

고추냉이 신초의 생육에 미치는 배지의 Salt Strength, Sucrose 농도 및 NH₄/NO₃ 비율의 영향

박윤영, 조문수*, 정종배
대구대학교 생명환경대학 생명환경학부

Effect of Salt Strength, Sucrose Concentration and NH₄/NO₃ Ratio of Medium on the Shoot Growth of *Wasabia japonica* in Vitro Culture

Yun Young Park, Moon Soo Cho*, and Jong Bae Chung

College of Life and Environment, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea

ABSTRACT To establish a optimum culture condition in vitro for production of seedlings in *Wasabia japonica*, the effects of salt strength, sucrose concentration, and NH₄/NO₃ ratio on the shoot growth in MS medium were investigated. The full strength of MS medium was the best condition for shoot growth, and in 1/4~1/2x or 2x MS medium the growth was significantly suppressed. Growth of shoots was enhanced when sucrose was added in MS medium after 2 weeks of culture, and the best result was found at 3% sucrose addition. NH₄⁺/NO₃⁻ ratio of 10:50 gave the highest biomass of shoot in the liquid culture with MS medium, and increasing the NH₄⁺ ratio in the medium significantly reduced the growth of shoot.

서 론

고추냉이(*Wasabia japonica*)는 십자화과에 속하는 숙근성 반음지 식물로 전 세계적인 건강식품으로 인정을 받고 있다. 재배적지가 한정되어 있어 번식과 재배가 힘든 상황이며 그 생산량도 적다 (Park et al. 2007). 최근 일본에서는 뉴질랜드와 대만 등에서 고추냉이를 수입하고 있으며, 우리나라에서도 고추냉이 소비량의 대부분을 수입에 의존하고 있다 (Byeon et al. 2004). 국내에서 고추냉이 대량생산을 위한 연구로 조직배양 기법을 이용한 무병주 육성 및 고추냉이 미숙배를 이용한 체세포배 발생 및 식물체 증식, 정단분열조직에 의한 미세증식이 연구된 바 있고, 고추냉이의 유묘의 대량증식을 위한 화경절배양법에 관한 연구가 보고

되어 있다 (Eun et al. 1996, 1997, 1998).

일반적으로 다신초의 기내증식 방법은 분할한 신초를 반고체배지에서 계대배양을 통해 증식시킨다. 그러나 질적으로 우수한 묘는 건전하게 생육하나 신초의 길이가 2 cm 이하이며 생체중이 0.05 g 이하의 생육이 불량한 신초는 계대배양 중에 고사하거나 소실되는 경우가 많다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 액체진탕배양 방법을 통한 기내 묘의 증식에 있어서 신초생육을 촉진시켜 강건한 묘를 빠른 시일 내에 대량으로 생산할 수 있는 기술의 확립이 필요하다.

식물 세포나 조직의 배양에서 배지의 salt strength, sucrose 농도, 질소 함량과 질소원의 종류 및 그 비율 등이 세포 또는 조직의 생장에 크게 영향을 미치며 2차 대사산물의 생성에도 영향을 미친다 (Moreno et al. 1995, Pan et al. 2004). 따라서 식물조직배양에 MS 배지가 널리 사용되지만 (Murashige and Skoog 1962), 이 배지의 기본 조성이 각종 식물체의 조직 분화와 발달에 필요한 최적의 조건이 되지 못하는 경우

*Corresponding author Tel 053-850-6714 Fax 053-850-6719
E-mail: mscho@daegu.ac.kr

가 많다 (Chevreau et al. 1989, Leblay et al. 1991, Yepes and Aldwinckle 1994, Matt and Jehle 2005).

본 연구에서는 고추냉이 유묘의 대량 생산에 필요한 최적 배지조건을 구명하기 위하여 배지의 salt strength, sucrose 농도 및 NH_4/NO_3 비율이 고추냉이 신초의 생육에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

식물재료

강원도 평창 지역에서 물재배 고추냉이 (*Wasabia japonica* '島根 품종)의 종자를 수확하여 꼬투리 채 건조시킨 후 2°C에서 보관하며 실험에 사용하였다. 종자를 sodium hypochlorite 2% 용액으로 20분간 처리하여 소독하였으며, 멸균수로 3회 세척한 후 휴면타파를 위해 2°C의 냉장고에서 100 mg/L의 GA₃ 용액에 10일간 침적시켰다. 휴면타파 후 위와 같은 방법으로 종자를 2차 소독한 다음 치상하였다.

0.6% agar를 함유한 MS 기본배지에 파종하였으며 (Murashige

and Skoog 1962), 본엽이 2~3매 출현했을 때 정단분열조직 및 엽원기 1~2매를 포함시켜 절취하였다. 절취한 시료를 BA 1 mg/L를 첨가한 MS 기본 액체배지에서 2주간 130 rpm으로 진탕 배양하였으며, 이어서 조성이 같은 반고체배지에서 30~60일 동안 계대배양하여 다신초를 유도하였다. 배지는 pH를 5.7로 조정한 다음 고온고압멸균기로 121°C에서 15분간 멸균한 후 사용하였다. 액체진탕배양은 100 mL 삼각플라스크에 30 mL의 액체배지를 분주하여 130 rpm으로 진탕하였으며, 배양환경은 온도 20±1°C, 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 광도 하에서 16시간, 암상태 8시간의 광주기로 하였다.

다신초를 액아와 본엽이 2~3매 되도록 분할하였으며 약 0.05 g 이하의 생체중을 지닌 신초를 대량증식 조건 구명을 위한 실험의 재료로 사용하였다 (Figure 1).

무기성분 농도 효과 조사

신초의 생장에 적합한 배지의 salt strength를 조사하기 위하여 MS 배지를 기본으로 1/4, 1/2, 1, 2배의 salt strength로 조정한 배지에 BA 1 mg/L, sucrose 3%를 동일하게 첨가한

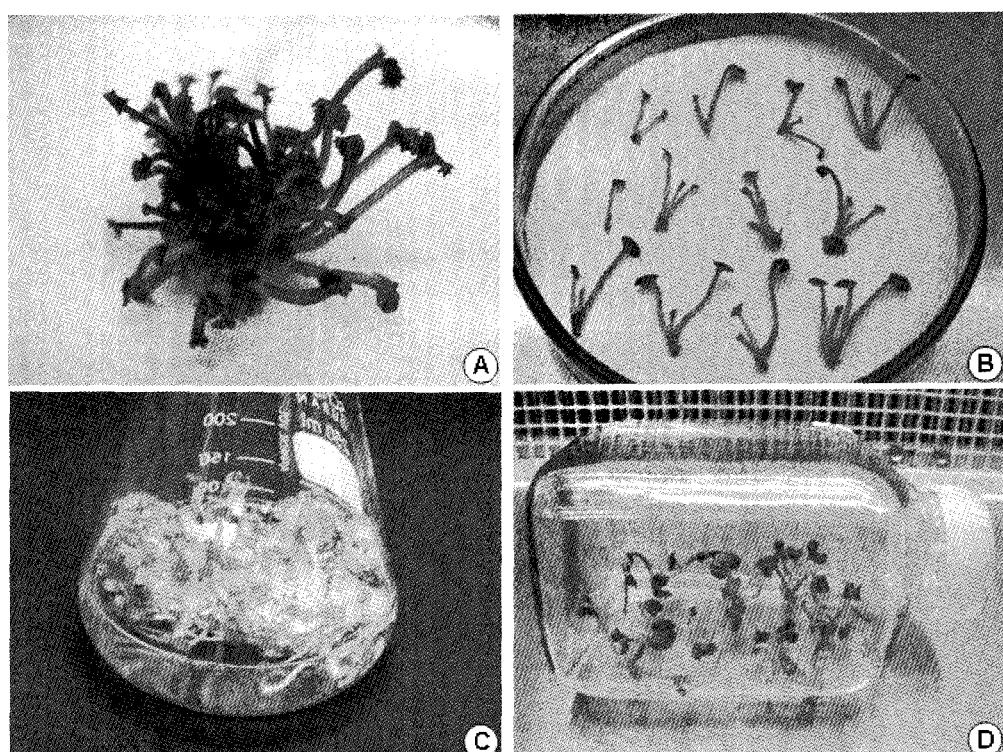


Figure 1. Production of multiple shoots of *Wasabia japonica*. A: multiple shoots onto MS medium with BA 1.0 mg/L after 2 weeks in liquid medium and after 4 weeks of subculture in semi-solid medium, B: separation of multiple shoots, C: multiple shoots in MS liquid medium with BA 1.0 mg/L after 2 weeks, D: Induction of roots onto MS semi-solid medium.

후 2주간 액체진탕방법으로 배양하였다. pH를 5.7로 조정한 다음 고온고압멸균기로 121°C에서 15분간 멸균한 액체배지 60 mL를 250 mL 삼각플라스크에 분주하고 분할한 신초를 넣은 후 130 rpm으로 진탕배양 하였다. 배양환경은 온도 20±1°C, 40 μmol/m²/s의 광도 하에서 16시간, 암상태 8시간의 광주기로 하였으며, 처리별로 12반복으로 실험을 수행하였다. 2주간의 액체진탕배양 후 증식된 신초의 수와 길이 및 생체중을 조사하였다.

Sucrose 농도 효과 조사

신초의 생장에 미치는 sucrose 농도의 영향을 조사하고자 BA 1 mg/L가 첨가된 MS 기본액체배지에 sucrose를 1, 3, 6%로 달리 처리하여 2주간 배양한 후 증식된 신초의 수와 길이 및 생체중을 조사하였다. 배양방법은 위 무기성분 농도 효과 조사에서 사용한 방법과 동일하였다.

NH₄/NO₃ 비율 효과 조사

배지 중의 질소원 NH₄⁺과 NO₃⁻ 농도 비율이 고추냉이 신초의 생장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MS 기본액체배지의 초기 총 질소 농도인 60 mM을 기준으로 하여 NH₄⁺ : NO₃⁻ 비율을 0:60, 10:50, 20:40, 30:30, 40:20, 50:10, 60:0으로 조절하여 처리하였다. 질소원 비율 0:60, 10:50, 20:40 처리의 경우에는 NH₄⁺과 NO₃⁻의 농도를 NH₄NO₃와 KNO₃를 이용하여 조절하였다. 30:30 처리의 경우에는 NH₄⁺과 NO₃⁻의 농도를 NH₄NO₃로 조절하였으며 K의 결핍을 보완하기 위하여 KCl 19 mM을 첨가하였다. 40:20, 50:10, 60:10 처리의 경우에는 NH₄⁺ 농도는 (NH₄)₂SO₄와 NH₄Cl로 조절하였으며 NO₃⁻ 농도는 KNO₃를 이용하여 조절하였으며 K의 결핍을 보완하기 위하여 KCl 19 mM을 첨가하였다. 각 처리별 배지에 BA 1 mg/L, sucrose 3%를 동일하게 첨가하여 2주간 신초를 배양하였다. 배양방법은 위 무기성분 농도 효과 조사에서 사용한 방법과 동일하였다. 실험 종료 후 증식된 신초수, 신초길이, 생체중을 조사하였으며 또한 배지의 pH 변화와 신초 중의 NH₄⁺과 NO₃⁻의 함량을 다음과 같이 조사하였다. 신초를 68°C oven에서 3일 간 건조시킨 후 Willy mill로 분쇄하여 분석 시료로 사용하였다. 신초 중의 NH₄⁺과 NO₃⁻를 끓는 물로 추출하였으며, 추출액을 0.45 μm membrane filter에 통과시킨 후 flow injection autoanalyzer (FIAstar 5000

system, Foss Tecator, Sweden)를 이용하여 NH₄⁺과 NO₃⁻를 분석하였다.

통계처리

처리 사이의 유의성 검정은 SAS 프로그램을 이용하여 5% 유의범위 수준에서 Duncan 다중비교로 처리하였다 (SAS Institute 1989).

결과 및 고찰

배지의 Salt Strength에 따른 신초의 생장

액체진탕배양에서 고추냉이 신초의 기내 증식에 적합한 MS 배지의 salt strength를 조사한 결과는 Table 1과 같다. 신초수는 1/4x MS 배지에서 1x MS 배지까지 무기성분 농도와 비례하여 증가하다가 salt strength가 더 높은 2x MS 배지에서는 감소하였으나 모든 처리구에서 유의차 없이 평균 2개로 분할이 가능하였다. 신초의 길이 또한 같은 경향은 보였으나 1x MS 배지에서 4.8 cm로 가장 길었으며, 1/4x 또는 1/2x MS 배지의 신초에 비하여 길이가 2배 이상으로 길었다. MS 배지의 염 농도를 기본배지의 2배로 하였을 때 신초의 길이 신장은 현저히 감소하였다. MS 기본배지에서 신초의 길이가 2주 만에 매우 빠른 속도로 증식되어 평균 3.6 cm의 길이 신장을 보였으며 100 mL의 플라스크의 배양병에 더 이상 배양하기 어려웠다 (Figure 1). 생체중도 MS 기본배지에서 1.8 g으로 가장 높았으며, 기본 배지에 비하여 염 농도를 낮추거나 증가시켰을 때 생체중이 현저히 낮았다. Salt strength가 높은 2x MS 배지에서는 식물체가 검게 변하고 잎과 융병의 비틀림 및 비대가 심한 기형을 나타내었다.

Table 1. Effect of various medium salt strengths on shoot multiplication of *Wasabia japonica* after 2 weeks of liquid culture

Strength of medium salt	No. of shoots	Shoot length (cm)	Fresh weight (g/plant)
1/4x MS	7.7a ²	2.2b	0.2b
1/2x MS	8.8a	2.3b	0.3b
1x MS	9.2a	4.8a	1.8a
2x MS	8.5a	2.8b	0.6b

²Mean separation in columns by Duncan's multiple range test, 5% level.

배지의 수분포텐셜은 세포나 식물체가 배지로부터 물과 무기영양분 등을 흡수하고 이용하는데 영향을 준다. 본 연구의 결과는 *Gymmemma* 세포배양에서 MS 배지의 염 농도가 세포생장에 미치는 결과는 유사하였는데 (Lee et al. 2006), 2x MS 배지에서 생장량의 감소는 고농도의 염에 의해 배지의 수분포텐셜이 낮아져 세포가 배지로부터 세포분열과 생장에 필요한 수분 흡수가 억제되기 때문인 것으로 추측하였다. 그러나 오리엔탈 나리 *Casa Blanca*의 경우 배지의 염 농도가 높을수록 다신초의 형성 수 및 생체중이 증가하여 2x MS 배지가 가장 우수하다고 하였으며 (Woo et al. 2001), 백합 조직배양의 경우 sucrose를 9% 참가하였을 때 1/2x MS 배지가 가장 적합한 것으로 알려져 있다 (Ikeda et al. 2003). 따라서 식물의 종류별로 또는 배양 부위별로 sucrose 농도의 영향이 다소 다르게 나타나는 것으로 생각된다.

고추냉이의 신초 증식은 salt strength가 낮은 배지에서는 저조하였고, MS 기본배지에서는 신초수의 증가, 길이 신장 및 생체증 증가가 뛰어나 MS 기본배지가 고추냉이의 신초 증식에 가장 적합한 것으로 판단된다.

Sucrose 농도에 따른 신초의 생장

배지의 sucrose 농도가 고추냉이 신초의 생육에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 신초의 수는 배양 2주 후 sucrose 1, 3, 6%에서 각각 4.9, 4.5, 4.1개로 유의차 없이 나타났다. 신초의 길이는 sucrose 3%에서 3.0 cm로 다른 처리구에서 2.3 cm인 것에 비해 0.7 cm 길게 나타났다. 생체증은 sucrose 농도 1%에 비하여 3% 및 6%에서 높게 나타났다. Sucrose 농도 6% 처리의 경우 3% 처리에 비하여 신초의 수가 적고 또한 길이도 짧은데 두 처리간의 생체증의 차이가 없는 것은 sucrose 농도 6% 처리에서 엽육이 두꺼워지고 엽병이 비대해지는 현상 때문에 나타나는 결과로 판단된다.

Table 2. Effect of sucrose concentration on shoot multiplication of *Wasabia japonica* after 2 weeks of liquid culture

Sucrose concentration (%)	No. of shoots	Shoot length (cm)	Fresh weight (g/plant)
1	4.9a ^z	2.3a	0.3b
3	4.5a	3.0a	0.6a
6	4.1a	2.3a	0.6a

^zMean separation in columns by Duncan's multiple range test, 5% level.

Sucrose는 탄소원과 삼투안정제로 배양하는 세포나 식물 조직의 생장에 중요한 역할을 하는데, 일반적으로 배지의 sucrose 농도가 증가할수록 배양체의 생체증이나 2차 대사산물이 증가하는 것으로 알려져 있다 (Zhao et al. 2001). 더 턱의 체세포배로부터 식물체 재생에 관한 연구에 따르면 sucrose 농도가 1%에서 3%로 증가하면서 신초의 수나 길이가 가장 많이 증가하다가 3% 이상의 농도에서는 급격히 감소하였고 생체증은 sucrose 4%에서 최고로 높으며 8%까지 유사하게 높다가 그 후 급격히 감소한다고 하였다 (Choi and Choi 1999). 1/2x MS 배지에서 백합의 줄기 박편을 배양할 때 sucrose 3~4%에서 신초 생성이 우수하였으며 반면 뿌리 생성에는 sucrose 2%가 적절한 것으로 나타났으며 (Nhut et al. 2001), 1/2x M5 배지에서 9%의 sucrose 농도가 백합의 유묘생성에 가장 적합한 것으로 나타났다 (Ikeda et al. 2003). 따라서 배지의 종류, 식물의 종류 또는 배양에 사용하는 조직 등에 따라서 sucrose 적정 농도는 크게 달라질 수 있다. 본 실험에서는 처리간의 큰 차는 없었으나 신초의 수와 길이 그리고 생체증을 함께 고려할 때 고추냉이의 신초 증식에 가장 적합한 sucrose 농도는 3%로 판단된다.

NH₄⁺/NO₃⁻ 비율에 따른 신초의 생장

식물은 NH₄⁺과 NO₃⁻ 형태의 질소를 흡수 이용하는데, 식물의 종류와 발달 단계에 따라 질소원별 흡수 능력과 이용 형태가 다르다 (Touria and Douglas 1998). 질소는 식물에 흡수되어 단백질, 혼산, 아민류, 염록소, 조효소 등의 주요 화합물로 동화되며 식물생장에 큰 영향을 미친다. 토양이나 양액 또는 배지 중의 NH₄⁺과 NO₃⁻의 비율은 식물의 생장과 물질의 생산뿐만 아니라 식물의 형태 발생에도 영향을 미친다 (Choi and Soh 1997).

MS 기본액체배지 중의 NH₄⁺ : NO₃⁻ 비율이 고추냉이 신초의 생육에 미치는 영향을 조사한 결과는 Figure 2와 3에 나타내었다. NH₄⁺ : NO₃⁻ 비율별 처리 중에서 NO₃⁻의 비율이 높아질수록 고추냉이 신초의 수와 길이 및 생체증이 모두 증가하는 경향을 보였으며, NH₄⁺ : NO₃⁻ 비율 0:60과 10:50 처리 구에서 신초의 수와 길이 및 생체증이 모두 가장 우수하였다. NH₄⁺ : NO₃⁻ 비율이 MS기본배지 농도인 20:40을 비롯하여 30:30, 40:20 까지는 유의차 없이 비슷한 경향을 보였다. 그러나 NH₄⁺ 비율이 훨씬 높은 50:10, 60:0 처리구에서는 신초의 생장이 매우 저조하였으며 식물체가 겹게 변하였다.

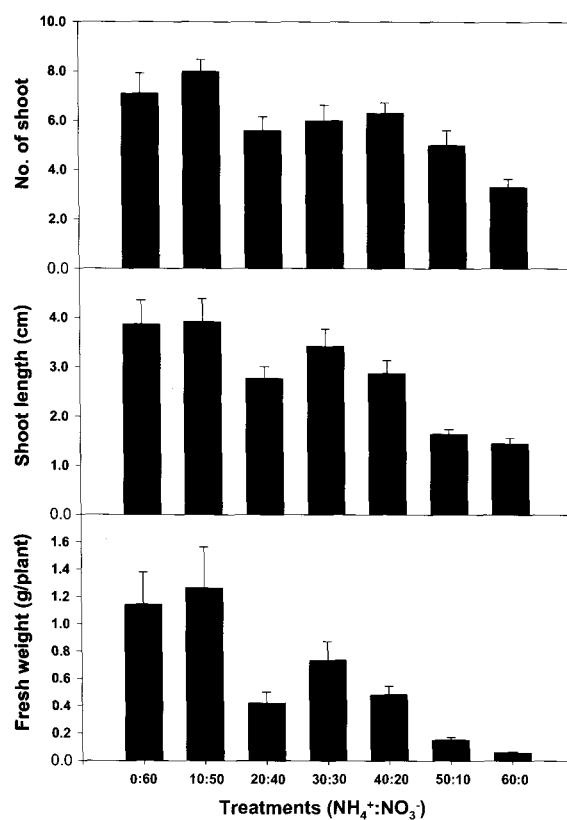


Figure 2. Effect of various ratio of NH_4^+ and NO_3^- in MS medium on shoot multiplication of *Wasabia japonica* after 2 weeks of liquid culture.

배양 2주 후의 식물체 중의 NH_4^+ 과 NO_3^- 함량을 분석한 결과는 Table 3과 같다. 배지에 처리된 질소원 중에서 NO_3^- 의 비율이 높을수록 식물체 중의 NO_3^- 함량이 증가하였으며, 반대로 NH_4^+ 의 비율이 높을수록 식물체 중 NH_4^+ 의 함량이 증가하였다. 특히 NH_4^+ 비율이 상대적으로 높은 40:20, 50:10, 60:0 처리구에서는 식물체 중에 40 mg/kg 이상의 NH_4^+ 질소가 축적되었으며, 60:0 처리구에서는 NH_4^+ 질소가 112.8 g/kg까지 과다하게 축적되었다. 배양 2주 후 배지의 pH를 조

Table 3. Effect of various ratio of NH_4^+ and NO_3^- on nitrogen contents of *Wasabia japonica* plantlets after 2 weeks of liquid culture

Nitrogen ratio (mM)	Content (g/kg)		
	$\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$	$\text{NO}_3\text{-N}$	$\text{NH}_4\text{-N}$
0:60		13.9	10.1
10:50		16.4	17.2
20:40		7.5	24.8
30:30		4.3	21.7
40:20		0.9	42.3
50:10		0.6	54.7
60:0		0.0	112.8

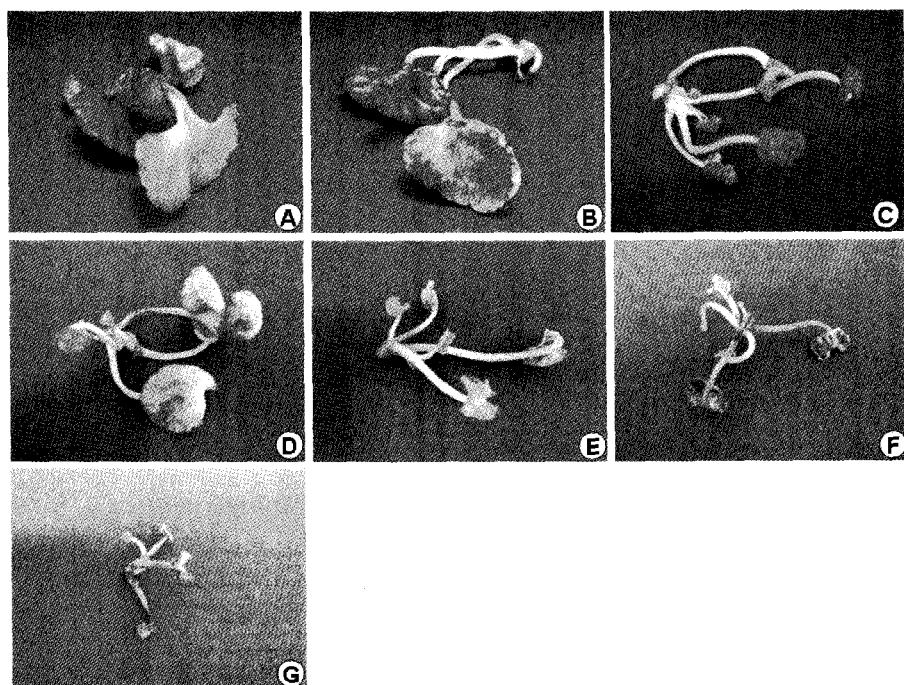


Figure 3. Growth responses of *Wasabia japonica* seedlings *in vitro* with various ratio of NH_4^+ and NO_3^- after 2 weeks of liquid culture (Ratio of NH_4^+ and NO_3^- : A: 0:60, B: 10:50, C: 20:40, D: 30:30, E: 40:20, F: 50:10, G: 60:0).

Table 4. Change in pH of medium with various ratio of NH_4^+ and NO_3^- after 2 weeks of liquid culture in *Wasabia japonica*

$\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ (mM)	0:60	10:50	20:40	30:30	40:20	50:10	60:0
pH	6.1a ^z	5.9b	5.6cd	5.6bcd	5.7bc	5.4d	4.46e

^zMean separation in columns by Duncan's multiple range test, 5% level.

사한 결과 Table 4와 같다. 배지에 처리된 질소원 중에서 NH_4^+ 비율이 높을수록 배지의 pH가 낮아졌으며 특히 질소원으로 NH_4^+ 만을 공급한 60:0 처리구에서는 배지의 pH가 4.4로 식물생육을 심하게 저해할 수 있는 강한 산성을 나타내었다. 이와 같은 결과를 보면 배지중의 질소 중에서 NH_4^+ 형태가 많아지면 고추냉이 신초의 생장이 저해되며 따라서 흡수된 NH_4^+ 이 적절히 동화되지 못하고 체내에 과다하게 축적되는 것으로 판단된다. 식물체 내에서 NH_4^+ 이온의 생리적인 기능은 잘 밝혀져 있지 않지만 식물조직에 NH_4^+ 이 과다하게 축적되면 독성을 나타내며 (Givan 1979), NH_4^+ 의 동화는 cytokinin의 생성과 체내 전이를 저해하는 것으로 알려져 있다 (Endres et al. 2002). 그리고 식물이 NO_3^- 에 비하여 NH_4^+ 을 상대적으로 많이 흡수하면 체내 이온균형을 위해 배지로 H^+ 이온을 방출하며 (Mengel and Pilbeam 1992), 배지의 산성화는 다시 식물의 생육을 저해하게 된다.

식물조직배양에서 NH_4^+ 에 비하여 NO_3^- 가 더 적절한 질소원인 것으로 알려져 있으며, 일부 연구결과에 따르면 NO_3^- 만을 공급하여도 식물 형태의 분화와 발달이 충분히 이루어지는 것으로 밝혀져 있다 (Bayley et al. 1972, Wetherell and Dougall 1976, Wu et al. 2005). 반면에 배지에 NO_3^- 를 결핍시키면 식물 형태의 분화와 발달이 크게 저해되는 것으로 밝혀져 있다 (Walch-Liu et al. 2000, Ramage and Williams 2002). 그러나 대부분의 경우 NO_3^- 를 주된 질소원으로 하고 NH_4^+ 과 NO_3^- 의 비율을 적절히 조절하여 공급하는 것이 조직배양에서 여러 가지 식물의 생장에 더욱 유리한 것으로 밝혀져 있으며 (Chevreau et al. 1989, Leblay et al. 1991, Yepes and Aldwinckle 1994, Matt and Jehle 2005, Lee et al. 2006), 본 연구의 결과도 이러한 선형 연구결과와 일치하는 것이다. 따라서 배지 중의 NH_4^+ 과 NO_3^- 의 비율을 10:50으로 조절하는 것이 액체배양을 통한 고추냉이 신초의 증식에 가장 적합한 것으로 판단된다.

적 요

식물 세포나 조직의 배양에서 배지의 salt strength, sucrose

농도, 질소 함량과 질소원의 종류 및 그 비율 등이 세포 또는 조직의 생장에 영향을 미친다. 본 연구에서는 Agar를 함유한 MS 기본배지와 BA 1 mg/L를 첨가한 MS 기본 액체배지에서 계대배양을 통하여 생산한 다신초를 액아와 본엽이 2~3배 되도록 분할한 신초를 이용하여 MS 액체배지의 salt strength와 sucrose 농도 및 NH_4/NO_3 비율이 고추냉이 신초의 생육에 미치는 영향을 조사하여 고추냉이 유묘의 생산에 필요한 최적 배지조건을 구명하였다. 고추냉이 신초의 증식에는 MS 액체배지의 salt strength는 기본조성이 가장 적합한 것으로 나타났으며, 1/4~1/2x 또는 2x MS 배지에서는 고추냉이 유묘의 생장이 크게 억제되었다. 기본조성의 MS 액체배지에 sucrose 3%를 첨가하였을 때 고추냉이 신초의 생장이 가장 우수한 것으로 나타났으나 sucrose 농도 1~6% 범위에서 신초의 수와 길이는 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. 기본조성의 MS 액체배지에서 질소원으로 NH_4^+ 과 NO_3^- 의 비율을 10:50으로 조절하였을 때 고추냉이 신초의 생장이 가장 우수한 것으로 나타났으며, NH_4^+ 의 비율이 증가할수록 생장은 억제되었다.

사 사

본 연구는 산업자원부 지정 지역혁신센터 (RIC)사업인 대구대학교 농산물 저장·가공 및 산업화연구센터의 지원에 의한 것입니다.

인용문헌

- Bayley JM, King J, Gamborg OL (1972) The ability of amino compounds and conditioned medium to alleviate the reduced nitrogen requirement of soybean cells grown in suspension cultures. *Planta* 105: 25-32
 Byeon HS, Heo SJ, Lim SJ, Seo JS (2004) Effect of planting density on growth and yield of *Wasabia japonica* Matsum. *Korean J Medicinal Crop Sci* 12: 300-303
 Chevreau E, Skirvin RM, Abu-Qaoud HA, Korban SS, Sullivan JG (1989) Adventitious shoot regeneration from leaf tissue of three pear (*Pyrus sp.*) cultivars in vitro.

- Plant Cell Rep 7: 699-691
- Choi MS, Choi PS (1999) Plant regeneration and saponin contents in *Codonopsis lanceolata* L. Kor J Medicinal Crop Sci 7: 275-281
- Choi YE, Soh WY (1997) Effect of ammonium ion on morphogenesis from cultured cotyledon explants of *Panax ginseng*. J Plant Biol 40: 21-26
- Endres L, Souza BM, Mercier H (2002) Invitro nitrogen and hormonal pattern in bromeliads. In Vitro Cell Dev Biol Plant 38: 481-486
- Eun JS, Ko JA, Kim YS (1996) Propagation by means of somatic embryogenesis from immature embryo of *Wasabia japonica*. Korean J Breed 28: 21-28
- Eun JS, Ko JA, Kim YS, Kim MJ (1997) Micropagation by apical meristem culture of *Wasabia japonica* Matsum. Korean J Plant Tissue Culture 24: 43-48
- Eun JS, Ko JA, Kim YS (1998) Mass propagation of *Wasabia japonica* by apical meristem culture. J Korean Soc Hort Sci 39: 278-282
- Givan CV (1979) Metabolic detoxification of ammonium in tissues of higher plants. Phytochem 18: 375-382
- Ikeda N, Niimi Y, Han DS (2003) Production of seedlings from ovules excised at the zygote stage in *Lilium* spp. Plant Cell Tiss Org 73: 159-166
- Leblay C, Chevreau E, Raboin LM (1991) Adventitious shoot regeneration from in vitro leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). Plant Cell Tiss Org 25: 99-105
- Lee, EJ, Hahn, EJ, Paek, KY (2006) Effects of plant growth regulators, medium salt strength and nitrogen ratio on cell culture of *Gymmemma sylvestre*. Korean J Plant Biotechnol 33: 105-110
- Matt A, Jehle JA (2005) In vitro plant regeneration from leaves and internodes sections of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.). Plant Cell Rep 24: 468-476
- Mengel K, Pilbeam DJ (1992) Nitrogen metabolism of plants. p. 54-70. Oxford Science Publications, Oxford
- Moreno PRH, van der Heijden R, Verpoorte R (1995) Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus*; a literature survey II. Updating from 1998 to 1993. Plant Cell Tiss Org 42: 1-25
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497
- Nhut DT, Le BV, Fukai S, Tanaka M, Tran Thanh Van K (2001) Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture. Plant Growth Regul 33: 59-65
- Pan XW, Xu HH, Lieu X, Gao X, Lu YT (2004) Improvement of growth and camptothecin yield by altering nitrogen source supply in cell suspension cultures of *Camptotheca acuminata*. Biotechnol Lett 26: 1745-1748
- Park YY, Cho MS, Lee YD, Chung JB, Park S, Jeong BR, Park SG (2007) Effect of BA concentrations and culture methods on in vitro plant multiplication from shoot-tip culture of *Wasabia japonica*. Korean J Plant Biotechnol 34: 1-6
- Ramage CM, Williams RR (2002) Mineral nitrogen and plant morphogenesis. In Vitro Cell Dev-Pl 38: 116-124
- SAS Institute (1989) SAS/STAT user's guide. SAS Inst., Cary, NC
- Touria EJ, Douglas C (1998) Effect of plant age on nitrogen uptake and distribution by greenhouse plants. J Plant Nutr 21: 1005-1006
- Walch-Liu P, Neuann G, Bangerth F, Engels G (2000) Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis. J Exp Bot 51: 227-237
- Wetherell DF, Dougall DK (1976) Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. Physiol Plant 37: 97-103
- Woo JH, Nam HH, Sim YG, Lee HS, Choi KB, Kim KW (2001) Effects of medium composition on mass-production of the multiple shoots from a shoot in *Lilium* oriental hybrid 'Casa Blanca' in vitro. J Kor Soc Hort Sci 42: 462-464
- Wu Y, Yi G, Yang H, Zhou B, Zeng J (2005) Basal medium with modified nitrogen source and other factors influence the rooting of banana. HortScience 40: 428-430
- Yepes LM, Aldwinkle HS (1994) Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. Plant Cell Tiss Org 37: 257-269
- Zhao J, Zhu WH, Hu Q, He XW (2001) Enhanced indole alkaloid production in suspension compact callus clusters of *Catharanthus roseus*: impacts of plant growth regulators and sucrose. Plant Growth Regul 33: 33-41

(접수일자 2007년 7월 4일, 수리일자 2007년 7월 27일)