갯봄맞이(*Glaux maritima* L.)의 캘루스 배양을 통한 식물체 재분화

한증술

Plant regeneration via callus culture of sea-milkwort (*Glaux maritima* L.)

Jeung-Sul Han

Received: 18 June 2017 / Revised: 24 June 2017 / Accepted: 24 June 2017
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract A callus-mediated regeneration protocol for sea-milkwort, an endangered coastal plant species in South Korea, is reported here. The explants of in vitro-plantlets generated from a node culture revealed distinguishable responses in callus induction depending on genotype, explant source, light condition, and 2,4-D concentration. Especially, continuous darkness exclusively facilitated callus induction from explants prior to other treatments. The calli initiated on the media with 2,4-D ranging from 0.1 mg/L to 3.0 mg/L in the dark vigorously proliferated when subcultured on the same media in continuous darkness. Given 1.0 mg/L zeatin in addition to darkness to the calli of the ‘Pistachio’ genotype, normal adventitious shoots were only regenerated from nodular structures that formed earlier from the calli at the frequency of 24.4 percent. Regenerated shoots easily grew into plantlets with roots and green color on a phytohormone-free MS medium under lighted condition, that were used for node culture as plant materials. Node culture effectively multiplied plantlets in accordance with protocol by Bae et al. (2016). Acclimatized plantlet clusters developed mature plant clusters under inland environment,

followed by flowering the following April. Results were merged with node culture protocol suggested by Bae et al. (2016), which, as an in vitro propagation system for sea-milkwort, may contribute to natural habitat restoration.

Keywords Myrsinoideae, Genotype, Nodular structure, Organogenesis, Pseudo-annual

서 언

APG III 분류체계에서 자금우아과(Myrsinoideae)에 속한 갯봄맞이는 유사일년생(pseudo-annual) 초본으로 염습지에 분포하는 것으로 알려져 있는데, 우리나라 남한에서는 현재 울산과 포항 해안가 일부 지역에서만 극히 소규모 개체군이 자생한다(APG III 2009; IUCN 2015; Jerling 1988a; Jerling 1988b; NIBR 2012; Son et al. 2011). 갯봄맞이가 우리나라에서 절멸의 위기에 처한 것으로 판단되어 관계 당국은 최근 한국의 멸종위기 야생동·식물 적색자료집에 취약(VU: vulnerable)종으로 구분하는 한편 멸종위기 야생생물 II급으로 지정하여 보호하고 있다(NIBR 2012).

멸종위기 생물종의 경우 자생지(서식지) 보전, 자생지 내·외 개체군 보전과 더불어 손상된 자생지의 복원을 위한 다양한 시도가 이루어지고 있는데, 식물종의 경우 기내배양 기술이 유용하게 활용될 수 있다(Bunn et al. 2011; Pence 2011; Pence 2013; Sahai et al. 2010). 멸종위기 식물종의 복원을 위한 증식에 기내배양 기술을 활용할 경우에는 필연적으로 재료 식물체가 필요하며, 진정한 의미의 복원을 위해서는 복원으로 증식된 집단이 기존 자생지(hot spot) 개체군이 가지고 있는 대립유전자를 최대한 포함하여야 한다. 이것은 재료 수집과정에서 야기될 수 있는 자생지 파괴 또는 교란을 회피하면서도 가능한 한 다양한 유전자형으로부터 기내배양용

J.-S. Han (✉)
경북대학교 농업생명과학대학 원예학과
(Department of Horticultural Science, College of Agriculture & Life Science, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea)

경북대학교 생태환경대학 생태환경전공
(Department of Ecological Environment, College of Ecology & Environmental Science, Kyungpook National University, Sangju 37224, Republic of Korea)

경북대학교 농업과학기술연구소
(Institute of Agricultural Science & Technology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea)
e-mail: peterpan@knu.ac.kr

재료 식물체를 획득할 필요가 있다는 것을 의미한다.

최근 Bae et al. (2016)은 자생지 교란을 회피하면서도 유전적 다양성이 풍부할 것으로 예측되는 갯봄맞이의 종자를 기내 파종하여 얻어진 유식물체에서 마디를 절취하여 배양함으로써 효과적으로 식물체를 증식할 수 있고, 갯봄맞이가 생태적으로 해안식물임에도 불구하고 기내에서 증식하여 순화된 식물체가 담수관수 내륙 환경에서 정상적으로 생활환을 완성한다는 것을 최초로 보고한 바 있다.

본 연구의 목적은 이전 Bae et al. (2016)의 연구에서 절편으로 활용한 마디와 더불어 버려졌던 뿌리와 잎 절편으로부터 캘루스를 유도·증식한 후 이로부터 식물체를 재분화 시키는 일련의 배양조건을 구명하는데 있다. 본 연구를 통해 얻을 수 있는 캘루스로부터 재분화된 유식물체는 기내증식(Bae et al. 2016)의 재료로 다시 활용할 수 있을 것이다. 따라서 본 연구결과는 증식이 이용 가능한 절편체의 부위를 확대함에 따라 희귀 유전자원인 갯봄맞이 기내 증식 효율 향상에 기여할 수 있을 것이다.

재료 및 방법

식물재료

갯봄맞이 식물체의 줄기와 꽃의 색을 기준으로 Bae et al. (2016)이 구분한 ‘Red type’ (RT)과 ‘Pistachio type’ (PT) 등 2개

유전자형을 본 연구를 위한 재료로 사용하였다(Fig. 1A, 1B). 기내 파종한 후 생육한 유식물체로부터 마디를 절취하여 BA (Sigma-Aldrich, USA) 0.5mg/L가 첨가된 MS배지(MS: Murashige and Skoog 1962) (Duchefa Biochemie, Netherlands)에서 배양하여 다신횇을 얻고, 각 신횇의 마디는 동일한 배지에 계대배양하는 방식으로 식물체를 증식하였다(Bae et al. 2016). 증식된 유식물체(초장 약 4cm)에서 절편을 취하여 캘루스 유도용 재료로 사용하였는데, 절편으로는 각 유전자형의 유식물체로부터 액아를 포함하는 약 0.5cm 길이의 마디, 근단을 포함하는 약 1.0cm 길이의 뿌리 및 ‘PT’에서만은 추가적으로 잎 전체가 사용되었다.

절편으로부터 캘루스 유도

캘루스 유도용 배지로 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D: Sigma-Aldrich) 0.1~3.0mg/L, sucrose (Duchefa Biochemie) 30g/L 및 Plant agar (Duchefa Biochemie) 8g/L가 첨가되고 pH는 5.8로 조정된 MS배지를 사용하였다. Petri접시당 동일부위 절편 5개를 치상하였고 처리마다 10개 Petri접시를 사용하였다. 배양물은 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 명배양($16\text{hr } 70\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}/8\text{hr darkness}$) 또는 연속 암배양 하였다. 절편을 캘루스 유도배지에 치상한 8주 후 캘루스 형성 정도를 조사하였다.

Fig. 1 Phenotypes of two sea-milkwort accessions, and different response in callus induction and their proliferation depending on genotype, explant type, 2,4-D concentration, and light condition. A: ① flower of ‘RT’ genotype, ② flower of ‘PT’ genotype; B: ① plantlet of ‘RT’, ② plantlet of ‘PT’; C: ①–③ node, root and leaf explants without calli of ‘RT’ or ‘PT’, respectively, under lighted condition, ④–⑥ node, root and leaf explants with abundant calli of ‘RT’ or ‘PT’, respectively, under continuous darkness; D: proliferated calli of ‘RT’ (①, ②) and ‘PT’ (③, ④). Arrows indicate parts with red color in the ‘RT’ genotype

캘루스의 증식

유전자형, 절편의 종류, 2,4-D 첨가농도 및 광조건을 달리한 총 24처리에서 캘루스 형성율과 발생한 캘루스의 양을 조사한 후 각 유전자형에서 우수한 성적을 나타낸 상위 2개 처리에서 얻어진 캘루스를 직경 약 3mm로 분할하여 동일한 조성의 배지로 각각 이식한 후 연속 암조건으로 배양하며 그 증식을 유도하였다. Petri접시당 9개 캘루스 clump를 치상하였으며 처리당 10개 Petri접시를 사용하였다. 캘루스 증식 정도는 배양 5주후 조사하였다.

증식된 캘루스로부터 재분화 유도

각 유전자형에서 증식 정도가 가장 우수한 처리에서 유래한 캘루스를 선택하여 직경 약 5mm clump로 분할한 후 시토키닌의 종류는 다르고 농도는 1.0mg/L로 고정되어 첨가된 배지에 치상한 후 명배양 또는 연속 암배양 하며 재분화를 유도하였다. 캘루스 clump는 Petri접시당 9개를 치상하였으며 처리당 5개의 Petri접시를 사용하였다. 8주후 재분화 양상을 조사하였다.

재분화 신탁의 생장과 발근유도, 마디배양, 생활환 관찰

암배양한 'PT' 유전자형 캘루스에서 재분화된 신탁을 식물 성장조절제 무첨가 MS배지에 치상하여 명배양 함으로써 식물체의 녹화, 발근 및 생장을 유도하였다. 생장한 유식물체는 서언에 언급한 바와 같이 기 보고된 갯봄맞이의 마디배양을 통한 증식체계와 통합하고자 Bae et al. (2016)의 방법에 따라 마디 배양을 수행하여 다신탁을 획득하였다(결과 및 고찰 참조). 기내에서 증식된 다신탁은 뿌리 등에 묻은 배지를 흐르는 수돗물로 완전히 제거한 후 상업용 상토(참사랑, Nongwoo Bio, Korea)가 담긴 50공 plug tray에 이식한 후 수돗물로 상토를 포화시켰다. 관수 후 plug tray는 55×35×15cm 플라스틱 박스에 넣고 박스 상부를 투명한 필름으로 씌운 후 배양실(25±2°C, 16hr 70 μmol·m⁻²·s⁻¹/8hr darkness, RH 65%)에서 기외 순화를 진행하였다. 점진적으로 플라스틱 필름에 구멍을 뚫어주면서 상대적으로 낮은 습도의 외기에 적응시켰다. 순화가 완료된 식물체는 8월 상순 경북대학교 상주캠퍼스의 무가온 플라스틱 필름 온실(coordinate N36°22'46"E128°08'51")에서 수돗물로 관수하며 자연기상 하에서 재배하였고 그 생육과정을 이듬해까지 관찰하였다.

결과 및 고찰

유전자형, 절편의 종류, 광조건 및 2,4-D 첨가농도가 캘루스 유도에 미치는 영향과 선발 캘루스의 증식

'RT' 기내 유식물체로부터는 마디와 뿌리를, 'PT'로부터는

마디와 뿌리 및 잎을 절취하여 2,4-D 농도를 달리한 배지에 치상한 후 광조건을 달리하여 배양하였을 때 처리간 뚜렷하게 다른 캘루스 형성반응을 보였다(Table 1, Fig. 1C). 특징적인 것은 유전자형, 절편의 종류 및 2,4-D 첨가 농도에 무관하게 명배양의 경우는 캘루스 형성이 이루어지지 않았거나 극히 미미한 반면 연속 암배양에서는 각 유전자형이 절편의 종류와 2,4-D 첨가 농도에 의존하여 캘루스를 형성시켰다(Table 1). 'RT'의 경우는 마디를 2,4-D 1.0 또는 3.0mg/L 첨가한 배지에(Fig. 1C④), 'PT'는 뿌리를 2,4-D 0.1 또는 1.0mg/L 첨가한 배지에(Fig. 1C⑤)에 각각 치상한 후 연속 암배양했을 때 가장 왕성하게 캘루스가 형성되었다. 유기된 캘루스는 처리에 따른 외형적 차이가 없었고 다양한 식물 종에서 보고된 체세포배발생 캘루스와 유사하게 황색을 띠고 잘 부스러지는 특징을 보였지만(Ikeuchi et al. 2013; Raghavan 2004; Tomes and Smith 1985) 본 연구를 통틀어 어떠한 체세포배발생도 관찰되지는 않았다.

캘루스 형성에 유전자형, 절편의 종류, 배지조성 및 광조건 등이 영향을 미칠 수 있다는 사실은 다수의 보고(Farhadi et al. 2017; Scalzo et al. 2016)를 통해 확인할 수 있지만 갯봄맞이가 속한 *Glaux* 속 식물의 기내배양을 통한 캘루스 유도에 관한 보고는 찾아볼 수 없다. 본 연구의 결과는 갯봄맞이 캘루스 유도에 암배양이 필수적일 수도 있다는 것을 나타낸다.

2,4-D 1.0 또는 3.0mg/L 첨가배지에 'RT' 마디를 배양하여 유기된 캘루스와 2,4-D 0.1 또는 1.0mg/L 첨가배지에 'PT' 뿌리를 배양하여 유기된 캘루스를 대상으로 각각 동일한 조성의 배지에 이식하여 연속 암배양하면서 캘루스의 증식을 도모하였다. 생장 정도에 약간의 차이는 있었지만 모든 캘루스가 왕성하게 생장하여 증식되었고 증식된 캘루스는 절편 또는 유전자형에 따른 외형적 차이가 관찰되지 않았다(Table 2; Fig. 1D).

캘루스로부터 신탁 형성에 미치는 유전자형, 광조건 및 시토키닌의 효과

각 유전자형에서 생장이 가장 왕성하였던 처리에서 유래한 캘루스를 성장조절제 무첨가 배지와 3종의 시토키닌(BA, zeatin, TDZ)이 각각 1.0mg/L 첨가된 배지에 이식하고 광조건을 달리하여 배양함으로써 재분화를 유도하였다. 'RT' 캘루스는 명·암배양 모두에서 대부분 미미하게 생장하거나 일부 생장이 지속된 것이라 할지라도 흰색 또는 수화된 불투명한 외형을 나타내다가 갈변하였으며, 명배양에서는 아주 드물게 붉은색 색소가 침착된 캘루스가 생장하였다(자료 미제시). 즉, 'RT' 캘루스에서는 신탁나 뿌리 등의 기관 분화는 전혀 관찰할 수 없었다. 반면, 'PT' 명배양 캘루스는 생장과 더불어 녹화가 진행되었고 배양 6주후부터 성장조절제 무첨가 배지 및 zeatin과 TDZ가 1.0mg/L 첨가된 각각의 배지에서 마디구조(nodular structure)가 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 2A).

Table 1 Distinguishable responses depending on genotype, explant type, lighted condition, and 2,4-D concentration in callus induction of sea-milkwort

Genotype	Explant	Lighted condition	2,4-D (mg/L)	Explant generating callus (%)	Amount of callus within explant with callus	
‘Red type’	Node	16hr light/8hr Dark	0.0	0.0 f	- ^a	
			0.1	0.0 f	-	
			1.0	0.0 f	-	
			3.0	4.0 e	+	
		Continuous dark	0.0	0.0 f	-	
			0.1	14.0 d	+	
			1.0	50.0 a	++	
			3.0	56.0 a	++	
	Root	16hr light/8hr Dark	0.0	0.0 f	-	
			0.1	0.0 f	-	
			1.0	0.0 f	-	
			3.0	0.0 f	-	
		Continuous dark	0.0	0.0 f	-	
			0.1	14.0 d	+	
			1.0	32.0 b	+	
			3.0	22.0 cd	+	
	‘Pistachio type’	Node	16hr light/8hr Dark	0.0	0.0 f	-
				0.1	0.0 f	-
				1.0	0.0 f	-
				3.0	0.0 f	-
Continuous dark			0.0	0.0 f	-	
			0.1	40.0 c	+	
			1.0	68.0 a	++	
			3.0	62.0 ab	++	
Root		16hr light/8hr Dark	0.0	0.0 f	-	
			0.1	8.0 e	+	
			1.0	0.0 f	-	
			3.0	0.0 f	-	
		Continuous dark	0.0	0.0 f	-	
			0.1	68.0 a	+++	
			1.0	70.0 a	+++	
			3.0	36.0 c	+	
Leaf		16hr light/8hr Dark	0.0	0.0 f	-	
			0.1	0.0 f	-	
			1.0	0.0 f	-	
			3.0	0.0 f	-	
	Continuous dark	0.0	0.0 f	-		
		0.1	6.0 e	+		
		1.0	30.0 cd	+		
		3.0	8.0 e	+		

Values in the column of 'Explant generating callus (percent)' within each genotype followed by the same letter are not significantly different at the 5 percent level (Duncan's multiple range test). ^adegree of callus induction: -, none; +, poor; ++, moderate; +++, abundant.

zeatin 1.0mg/L 첨가배지에서 명배양된 캘러스에서 발생한 마디구조 일부는 뿌리가 길고 신초는 빈약한 불완전한 어린 식물체로 분화를 이어갔다(Fig. 2A). 그 빈도는 4.4%였으며 이것을 발근 유도 배지로 이식하였을 때는 모두 고사하였다(Table 3). 한편 'PT'의 암배양 캘러스는 4종의 신초유도 배지 모두에서 생장을 지속하였으며 녹색 또는 붉은색 색소는 관찰되지 않았다. 생장조절제 무첨가 배지와 zeatin 1.0mg/L 첨

가배지에서 배양 6주후 명배양에서와 마찬가지로 뚜렷한 마디구조가 관찰되었고 zeatin 1.0mg/L 첨가배지에서만 마디구조 일부(24.4%)가 정상적 신초로 분화하였다(Fig. 2A). 이 경우 뿌리구조는 관찰되지 않았다. 신초의 분화 전 모조적 또는 캘러스에서 마디구조가 먼저 형성되는 경우가 여러 식물 종에서 보고된 바 있으며 이런 마디구조는 식물체 증식의 좋은 재료가 될 수 있다(de Souza et al. 2017; Han et al. 2004;

Table 2 Proliferation of collected sea-milkwort calli after subculture on the same media under continuous darkness

Genotype	Source explant	2,4-D (mg/L)	Callus proliferation
'Red type'	Node	1.0	+++ ^a
		3.0	++
'Pistachio type'	Root	0.1	++
		1.0	+++

^adegree of callus proliferation: -, none; +, poor; ++, moderate; +++, vigorous

Table 3 Effect of genotype and cytokinin on shoot induction from callus in sea-milkwort

Genotype	Callus origin		Light condition	Cytokinin (mg/L)	Shoot induction rate (%)
	Explant	2,4-D (mg/L)			
'Red type'	Node	1.0	16hr light/8hr dark	Free	0.0
				BA 1.0	0.0
				zeatin 1.0	0.0
				TDZ 1.0	0.0
			Continuous dark	Free	0.0
				BA 1.0	0.0
				zeatin 1.0	0.0
				TDZ 1.0	0.0
'Pistachio type'	Root	1.0	16hr light/8hr dark	Free	0.0 c
				BA 1.0	0.0 c
				zeatin 1.0	4.4 b
				TDZ 1.0	0.0 c
			Continuous dark	Free	0.0 c
				BA 1.0	0.0 c
				zeatin 1.0	24.4 a
				TDZ 1.0	0.0 c

Values in the column of 'Shoot induction rate (percent)' within 'PT' genotype followed by the same letter are not significantly different at the 5 percent level (Duncan's multiple range test).

Yokoyama et al. 2011). 한편, 식물 종에 따라, 또는 동일 종의 재분화를 위한 배양단계에 따라 광을 요구하는 경우와 요구하지 않는 경우가 있다(Compton 1999; Curuk et al. 2003; Leshem et al. 1995). 갯봄맞이의 경우는 본 연구에 관한 한 캘루스의 유도 증식 뿐 아니라 신초의 초기 분화를 위해서 광을 요구하지 않는 것으로 판단된다(Table 1, Table 3, Fig. 1C, 1D, Fig. 2A).

신초의 발근과 생장, 마디배양, 기외 이식, 생활환의 관찰

'PT' 캘루스를 zeatin 1.0mg/L 첨가한 배지에서 암배양 함으로써 얻어진 신초를 기 보고된 마디배양(Bae et al. 2016)을 위한 재료로 활용하기 위해 재분화된 신초를 생장조절제 무첨가 MS배지에 이식한 후 명배양 하였다. 연갈색의 신초는 이식과 더불어 점차 녹화하였으며 배양 약 4주후 정상적 잎과 뿌리가 형성된 식물체로 생육하였다(Fig. 2B). 이 단계의 유

식물체는 기내 파종한 7주 후 싹생과 비등한 크기에 도달한 것이며 다신초 유도를 위한 마디배양 재료로 다시 활용할 수 있다. 유식물체의 정단부와 마디를 분할한 후 모두를 BA 0.5mg/L와 IAA 0.5mg/L가 혼용 첨가된 MS배지에 치상하여 다신초를 유도하였을 때 Bae et al. (2016)의 결과와 일치하는 마디당 신초 수, 신초의 평균 초장 및 발근 양상을 나타냄으로써(자료 미제시) 'PT' 캘루스 배양에서 유래한 유식물체도 마디배양을 위한 효과적 재료로 활용될 수 있고 본 연구를 통해 얻어진 일련의 결과는 기 보고된 마디배양 체계에 통합시킬 수 있음이 확인되었다. 다신초 cluster는 기외 순환에서 모두 생존하였고 온실 자연환경 재배에서 정상적으로 생육하였다(Fig. 2B). Bae et al. (2016)의 보고와 일치하게 당해 연도에는 개화 없이 생육만 지속하다가 겨울철이 다가옴에 따라 지상부와 뿌리는 고사하였고 하계 지하부에서 생장한 offshoot의 선단에서 발생한 휴면아(hibernacle)가 월동하였으며 이듬해 봄에 맹아 하여 생육을 재개한 후 4월 14일경

Fig. 2 Responses of ‘PT’ calli on media with 1.0mg/L cytokinins under different lighted conditions (A), and further growth and development of acclimatized plantlets ex vitro (B) in sea-milkwort. Arrow heads with common letters represent nodular structure (N), root (R), shoot (S), and flower, respectively

개화하였다(Fig. 2B, Bae et al. 2016). 캘루스에서 재분화한 식물체의 마디배양을 통해 증식·순화된 식물체는 내륙 담수 관수 자연환경에서 Bae et al. (2016)와 Jerling (1988b)의 보고와 정확히 일치하는 생활환을 나타내었다.

적 요

우리나라에서 멸종위기 해안식물로 지정된 갯봄맞이의 캘루스배양을 통한 재분화 프로토콜을 보고한다. 마디배양을 통해 육성한 기내 유식물체의 절편은 유전자형, 절편의 종류, 광조건 및 2,4-D 첨가농도에 따라 캘루스 형성에 상이한 반응을 보였다. 특히, 다른 처리와는 무관하게 연속 암배양이 절편으로부터 캘루스 유도에 결정적인 영향을 미쳤다. 2,4-D 0.1–3.0mg/L 농도 범위의 배지에서 유도된 캘루스를 동일한 조성의 배지로 이식하여 암배양했을 때 왕성하게 캘루스가 증식하였다. 연속 암조건에서 zeatin 1.0mg/L 첨가배지에 ‘Pistachio’ 유전자형의 캘루스를 배양했을 때만 유일하게 정상적인 신초가 재분화 되었고, 이 때 신초는 캘루스로부터 형성된 마디구조에서 발달하였으며 신초의 재분화율은 24.4%였다. 재분화 신초를 식물호르몬 무첨가 배지로 이식하여 명배양했을 때 지상부 녹화와 더불어 뿌리가 발생하여 유식물체로 발달하였다. 기내 유식물체를 기 보고된 마디배

양 프로토콜(Bae et al. 2016)에 따라 배양했을 때 효과적으로 유식물체를 증식시킬 수 있었다. 기외 순화시킨 유식물체는 내륙 자연 환경하에서 성숙식물체로 생육하였으며 이듬해 4월에 개화하였다. 본 연구의 결과는 Bae et al. (2016)이 제안한 마디배양 프로토콜과 통합하여 운용될 수 있고, 통합된 프로토콜은 갯봄맞이의 기내 번식 시스템으로서 갯봄맞이 자생지 복원에 기여할 수 있을 것이다.

References

- APG III (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Bot J Linn Soc 161:105–121
- Bae SJ, Kang BC, Jeon MH, Kim SC, Kim CK, Han JS (2016) In vitro multiplication through single-node culture of sea-milkwort (*Glaux maritima* L.) Korean J Hortic Sci Technol 34:461–471
- Bunn E, Turner SR, Dixon KW (2011) Biotechnology for saving rare and threatened flora in a biodiversity hotspot. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 47:188–200
- Compton ME (1999) Dark pretreatment improves adventitious shoot organogenesis from cotyledons of diploid watermelon. Plant Tissue Organ Cult 58:185–188
- Curuk S, Ananthakrishnan G, Singer S, Xia X, Elman C, Nestel D, Cetiner S, Gaba V (2003) Regeneration in vitro from the

- hypocotyls of *Cucumis* species produces almost exclusively diploid shoots, and does not require light. HortScience 38:105–109
- De Souza TV, Thiesen JF, Lando AP, Guerra MP, Santos M (2017) Morpho-histodifferentiation of *Billbergia* nodular cultures. Protoplasma 254:435–443
- Farhadi N, Panahandeh J, Azar AM, Salte SA (2017) Effects of explant type, growth regulators and light intensity on callus induction and plant regeneration in four ecotypes of Persian shallot (*Allium hirtifolium*). Sci Hort 218:80–86
- Han JS, Oh DG, Mok IG, Park HG, Kim CK (2004) Efficient plant regeneration from cotyledon explants of bottle gourd (*Lagenaria siceraria* Standl.). Plant Cell Rep 23:291–296
- Ikeuch M, Sugimoto K, Iwase A (2013) Plant callus: Mechanisms of induction and Repression. Plant Cell 25:3159–3173
- IUCN (2015) Threatened species in past and present IUCN Red Lists: 2015, The IUCN Red List of Threatened Species™ 2-2015: Summary statistics. Available via http://www.iucnredlist.org/about/summary-statistics#Tables_1_2 Accessed 9 September 2015
- Jerling L (1988a) Clone dynamics, population dynamics and vegetation pattern of *Glaux maritima* on a Baltic sea shore meadow. Vegetatio 74:171–185
- Jerling L (1988b) Population dynamics of *Glaux maritima* L. along a distributional cline. Vegetatio 74:161–170
- Leshem B, Ronen R, Soudry E, Lurie S, Gepstein S (1995) Cytokinin and white light coact to enhance polypeptide metabolism and shoot regeneration in cultured melon cotyledons. J Plant Physiol 145:291–295
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised method for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:472–497
- NIBR (National Institute of Biological Resources) (2012) Korean Red List of Threatened Species-Vascular plants. Nature and Ecology, Incheon, Republic of Korea
- Pence VC (2011) Evaluation costs for the in vitro propagation and preservation of endangered plants. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 47:176–187
- Pence VC (2013) In vitro methods and the challenge of exceptional species for target 8 of the global strategy for plant conservation. Ann Miss Bot Gard 99:214–220
- Raghavan V (2004) Role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of Arabidopsis: cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D. American J Bot 91:1743–1756
- Sahai A, Shahzad A, Sharma S (2010) Histology of organogenesis and somatic embryogenesis in excised root cultures of an endangered species *Tylophora indica* (Asclepiadaceae). Austrian J Bot 58:198–205
- Scalzo J, Donno D, Miller S, Ghezzi M, Mellano MG, Cerutti AK, Beccaro GL (2016) Effect of genotype, medium and light on in vitro plant proliferation of *Vaccinium* spp. New Zealand J Crop Hort Sci 44:231–246
- Son SW, Lee BC, Yang HH, Seol YJ (2011) Distribution of five rare plants in Korea. Korean J Pl Taxon 41:280–286
- Tomes DT, Smith OS (1985) The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm. Theor Appl Gen 70:505–509
- Yokoyama T, Moriyasu Y, Sugawara Y (2011) Adventitious bud formation through nodule induction by thidiazuron in cultured leaf segments of the Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). Plant Biotech 28:339–344