

희귀식물 제주황기의 미세번식

한무석 · 노설아 · 광명철 · 문흥규

Micropropagation of a rare plant species, *Astragalus membranaceus* Bunge var. *alpinus* N.

Mu Seok Han · Seol Ah Noh · Myung Cheol Kwak · Heung Kyu Moon

Received: 2 June 2014 / Revised: 14 June 2014 / Accepted: 26 June 2014
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract In order to develop an efficient in vitro micropropagation technique for a rare plant species, *Astragalus membranaceus* Bunge var. *alpinus* N., shoot proliferation and in vitro or in vivo rootings were conducted and hyperhydrated leaf generated from cultures was histologically observed. During shoot induction, no distinct effect on multiple shoot induction was found between BA and kinetin treatment. BA enhanced the number of internodes, whereas kinetin stimulated shoot elongation. Hyperhydrated leaf composed of bigger cells and retarded palisade parenchyma and showed irregular cell arrangement compared to normal leaf. Especially starch content in hyperhydrated leaf was significantly reduced. The best rooting rate was achieved by B5 medium among three different medium (B5, MS and WPM) and 0.1mg/L IBA treatment induced the highest rooting ratio (80%). No statistical difference was induced by explant types (apical bud or axillary bud) in terms of rooting ratio. In vivo cutting induced rooting rate up to 65% by 0.5% IBA/Talc powder treatment. Although in vivo rooting rate was less efficient compared to in vitro rooting, better survival rate was observed after soil acclimatization. Present study

suggested that above micropropagation techniques can be used for rapid multiplication as well as in vitro or in vivo conservation of the species.

Keywords Shoot proliferation, In vitro or in vivo rooting, Hyperhydration, Histological comparison

서론

콩과에 속하는 제주황기(*Astragalus membranaceus* Bunge var. *alpinus* N)는 다년생 초본식물로 한라산 해발 1,600 m 이상의 고산지대에 드물게 자라는 제주 특산식물 가운데 하나이다. 키는 10~30 cm 정도 자라며 꽃은 7월에서 8월 까지 황백색으로 핀다. 9월에 익는 열매는 협과(꼬투리로 맺히는 과실)로 잔털이 있으며, 긴 타원형인 꼬투리에 보통 2개의 종자가 들어 있다(Lee 1993). 우리나라에는 황기(*Astragalus membranaceus* B.), 제주황기(*A. membranaceus* var. *alpinus* N.) 등 6종 3변종이 있으며, 황기와 제주황기가 약용으로 쓰인다(Toh CA 1971).

황기는 면역촉진, 간장보호제, 발한억제제, 이노제, 신장염, 당뇨병, 백혈병, 암의 치료제로 전통적인 의약품으로 사용되어 왔으며(Erison et al. 2010), 여러 종이 의약품용 껌(gum)의 생산과 식물산업에 사용되었다. 일부 종은 마초(forage)의 생산에도 이용되었으며, *A. cicer*의 마초의 질은 알팔파와 비슷한 것으로 보고되었다(Townsend 1970). 국내에서도 황기는 예로부터 강장(强壯), 익기(益氣), 지한(止汗), 소종(消腫) 등에 효능이 있어 한방에서 뿌리를 약재로 사용하였으며(Baek NI et al. 1996), 주로 중부지역에서 재배되고 있다.

최근 들어 삼계탕 등 보양식의 수요가 많아지면서 1년

M. S. Han
국립산림품종관리센터
(Korea Forest Seed & Variety Center, Chungju Suanbo 380-941 Korea)

S. A. Noh · H. K. Moon (✉)
국립산림과학원
(Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350 Korea)
e-mail: hkmoon@forest.go.kr

M. C. Kwak
경기도산림환경연구소
(Gyeonggido Forestry Environment Research Center, Osan 447-290 Korea)

근을 수확하기 때문에 종자의 수요가 급증하고 있으나, 황기는 습해에 약하여 강우가 많은 해에는 대부분 고사되기 때문에 종자 채취가 매우 어렵다. 또한 단명종자로 채종 후 1년 이상이 경과하면 종자의 발아율이 현저히 감소하는 단점도 있다(Kim YG et al. 2001a and references). 황기는 두과식물 중에서 경실종자 이므로 기계적 휴면을 하여, 녹협기에는 발아율이 90% 이상이나 황협기에는 20% 정도로 낮아지며, 등숙이 진전되어 종피가 경화될수록 발아율은 낮아진다. 또한 저장기간이 길어지거나 환경이 나빠지면 경화종자가 증가하고 활력이 떨어지는 것으로 보고되었다(Kim YG et al. 2011a, b).

황기는 약용식물로 널리 재배되어 왔기 때문에 일반적인 번식 및 재배기술이 확립되어 있으나, 제주황기는 한라산에서만 분포하는 특성으로 인해 아직까지 뚜렷한 증식 방법 조차 구명되지 못하고 있다. 또한 고산지대에서만 자라기 때문에 산림생태계의 훼손으로 인해 멸종위기에 직면할 수 있는 식물 가운데 하나로 산림청에서 지정 보호하고 있다(Lee YM and Lee WY 1997). 따라서 한라산에서만 특이적으로 자생하는 특산식물인 제주황기의 기내증식 방법의 확립은 산림유전자원의 확보 차원뿐만 아니라 자생지 복원 측면에서도 중요한 내용이다.

조직배양 기술은 소멸해가는 유전자원의 증식 및 보존 방법으로 유용한 수단이 되어 왔으며(Faisal et al. 2007; Kartonas and Papafotiou 2007), 국내에서도 여러 수종에서 연구가 발표되었다(Youn et al. 1992; Moon et al. 1997, 1999, 2008; Han et al. 2004, 2010). 외국에서는 몇 종류의 황기에 대한 조직배양 결과가 발표된바 있으나(Hou and Jia, 2004; Erisen et al., 2010) 아직까지 제주황기의 조직배양 기술은 확립되어 있지 않다. 본 연구는 자생지에서 멸종위기에 처해 있는 제주황기의 자생지 복원 및 유전자원의 보존을 목적으로 기내번식 방법을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

국립산림과학원 난아열대연구소로부터 분양 받은 제주황기 종자를 시료로 사용하였다. 종자는 4°C에 저온저장하였다가 수돗물에 24시간 침지하여 최아(催芽)를 촉진시킨 다음 기내파종하였다. 종자의 표면살균은 무균상에서 70% 에탄올로 1분, 2%의 차아염소산나트륨(2% NaClO)로 10분 동안 침지시킨 후 멸균증류수로 4~5회 세척하였다. 소독된 종자를 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지에서 발아시키고 4~5주 간의 계대배양 주기로 2년 이상 유지 하였다.

줄기 증식

절편은 액아 마디를 약 2 cm 길이로 절단하여 MS 배지에 BA 및 kinetin을 각각 농도별(0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 및 5.0 mg/L)로 처리하여 증식시험 하였다(Fig. 1). 배지는 150 × 30 mm의 유리시험관에 8 ml씩 분주하여 121°C에서 20분간 고압멸균 후 사용하였다. 절편은 처리 당 10점씩 치상하여 3 반복하였다. 배양은 1일 16시간 조명(40 μm m² s⁻¹), 25±2°C로 유지되는 배양실에서 실시하였다. 4 주간 배양 후 신초가 0.5 cm 이상 자란 것을 정상 줄기로 다경 및 길이를 측정하였다. 이하의 실험에서 배지의 준비와 배양 환경은 동일하게 실시하였다.

기내 및 기외발근 유도

기내발근을 위하여 잎의 발달이 양호한 건전한 줄기를 발근 재료로 사용하였다. 적정 기내 발근 배지를 구명하기 위하여 B5 (Gamborg et al., 1968), MS 및 WPM (Lloyd G. and McCown B., 1981) 기본배지(sucrose 3%, gelrite 0.3%)를 사용하였다. 다음 발근 적정배지로 선정된 B5 배지에 IBA를 농도별(0, 0.1, 0.2 및 0.5 mg/L) 처리하고 정아지 및 액아지를 절편으로 발근에 미치는 IBA 농도 및 절편체 위치효과를 조사하였다(Fig. 3). 절편은 IBA 농도별 및 절편체 위치별로 20점씩 2반복을 두었다. 배양 4주 후 성적조사를 실시하여 뿌리가 1개 이상 나온 것을 발근된 것으로 간주하고 뿌리 수 및 길이를 측정하였다. 발근 식물체는 수돗물로 agar를 조심스럽게 제거하고 인공배양토(peatmoss: perlite: vermiculite = 1:1:1, v/v/v)에 이식하여 순화실에서 순화하였다.

한편 기외발근 유도는 정아지가 있는 건전한 줄기를 절편으로 시험하였다. 기외삼목은 Kwon 등(1994)의 방법을 다소 변형하여 3~4 cm 길이의 줄기 절단 하부에 IBA/Talc를 0, 0.5, 1.0 및 2.0%로 분의(粉衣) 처리한 다음 인공 혼합상토(peatmoss : perlite : vermiculite=1:1:1, v/v/v)에 이식하였다. 삼목 후 충분히 관수하고 1일 16시간 조명(20 μm m² s⁻¹), 온도 25±2°C로 유지되는 순화실에서 6주간 공중습도를 높게 유지하면서 배양하였다. 6주 후 발근율을 조사하였다.

세포조직학적 분석

기내 줄기 증식 과정에서 나타나는 과수화(hyperhydration)를 관찰하기 위하여 정상적인 잎과 과수화된 잎의 조직검경을 통해 세포구조를 비교 관찰하였다. 조직검경은 Yeung (1999)의 방법을 따랐다. 조직의 샘플 고정에는 2.5% glutaraldehyde와 1.6% paraformaldehyde buffer, 0.05M phosphate buffer (pH 6.8)에 4°C에서 24시간 고정하였다. 다음 알코올 시리

스로 탈수시키고 Technovit 7100 (Kulzer, Germany)으로 포매하였다. 절삭은 Reichert-Jung 2040 Autocut rotary microtome의 유리칼로 3 μm 두께로 수행하였다. 이 절편을 toluidine blue O로 염색하여 Leica DMR 광학현미경으로 관찰하고 IM-50 software를 이용 디지털카메라(Leica DC 300F)로 촬영하였다. 최소 15개의 절편을 비교하여 조사하였다.

통계분석

본 실험의 모든 데이터는 통계프로그램 SPSS 12.0을 이용하여 산출하였다. 각 처리간 유의성 검정을 위해서는 one-way ANOVA를 실시하였고, 유의성이 있는 경우 Duncan's multiple range test로 차후검증을 실시하였다. 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 로 설정하여 분석하였다.

결과 및 고찰

기내 발아

MS 배지에 치상된 종자는 배양 후 5일경부터 발아하기 시작하였고, 줄기 신장이 신속하게 이루어졌으나 4주 후의 발아율이 23%로 저조하였다(data 미제시). Erisen 등(2010)은 *A. cariensis*의 기내배양에서 종피(seed coat) 무처리 종자는 10%정도 발아되고 종피를 절단한 종자는 100% 발아된다고 하여 종피의 절단 처리가 발아의 주요요인이라고 하였다. 제주황기의 저조한 발아율은 종피 문제로 인한 기계적 발아억제로 추정되며, 차후 발아율 향상을 위하여 종피 처리실험이 수행되어야 할 것으로 사료된다.

증식에 미치는 BA 및 kinetin 효과

액아 마디를 절편으로 BA와 kinetin을 각각 농도별로 처리하여 배양한 결과는 Figure 1과 같다. 제주황기는 정아우세 현상이 뚜렷하여 모든 처리구에서 절편 당 한 개의 줄기가 유도되었고 간혹 2개의 줄기로 자라는 것이 관찰되었다. 따라서 제주황기의 기내증식은 다경 유도를 통한 증식보다는 마디 절편으로 나누어 증식함이 효과적인 것으로 나타났다. 전반적으로 BA는 줄기 마디 수의 형성을 촉진한 반면 kinetin은 줄기의 신장을 촉진하는 경향을 보였다(Fig. 1).

기내배양에서 사이토키닌(cytokinin)은 정아의 생장을 억제하여 측아의 발달을 촉진하여 다경유도를 하는 것으로 알려져 있으며, 특히 BA는 활성이 높아 다양한 식물의 기내증식에 많이 사용되어 왔다(George, 1993). 하지만 제주황기에서는 BA 및 Kinetin 처리로 다경 줄기가 유도되지 않아 식물종에 따른 차이를 보여 주었다.

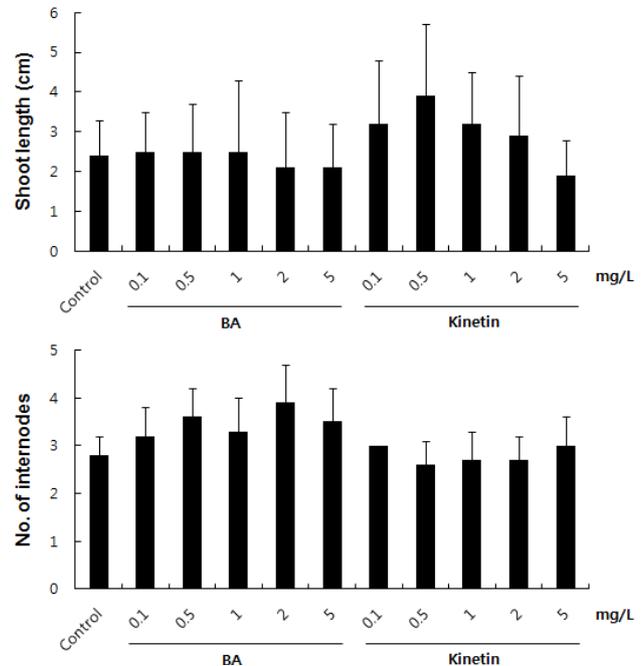


Fig. 1 Effect of cytokinins on shoot proliferation of *Astragalus membranaceus* Bunge var. *alpinus* N. Data were collected from the in vitro grown shoots after 4 weeks in culture. The column show mean \pm SE from three separate measurements of twenty individual shoots

줄기의 신장에 있어 BA 처리는 2.1~2.5 cm의 생장을 보인 반면 kinetin 처리 시에는 1.9~3.9 cm의 생장을 보였다. 특히 0.5 mg/L kinetin 처리 시 3.9cm로서 가장 좋은 생장을 보였다(Fig. 1). 생장조절제 무처리 시는 2.4 cm로 BA 처리와 비슷한 생장을 보였다.

절간 마디 수에 있어서는 BA 처리 시 3.2~3.9개, kinetin 처리 시 2.6~3.0개가 형성된 반면에 MS 기본배지에서는 2.8개의 절간마디가 생성되었다. Moon 등(1999)은 미선나무의 기내증식에서 절간마디를 이용하는 방법이 효율적임을 시사한바 있는데, 이러한 결과는 제주황기에서도 적용 가능한 방법으로 나타났다.

한편 증식 중인 식물체의 일부 앞에서 과수화(hyperhydration)가 관찰되었다. 과수화된 잎은 정상적인 잎에 비하여 두 겹고 휘어져 있으며 투명하였다. 세포조직학적 관찰 결과 과수화된 잎은 모든 세포의 크기가 크고 책상조직의 발달이 부진하였다. 또한, 정상적인 잎에 비하여 책상조직과 해면조직 그리고 표피 세포 모두 불규칙하고 세포간극의 크기가 큰 것으로 관찰되었으며 세포내의 전분 축적량은 현저히 감소되어 있었다. 또한 잎의 주맥(main vein)이 중심에서 다소 옆으로 벗어난 곳에 위치하였다(Fig. 2).

이러한 과수화된 식물은 정상적인 기내 증식을 저해하고 특히 발근이 어려운 것으로 나타나 제주황기의 기내배양 시 고려해야 될 내용으로 생각되었다. 과수화 현상은 여

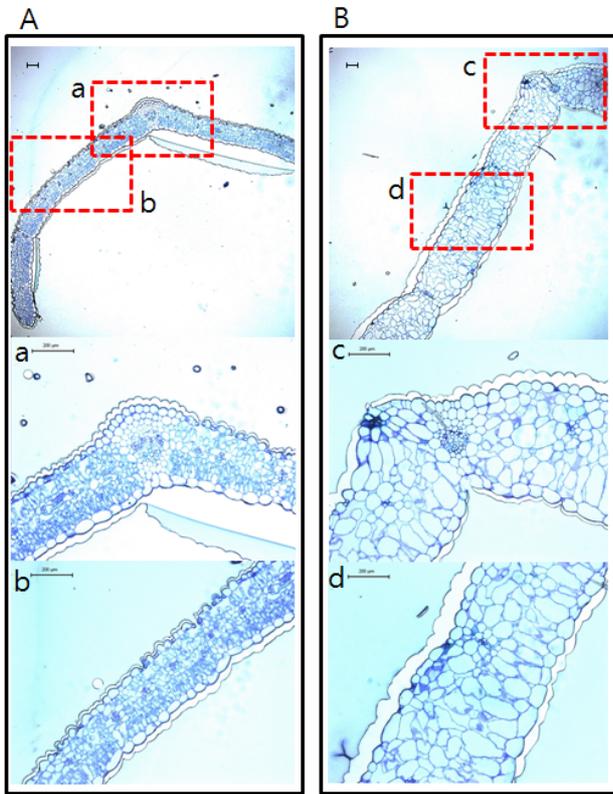


Fig. 2 Anatomical comparison of normal leaf (A) and hyperhydrated leaf (B) derived from *in vitro* shoot of *Astragalus membranaceus* Bunge var. *alpinus* N. Bars are 200µm

러 식물에서 발근, 순화 및 생산성 저하의 주 원인이 되며(Olmos and Hellin 1998; Jausoro et al. 2010), 배지의 조성, 용기, 배양 환경 등의 외부적 요인에 의하여 빈번히 발생하는 것으로 알려져 있다(Debergh et al. 1992). George (1993)는 과수화의 억제를 위한 방법으로 1) 통기가 잘되는 배양 용기의 사용, 2) 발근유도 시 배양병의 하단을 차게(cooling) 유지 시키는 방법, 3) Agar 등 경화제의 농도와 sucrose 등 탄소원의 농도를 높이는 방법, 4) Agar, gelrite 등 서로 다른 경화제를 사용하는 방법, 5) 반고체 배지를 사용하는 것보다 액체배지에서 다공성(porus) 지지물을 사용하여 줄기를 배양시키는 방법을 제시하였다. 제주황기의 기내 배양에서 관찰된 과수화는 빈도가 10% 미만으로 크게 문제시 되지는 않았으나 발근 유도 시에는 발근이 억제되었기 때문에 고려해야 될 내용으로 생각된다.

기내발근 유도

적정배지 선정을 위한 발근시험 결과는 Figure 3과 같다. 4주 간의 배양 결과 MS 배지는 6.7%로 발근율이 저조했으며, WPM은 33%의 발근율을 나타냈다. B5에서는 가장 좋은 43%의 발근율을 보였다. 특히 B5 배지에서는 다른 두 배지보다 발근이 1주 이상 빠르게 이루어지는 장점도

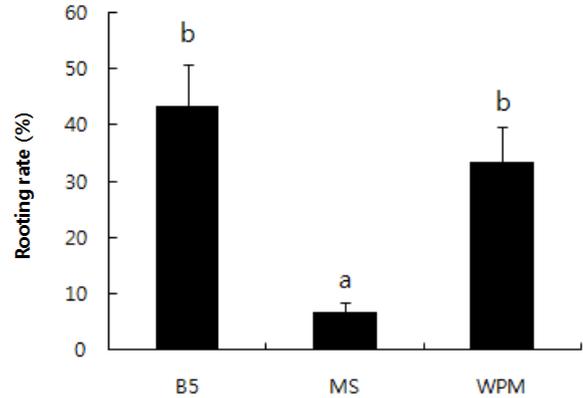


Fig. 3 Effect of various medium on *in vitro* rooting. Data are the mean±SE from 3 separate measurements of twenty individual plants. Mean(±SE) separation within column by Duncan's multiple range test at P=0.05

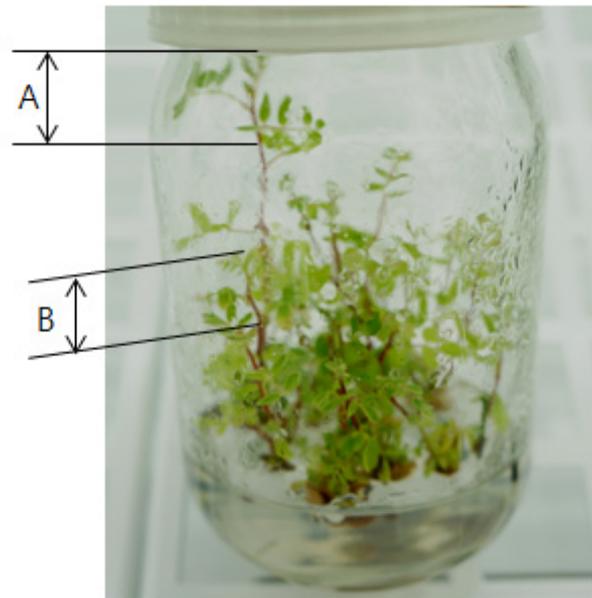


Fig. 4 Explant bud position (A- apical bud explant ;B- axillary bud explant) for *in vitro* rooting

있었고 뿌리 수도 많아서 제주황기의 적정 발근배지로 생각되었다. 뿌리의 형성은 줄기 기부에 캘러스 형성 없이 직근의 형태로 유도되었고, 뿌리 수는 2~7개로 개체 간 차이가 있었다. 한편 발근 개체는 세근의 발달이 이루어지지 않았고 절편에 따라서는 발근 부위가 적색을 띠기도 하였다. 콩과 식물인 가시아카시아(*Acacia nilotica* (L.) Willd. ex Del)의 기내 발근에서 B5 배지가 사용된 바 있으며(Samake et al. 2011), Chen 등(2014)은 애기장대와 토마토의 뿌리 형성에 B5 배지가 효과적이라고 하였다. B5 배지 조성이 MS나 WPM와 다른 특징은 비타민 Thiamine HCl의 함량이 10배 가량 높다는 것인데, 이러한 함량 변화가 콩과 식물인 제주황기의 발근에 중요한 영향을 미쳤으리라 추정된다.

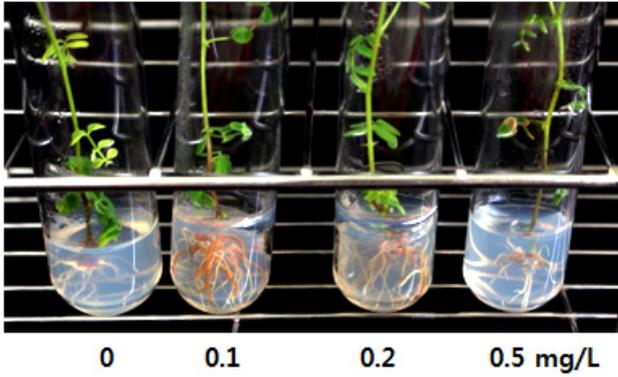


Fig. 5 Induction of *in vitro* root by different IBA treatment

IBA 농도 및 절편체 위치 효과

IBA 농도 및 절편의 위치에 따른 발근 시험 결과는 Figure 6과 같다. 발근율은 IBA 처리 농도 및 절편체의 위치에 따라 차이가 있어 40~80% 까지 발근율 차이를 보였다. 발근은 0.1 mg/L IBA 조건에서 가장 좋았으며, 이 농도에서 뿌리 수 및 뿌리의 생장이 가장 양호하였다. 다른 농도에서는 무처리와 비교하여 발근에 통계적인 유의차가 없었으나 뿌리 수 및 뿌리의 생장은 IBA 처리 및 절편 위치에 따라 차이를 보였다(Fig. 5, 6). 따라서 제주황기의 기내발근은 0.1 mg/L IBA 처리가 적정조건으로 나타났다.

기내발근에 영향을 미치는 오옥신의 효과는 다수의 식물에서 보고된 바 있으며, 여러 종류의 황기 기내배양에서도 관찰되었다. *A. polemoniaceus*는 MS 기본배지 혹은 2.0 mg/L 처리에서(Mirici 2004), *A. cicer*은 1/2 MS+0.25~0.5 mg/L NAA를(Basalma et al. 2008), *A. adsurgens*는 1/2 MS+0.2~1.0 mg/L NAA 처리가 효과적인 것으로 보고하였다. Uranbey 등(2003)은 *A. cicer*에서 1/2 MS+1.0 mg/L NAA 처리로 40%의 발근을 보고하였고, *A. cariensis*에서는 MS+0.5 mg/L IBA가 적정발근 조건으로 나타나 식물에 따른 차이를 보여주었다(Erisen et al. 2010). 한편 Hou와 Jia (2004)는 *A. melilotoides*의 기내배양에서 IBA가 NAA보다 발근에 효과적이며, MS+ 14.78uM IBA 처리로 81%의 발근율을 얻었다고 하였다. 이러한 결과들은 황기의 종류에 따라 적정 배지 및 오옥신의 처리조건이 다름을 보여주는 것이다. 한편 제주황기의 기내발근은 앞서 언급했듯이 과수화된 줄기를 피하고 건전한 줄기를 사용하여 B5 배지에 저농도 IBA 처리로 효과적인 기내발근이 가능하다고 생각된다.

기외발근 유도

정아가 있는 건전한 줄기를 재료로 IBA 농도별 분의 처리 후 기외삽목한 결과는 Figure 7과 같다. 발근율은 무처리에서 57%, 0.5% IBA 처리 시 65%까지 발근되었으며,

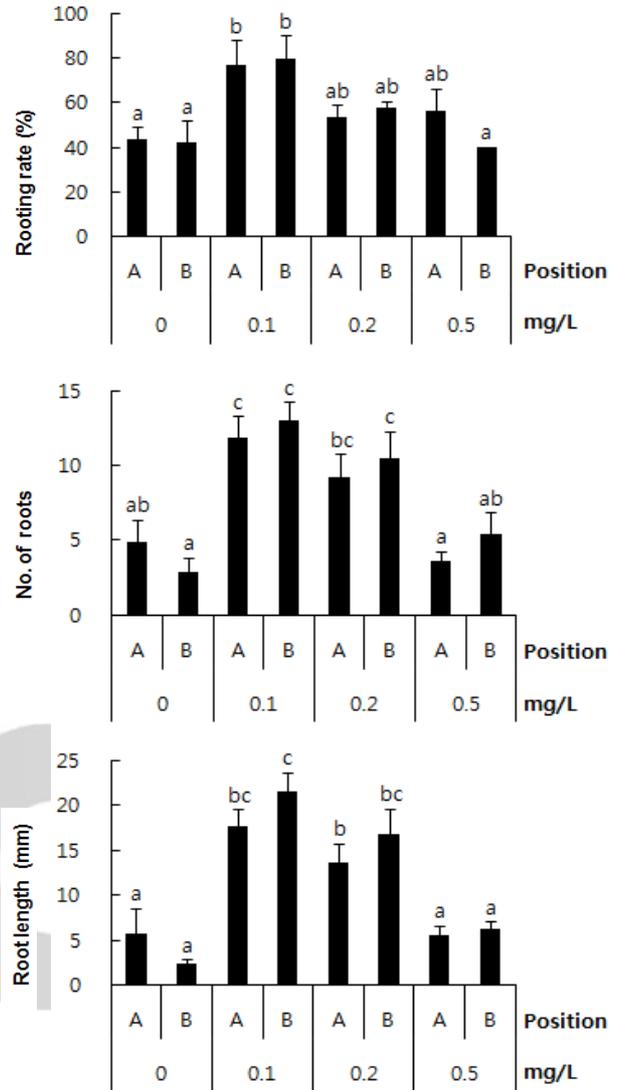


Fig. 6 Effect of shoot position and IBA on *in vitro* rooting of *Astragalus membranaceus* Bunge var. *alpinus* N. A-apical bud explant; B-axillary bud explant. Data are the mean±SE from 3 separate measurements of twenty individual plants. Mean(±SE) separation within column by Duncan's multiple range test at P=0.05

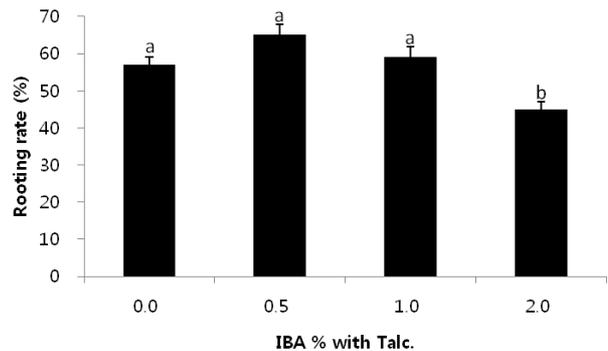


Fig. 7 Effect of different IBA levels influencing on *ex vitro* rooting. The same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at P=0.05

IBA 1%에서 59%, 2%에서 45%의 발근율을 보였다. 무처리구와 IBA 0.5, 1.0% 처리간에는 발근율에 통계적인 차이가 없었으나 2% 처리시에는 차이를 보였다. 따라서 제주황기의 기외발근 유도는 0.5~1.0% IBA로 분의 처리함이 좋을 것으로 판단된다. 이 같은 결과는 기내발근에 비해 다소 저조한 발근율이지만 차후 토양 이식 후의 생존율과 생장이 기내발근묘 보다 양호하게 나타났다(data 미 제시). 따라서 순화묘목까지의 생산성을 고려한다면 제주황기는 기외삽목법이 더 효율적인 것으로 나타났다. 이러한 기외삽목 기술은 발근이 까다로운 여러 활엽수종의 발근 유도에서 효과적인 것으로 보고된 바 있으며(Kwon et al. 1994), Debergh와 Maene (1981)는 기내묘의 기외발근은 조직배양묘의 생산비 절감에 매우 중요하다고 하였다

순화묘 육성

정상적으로 발근된 식물체를 혼합 인공상토(peatmoss:perlite:vermiculite = 1:1:1, v/v/v)에 이식하여 온실에서 4주간 순화시킨 결과 기외발근묘는 90% 이상의 높은 활착을 보인 반면 기내발근묘는 60% 미만으로 활착되었다. 이러한 차이는 발근묘의 이식과정에서 뿌리가 부러지거나 상처를 받았거나 스트레스로 인한 고사로 보인다. 따라서 제주황기의 기내 배양 증식은 기내발근 보다는 기외발근의 방법이 차후의 생존율 제고에 유리할 것으로 보인다. 기내발근묘의 토양이식 순화율 제고는 앞으로 더 연구되어야 할 내용이다.

적 요

희귀 식물 제주황기의 기내번식법 확립을 목적으로 줄기 증식 및 발근을 시험하고 배양과정에서 나타나는 잎의 과수화 현상을 조직학적으로 조사하여 다음의 결과를 얻었다. 줄기유도 시 BA 및 kinetin의 처리는 다경유도 효과가 뚜렷하지 않았으며 대부분 단일 줄기로 자랐다. 하지만 BA 처리는 마디 수의 증가를, kinetin 처리는 줄기의 신장을 각각 촉진하는 효과가 있었다. 과수화(hyperhydration)된 잎은 정상 잎에 비하여 세포의 크기가 크고 책상조직의 발달이 부진하였으며, 세포의 배열이 불규칙하였다. 특히 과수화 잎의 세포는 세포 내 전분의 축적이 현저히 감소하는 것으로 나타났다. 기내발근은 세 가지 배지(B5, MS, WPM) 가운데 B5 배지가 양호하였으며, 0.1 mg/L IBA 처리 시 최고의 발근율을 보였다. 발근에 미치는 절편체 위치효과(정아지 혹은 액아지)는 통계적 유의 차가 없는 것으로 나타났다. 기외삽목 발근은 0.5% IBA 분말로 65%까지 발근되어 기내발근 보다 저조하였으나, 차후 생존율은 더 좋은 것으로 나타났다. 이상의 결과는 제주

황기의 기내번식이 가능함을 시사하며, 이 식물의 기내 및 기외보존의 방법으로 사용될 수 있음을 보여주었다.

References

- Baek NI, Kim YS, Kyung JS, Park KH. 1996. Isolation of anti-hepatotoxic agent from the root of *Astragalus membranaceus*. Kor J Phsrmacogn 27(2):111-116
- Basalma D, Uranbey S, Gurlek D, Ozcan S (2008) TDZ-induced plant regeneration in *Astragalus cicer* L. Afr J Biotechnol 7(8):955-959
- Chen X, Sheng L, Liu J, Haung H, Xu L (2014) A simple method suitable to study de nove root organogenesis. Frontier in Plant Science 5: 1-6
- Debergh P, Aitken-Christie J, Cohen D, Grout B, von Arnold S, Zimmerman R, Ziv M (1992) Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. Plant Cell Tiss Org Cult 30:135-140
- Erisen S, Yorgancilar M, Atalay E, Babaoglu M (2010) Prolific shoot regeneration of *Astragalus cariensis* Boiss. Plant Cell Tiss Org Cult 100: 229-233
- Faisal M, Ahmad N, Anis M (2007) An efficient micropropagation system for *Tylophora indica*. an endangered, medicinally important plant. Plant Biotechnol Rep 1:155-161
- Gamborg OL., Miller RA., Ojimak. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res 50:151-158
- George EF (1993) Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology. pp 435-446. Exegetics Limited, England
- Han MS, Moon HK, Kang YJ, Kim WY, Kang BS, Byun KO (2004) Micropropagation of an endangered species, *Stellera rosea* Nakai by tissue culture. Korean J Plant Biotechnol 31:31-35
- Han MS, Park SY, Moon HK, Kang YJ (2010) Micropropagation of a rare tree species, *Empetrum nigrum* var. *japonicum* K. Koch via axillary bud culture. J Korean For Soc 99:568-572
- Hou SW., Jia JF (2004) High frequency plant regeneration from *Astragalus melilotoides* hypocotyls and stem explants via somatic embryogenesis and organogenesis. Plant Cell Tiss Org Cult 79: 95-100
- Jausoro V, Llorente BE, Apóstolo NM (2010) Structure differences between hyperhydric and normal in vitro shoots of *Handroanthus inpetiginosus* (Mart. Ex DC) Mattos (Bignoniaceae). Plant Cell Tiss Organ Cult 101: 183-191
- Karstonas E, Papafotiou M (2007) Mother plant age and seasonal influence on in vitro propagation of *Quercus euboica* Pap., an endemic, rare and endangered oak species of Greece. Plant Cell Tiss Org Cult 90:111-116
- Kim YG, Bang JK, Yu HS, Park HW, Seong NS, Son SY. 2001b. Seed structure and effects of storage on germination of *Astragalus membranaceus*. Kor J Medicinal Crop Sci 9(4): 259-264
- Kim YG, Yu HS, Park HW, Seong NS, Son SY. 2001a. Effects of

- environment and storage condition on germination of *Astragalus membranaceus*. Kor J Medicinal Crop Sci 9(4):265-268
- Kwon YJ, Youn Y, Lee SK, Kim JS (1994) Effect of cultural conditions on clonal propagation of *Betula costata* plus trees by tissue culture. Korean J Breed 26:435-446
- Lee TB (1993) Illustrated flora of Korea. Hyangmoonsa Press, Seoul, Korea pp 561
- Lee YM, Lee WY. 1997. Illustrated rare and endangered species in Korea. Jungbu Forest Research Center, Korea Forest Research Institute, Seoul, Korea.
- Lloyd G., McCown B. 1981. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Intl Plant Pro Soc Pro 30:421-427
- Mirici S (2004) High frequency of adventitious shoot regeneration from leaf and leaf petiol of endemic *Astragalus polemoniicus* Bunge. Selcuk University. Agric Fac Publ 18(34):31-34
- Moon HK, Suk GY, Kim SC (1997) Micropropagation of a rare species, *Forsythia saxatillis* N. through tissue culture. J Kor For Soc 86:430-434
- 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, Kim YW (2008) In vitro propagation of a rare and endangered species, *Echinosophora koreensis* Nakai, by axillary bud culture. J Plant Biotechnol 35:229-234
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497
- Olmos E, Hellín E (1998) Ultrastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated canation plants. Scientia Horticulturae 75: 91-101
- Samake G, Folega F, Sennou H, Wang HF (2011) *In vitro* regeneration of *Acacia nilotica* (L.) Willd. Ex Del from nodes on B5 medium. J Agri Biotech Sustain Develop 3: 85-89
- Toh CA. 1971. A cytotaxonomic study on the *Astragalus membranaceus* and *Astragalus membranaceus* var. *alpinus*. Kor J Plant Taxono 3(1, 2):57-61
- Townsend CE (1970) Phenotypic diversity for agronomic characters in *Astragalus cicer* L. Crop Sci 10:691-692
- Uranbey S., Cocu S., Sancak C., Parmaksiz I., Khawar KM., Mirici S., Ozcan S. (2003) Adventitious shoot regeneration in *Astragalus cicer* milkvetch. Biotechnol Biotechnol Equip 17:33-37
- Yeoung EC (1999) The use of histology in the study of plant tissue culture system- some practical comments. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 35:137-143
- Youn Y, Lee SK, Park JI (1992) *In vitro* propagation of a rare species-*Berchemia berchemiaefolia*. Res Rep For Gen Res Inst Kor 28:63-67