 WPM배지에서 생육이 우수하다는 보고가 있다(Kim et al., 2001). 이는 MS배지와 WPM배지의 질산염과 같은 무기질의 농도 차이(Noshad et al., 2009)와 우리나라 두메닥나무 자생지 토양의 높은 유기물 함량, 유효인산과 염기포화도 수치와 같은 토양 특성(Lee, 2017)에 의한 차이와 관련이 있을 것으로 예상된다.

## 2. 생장호르몬에 따른 신초유도와 길이생장

생장호르몬과 줄기의 정단 유무에 따른 신초유도 및 길이생장 정도를 알아보기 위해 정단이 있는 줄기(W/AP)와 정단이 없는 줄기(Wo/AP)를 구분하여 각각 호르몬을 처리하지 않은 무처리구와 BA와 GA<sub>3</sub>가 혼용 처리된 WPM 배지에 0.5 cm 길이로 치상하여 8주간 배양한 뒤 길이 생장의 변화와 줄기 개수의 변화를 조사하였다. 정단이 있는 줄기(W/AP)는 4주차에 BA 8 $\mu$ M + GA<sub>3</sub>8 $\mu$ M 배지에서 2.23 cm로 1.73 cm 성장해 네 개의 처리구 중 가장 큰 변화를 보였으며 BA 2 $\mu$ M + GA<sub>3</sub>4 $\mu$ M, BA 2 $\mu$ M + GA<sub>3</sub>2 $\mu$ M, 무처리구(Control) 순으로 생장이 우수하였다. 8주차 또한 BA 8 $\mu$ M + GA<sub>3</sub>8 $\mu$ M 배지에서 3.28 cm로 가장 많이 성장했고 나머지 처리구는 4주차와 같은 순으로 생장이 우수하였다. 정단이 없는 줄기(Wo/AP)는 4주차에 BA 8 $\mu$ M + GA<sub>3</sub>8 $\mu$ M 배지에서 2.09 cm 성장했고, BA 2 $\mu$ M + GA<sub>3</sub>4 $\mu$ M, BA 2 $\mu$ M + GA<sub>3</sub>2 $\mu$ M, 무처리구 순으로 생장이 우수했다. 8주차는 BA 8 $\mu$ M + GA<sub>3</sub>8 $\mu$ M 처리구가 3.08 cm, BA 8 $\mu$ M + GA<sub>3</sub>8 $\mu$ M 처리구가 3.09 cm로 두 배지에서 비슷한 길이 성장을 보이며 길이 성장 시에는 정단이 있는 줄기(W/AP)에 생장호르몬 BA 8 $\mu$ M + GA<sub>3</sub>8 $\mu$ M을 첨가하는 것이 가장 효과적인 것으로 나타났다.

호르몬에 따른 줄기 개수의 변화는 전반적으로 정단이

없는 줄기가 정단이 있는 줄기에 비해 동일한 환경조건 내 더욱 우수한 줄기 발생을 보였다(Figure 2). 정단이 있는 줄기는 4주차, 8주차 모두 호르몬의 첨가에 따라 줄기 발생이 증가하나 호르몬의 농도에 따른 차이는 나타나지 않았다. 정단이 없는 줄기는 4주차에 호르몬의 첨가에 따라 줄기 발생이 증가하나 8주차에서는 BA 8 $\mu$ M + GA<sub>3</sub>8 $\mu$ M 배지에서 줄기 발생이 가장 우수했다. 독립표본 T 검정법을 사용하였을 줄기 길이는 8주차의 BA 2 $\mu$ M + GA<sub>3</sub>4 $\mu$ M 처리구(Table 2), 줄기 발생은 8주차의 BA 8 $\mu$ M + GA<sub>3</sub>8 $\mu$ M 처리구(Table 3)에서 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ). BA와 GA<sub>3</sub>의 처리농도가 높을 때 길이 성장에 효과가 있었으나, 길이 성장을 위해 배양을 할 때 4주차와 8주차 간의 성장량에 큰 차이가 나타나지 않아 길이 성장을 목표로 한다면 정단의 유무와 관계없이 4주간 배양하는 것이 적합하고 줄기유도를 목적으로 할 때 정단을 제거하고 8주간 배양하는 것이 적합한 것으로 생각한다.

## 3. 발근유도

발근유도를 위해 팔꽃나무속 종의 발근유도 실험에 관한 연구결과(Hanus, 2012) IBA보다 다경줄기 유도에 우수한 NAA를 WPM배지에 첨가하여 뿌리를 유도하였다. 그러나 두메닥나무는 NAA 1, 5, 10  $\mu$ M 처리구와 무처리

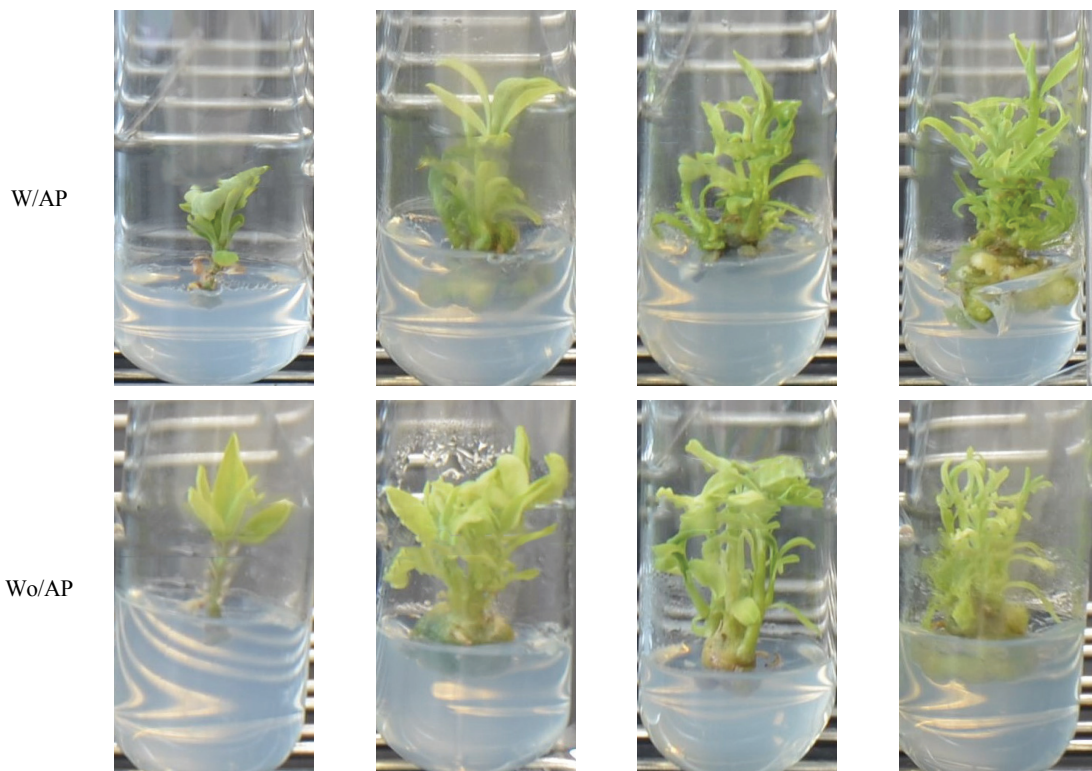


Figure 2. *In vitro* shoot multiplication of two different explants (with apical meristem or without apical meristem) of *D. pseudomezereum* for 8 weeks on WPM.

**Table 2.** The length of shoots with apical meristem (W/AP) or without apical meristem (Wo/AP) depending on the composition of hormones (culture for 8 weeks).

Horomone	4W W/AP	8W W/AP	4W Wo/AP	8W Wo/AP
Control	1.55±0.07a	2.02±0.15a	1.51±0.09a	2.15±0.14a
BA 2µM + GA <sub>3</sub> 2µM	1.97±0.16ab	2.76±0.17b	1.96±0.09b	2.44±0.10a
BA 2µM + GA <sub>3</sub> 4µM	2.05±0.11b*	2.79±0.17bc*	2.41±0.11c*	3.09±0.12b*
BA 8µM + GA <sub>3</sub> 8µM	2.23±0.06b	3.28±0.17c	2.59±0.07c	3.08±0.14b

4W W/AP = With apical meristem cultured for 4 weeks

8W W/AP = With apical meristem cultured for 8 weeks

\*The different letters in column indicate significantly difference at p<0.05 by t-test.

**Table 3.** The average shoots number and standard error with apical meristem (W/AP) or without apical meristem (Wo/AP)

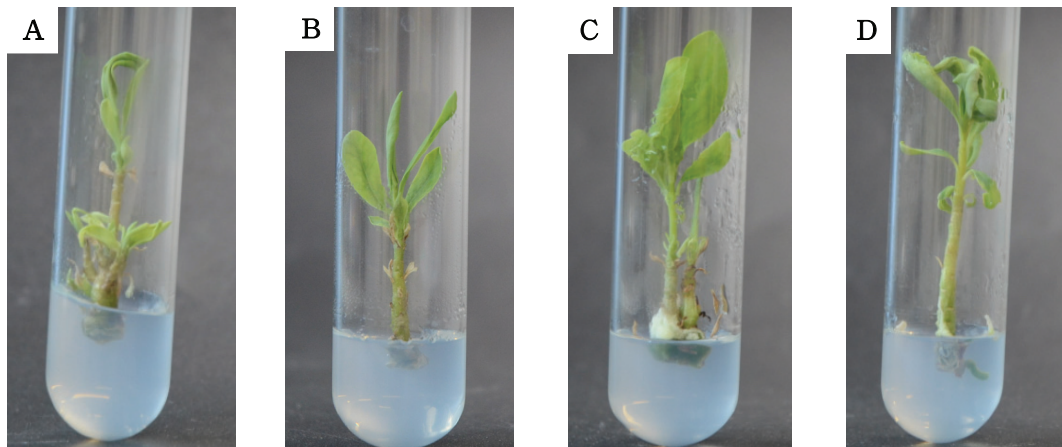
Horomone	4W W/AP	8W W/AP	4W Wo/AP	8W Wo/AP
Control	1.00±0.0a	1.11±0.11a	0.96±0.07a	1.14±0.07a
BA 2µM + GA <sub>3</sub> 2µM	2.10±0.23b	4.60±0.34b	2.04±0.18b	4.96±0.52b
BA 2µM + GA <sub>3</sub> 4µM	2.75±0.45b	5.00±0.78b	2.52±0.18b	7.04±0.57b
BA 8µM + GA <sub>3</sub> 8µM	2.50±0.34b	5.60±0.67b	2.68±0.20b	9.96±0.78c

4W W/AP = With apical meristem cultured for 4 weeks

8W W/AP = With apical meristem cultured for 8 weeks

4W Wo/AP = With non-apical meristem cultured for 4 weeks

8W Wo/AP = With non-apical meristem cultured for 8 weeks



**Figure 3.** Shoot growth on WPM supplemented with various concentrations of NAA for rooting, A, control; B, NAA 1 µM; C, NAA 5 µM; D, NAA 10 µM.

구 모두에서 뿌리 발생 없이 줄기와 잎의 발생, 길이 생장이 발생한 것을 확인할 수 있었다(Figure 3). 일반적으로 기내배양에서 고농도의 옥신은 식물에서 뿌리형성에 효과가 있는 것으로 보고됐으나(Cheong, 2018a, b) 두메닥나무의 경우 NAA는 줄기생장에 더욱 효과적인 것으로 나타났다. 따라서 두메닥나무 절편체에서 줄기유도 시 생장호르몬 BA, GA<sub>3</sub>뿐만 아니라 NAA의 효과를 고려하여 적정 배양조건을 구명하고, 뿌리 유도는 NAA가 아닌 옥신 호르몬 또는 옥신 외 다른 조건이 필요한 것으로 생각된다.

팔꽃나무속은 뿌리 유도가 어려운 특징을 가지고 있는

데, 두메닥나무와 같은 팔꽃나무속에 속하는 *Daphne cneorum*은 뿌리 유도 시 NAA가 첨가되면 뿌리 유도가 일어나지 않은 특징을 가지는데(Mala and Bylinsky, 2004) 두메닥나무도 NAA가 뿌리 유도에 효과가 미미한 것으로 나타났다. 기내배양은 아니나 팔꽃나무속 식물의 뿌리유도에 IBA, IAA 호르몬을 단독 혹은 혼합 첨가한 용액(1~5 ppm 저농도)에 일정 시간(약 15분) 침지한 후 배양하는 것이 팔꽃나무속의 뿌리유도에 효과가 있다는 결과(Noshad et al., 2009)를 보면 팔꽃나무는 매우 낮은 농도의 호르몬을 요구하는 것으로 추측된다. 기내배양실험에서는 낮은 농

도지만 수 주간 배지에서 지속적으로 공급되어 기외에서 처리한 것과는 다른 결과를 나타낸 것으로 추측된다.

## 결론

두메닥나무는 기내식물체 유도 시 WPM배지가 MS배지 보다 성장량 (생중량과 줄기길이) 양호한 것으로 나타났다. 호르몬에 따른 정단 유무별 줄기발생과 길이생장 차이를 비교한 결과, 정단이 있는 줄기와 없는 줄기 모두 BA 8 $\mu$ M + GA<sub>3</sub> 8 $\mu$ M 처리구에서 생장이 가장 우수했다. 4주차와 8주차의 줄기길이를 비교했을 때 호르몬의 농도가 증가함에 따라 길이 생장이 양의 상관관계를 보이지만 4주차와 8주차의 성장량 차이가 크지 않아 길이 생장을 목표로 할 때는 4주간의 배양이 적합한 것으로 나타났다. 줄기 유도 시 4주차는 BA 2 $\mu$ M + GA<sub>3</sub>4 $\mu$ M 처리구에서 가장 많은 줄기가 발생하였고, 8주차는 BA 8 $\mu$ M + GA<sub>3</sub>8 $\mu$ M 처리구에서 가장 많은 줄기가 유도됐다. 따라서 두메닥나무는 8주차까지 배양했을 때 정단이 있는 줄기와 없는 줄기 모두 BA와 GA<sub>3</sub> 처리농도가 높을수록 생장이 우수한 것을 확인할 수 있다. 발근유도는 NAA 호르몬을 처리하였을 때 뿌리가 발생하지 않았고, 새로운 줄기가 발생과 더불어 잎이 성장하는 결과가 나타났다.

## 감사의 글

2017년도 강원대학교 대학회계 학술연구조성비로 연구하였음(관리번호-520170361).

## References

- Cheong, E.J. 2018a. Root induction and propagation of *Sedum takesimense* Nakai using leaf cutting method. *Journal of Forest Environmental Science* 34(2): 50-52
- Cheong, E.J. 2018b. Propagation of three *Rubus* species native to Korea by stem cutting. *Journal of Forest Environmental Science* 34(2): 173-175
- Goto, M., Yaguchi, Y. and Hyodo, H., 1980. Ethylene production in citrus leaves infected with *Xanthomonas citri* and its relation to defoliation. *Physiological Plant Pathology* 16(3): 343-350.
- Hanus-Fajerska, E., Wiszniewska, A. and Czaicki, P. 2012. Effectiveness of daphne L. (thymelaeaceae) in vitro propagation, rooting of microshoots and acclimatization of plants. *Acta Agrobotanica* 65(1): 21-283.
- Han, S. S. 2000. A Study on the Development of Tree for medicine, healthy beverages and potted plant, using forest plants. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, 6.
- Husain, M.K. and Anis, M. 2009. Rapid in vitro multiplication of *Melia azedarach* L. (a multipurpose woody tree). *Acta Physiologiae Plantarum* 31(4): 765-772.
- Image J Program. 2019. <https://imagej.net>
- Konishi, T., Wada, S. and Kiyosawa, S. 1993. Constituents of the Leaves of *Daphne Pseudo-mezereum*. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 113(9): 670-675.
- Korea National Arboretum. 2019. *Daphne pseudomezereum* var. *koreana*. <http://www.nature.go.kr/kbi/plant/pilbk/>
- Kim, C.S., Kim, J.M., Ryu, J., Choi, D.C., Choi, Y.K. and Park, H.B. 2001. In Vitro Mass Propagation of *Daphne genkwa*. *Horticulture Abstracts*. pp. 131.
- Lee, T.B. 1992. An Illustrated Book of Korean Flora. Hyangmonsang, Seoul, 990.
- Lee, D.H. 2017. A study on morphology and habitat environment of *Daphne pseudomezereum* var. *koreana* Dissertation of Master. Kangwon National University. Korea
- Lee, D.H., Son, H.J., Park, S.H., Kim, S.C. and Park, W.G. 2019. Growing Environment Characteristics and Vegetation Structure of *Daphne Pseudomezereum* var. *koreana* Native Habitats in Korea. *Journal of Forest and Environmental Science* 35(1): 31-40
- Lee, J.H. and Im, H.J. 2017. K.R Patent No. 10-2017-0117952 Daejeon : K.R. Korea Intellectual Property Office.
- Noshad, D., Miresmaili, S., Riseman, A. and Ekramoddollah, A. 2009. In vitro propagation of seven *Daphne* L. species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 96(2): 201-209.
- Malá, J. and Bylinský, V. Micropropagation of Endangered Species *Daphne cneorum*. 2004. *Biologia Plantarum* 48: 633-636.
- Oh, S.R., Ahn, K.S., Kwon, O.K., Ryu, H.W., Kim, D.K., Kim, J.H., Song, H.H., Shin, I.S. and Jang, S.R. 2014. K.R Patent No. 10-2014-0002946 Daejeon : K.R. Korea Intellectual Property Office.
- Yayun, L., Lu, L., Yong, C. and Fengmei, H. 2019. Effects of daphnetin on lipid metabolism, insulin resistance and oxidative stress in OA-treated HepG2 cells. *Molecular Medicine Reports* 19(6): 4673-4684.

Manuscript Received : March 3, 2020  
 First Revision : March 24, 2020  
 Second Revision : April 6, 2020  
 Accepted : April 8, 2020