멸종위기 수종 석곡(*Dendrobium moniliforme*)의 Protocorm-like Body 형성 및 기내증식

배기화¹ · 김남영² · 송재모³ · 송관필^{4,*}

¹(재)홍천메디칼허브연구소 ²국립수목원 ³강원도자연환경연구공원 ⁴(주)제주환경자원연구소

In vitro Propagation and Protocorm-like Body Formation of Endangered Species, *Dendrobium moniliforme*

Kee Hwa Bae¹, Nam Young Kim², Jae Mo Song³ and Gwanpil Song^{4,*}

¹Hongcheon Institute of Medicinal Herb, Hongcheon 250-930, Republic of Korea

²Department of Horticulture and Education, Korea National Arboretum, Pocheon 487-821, Republic of Korea

³Nature Environment Research Office of Gangwon Province, Hongcheon 250-884, Republic of Korea

⁴Jeju Environment Research Institute, Jeju Tourism College, Jeju 690-791, Republic of Korea

Abstract

This experiment was conducted to establish the *in vitro* propagation of *Dendrobium moniliforme* through protocorm like body (PLB) induction from the culture of leaf, stem and root explants. Frequency of PLB formation from root explants was higher than those of leaf and stem explants. PLB's proliferation in MS medium including 1.0 mg/L NAA was better than 1.0 mg/L IBA. Frequency of PLB's proliferation on medium with various concentrations of BA, Kinetin, Tidiazuron (0. 1.0, 3.0 mg/L) and NAA (0, 1.0 mg/L) was tested. The maximum proliferation of PLB's was obtained on MS medium supplemented with 3.0 mg/L BA and 1.0 mg/L NAA after 6 weeks of culture. Addition of 200 mg/L activated charcoal (AC) and 30 g/L sucrose was effective on PLB proliferation for *D. moniliforme*.

Key Words: activated charcoal, *Dendrobium moniliforme*, endangered, protocorm like body, sucrose

서 론

급증하는 인구와 경제발전에 따른 생물자원의 고갈은 날로 심해지고 있고, 생물자원의 탐색과 보호는 전 세계적인 이슈로 부상하고 있다. 최근 연구에 따르면 인간의 직·간접 간섭에 의한 멸종이 자연멸종에 비해 약 4만 배에 달한다고 보고되고 있다(Wolfe 1987; Raup

1986). 인간 간섭에 의한 멸종의 원인에는 여러 가지가 있으나, 그 중 무분별한 개발로 인한 서식지의 파괴가 가장 중요한 원인으로 보여지고 있고 또한, 생물자원의 과다이용, 서식생태계를 위협하는 환경오염물질의 영향, 외래종의 무분별한 도입과 교란 등이 더해져 자생식물의 멸종을 가속화 하고 있다(Schemske et al. 1994), 특히, 국내에서는 약용, 관상용, 식음료소재용으로서의 개발을

Received: May 21, 2013. Revised: January 29, 2014. Accepted: January 29, 2014.

Corresponding author: Gwanpil Song

Jeju Environment Research Institute, Rm 603, BI Center, Jeju Tourism College, Jeju 690-791, Republic of Korea

Tel: 82-64-749-2150, Fax: 82-64-749-2151, E-mail: gwanpill@hanmail.net

위해 야생식물의 무분별한 남채가 커다란 위협요인으로 작용하고 있다. 이에 따라, 2005년도 야생동식물보호법으로 개정됨에 따라 멸종위기야생식물 I급 8종, II급 56종을 지정하였고(MEV 2005), 2012년에 동법이 개정되면서 멸종위기 야생동식물을 과거 221종에서 246종으로 확대 조정하기에 이르렀고, 석곡은 무분별한 채취로 개체수가 급감하여 2012년 신규 지정되었다(MEV 2012).

석곡(*Dendrobium moniliforme*)은 바위나 나무줄기에 붙어서 자라는 착생란(Epiphytic orchid)으로 중국, 일본, 한국 등에 자생한다. 우리나라에서는 제주도와 남부해안 지방에서 주로 생육하는 것으로 있다. 꽃은 5-6월 경 개화하고 꽃의 색깔은 백색 또는 담홍색이다. 예로부터 한의약에서는 뿌리를 제외한 식물체 모든 부위가 건위, 강장제 등의 약제로도 사용되어 왔다(Lee 1980). 현대 의학적 측면에서 석곡에 대한 연구는 항산화 효과(Kim et al. 2005), 신경세포보호효과(Yoon et al. 2007)가 최근에 보고되고 있고, 이외 다양한 효능에 대한 연구가 진행되고 있다. 또한, 석곡은 꽃이 아름답고 관상가치가 높아 수요가 꾸준히 증가하고 있으나, 야생에서의 채취는 법적으로 금지되어 생물자원으로서 활용, 원료식물의 원활한 공급 및 법적보호종의 개체수 보존 등 모든 측면을 만족시킬 대안으로 식물조직배양기술을 이용한 대량생산 기법의 도입이 요구되고 있다. 식물조직배양법은 대량 번식 방법으로 많이 활용되어지는 방법으로 보호종이나 멸종위기종의 대량증식에 이용되고 있다. 그 예로 새우난초(Chung et al. 1998; Bae et al. 2010), 풍란(Chung et al. 2004), 덩굴용담(Moon 2009), 털복주머니란(Bae et al. 2009), 복주머니란(Bae et al. 2010), 광릉요강꽃(Bae and Choi 2013)의 조직 및 세포배양을 통한 기내증식 연구가 보고되고 있다.

석곡의 개체증식에 관한 연구로, Chung et al. (1981)은 석곡 종자의 무균배양을 통하여 유묘의 획득 및 유묘 생육에 관한 연구를 실시하였으며, Lee and Lee (1993)는 자생석곡의 기내삽목 후 발근을 통한 개체의 증식 및 각 개체의 생육에 관한 연구를 보고한 바 있다. 하지만 실생묘는 형질 간 유전적 변이가 심하여 개체 간 묘의 생육차이가 크며, 화경 및 화색이 일정하지 않아, 고품질의 묘생산이 어렵다(Arditti and Ernst 1993). 이러한 이유로 영양계 번식에 관한 연구는 Rotor (1949)에 의해 처음으로 시도된 후 여러 조직으로부터 protocorm like body (PLB)를 유도하고자 하는 연구가 지속적으로 이루어져 왔으나, 모본의 형질에 따라 PLB 재분화율이 다양하여 (Tanaka 1992) 품종에 따른 결과의 재현성에 의문이 제

기되면서 최근에 좀 더 효율적이고 재현성이 높은 PLB 재분화 방법과 PLB 대량증식법이 여러 연구자들에 의해 연구되고 있다(Chen et al. 2000; Park et al. 2002; Park et al. 2003). 그러나 대부분의 실험에서 잎절편이나 정단 조직을 이용하여 PLB 형성과 식물체 재분화를 시도하였고, 뿌리를 이용한 실험은 많이 시도되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 환경부 지정 법적 보호종(멸종위기야생동식물 2급)이지만 생물자원의 활용적인 측면에서 수요가 발생할 것으로 예상되는 석곡의 기내 식물체 생산에 미치는 배양부위(shoot, root 부위)와 식물생장조절물질의 영향에 대해 조사하여 효과적인 재분화 체계를 확립하고 지속가능한 생태계의 보전 및 서식지 외 복원 시 원종공급 등의 기초자료 및 소재로 활용하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 기내배양조건

본 연구에 사용된 실험재료는 제주생물종다양성연구소 유리온실에서 생육하고 있는 석곡(*Dendrobium moniliforme*)의 꼬투리 1립을 채취하여 표면을 깨끗이 씻고 건조기를 이용하여 물기를 제거한 다음 실리카겔이 포함된 보관병에 담아 4°C냉장고에서 3개월간 저온처리를 수행한 다음 발아를 유도하였다. 석곡 종자의 기내 발아 유도 시 배양실의 온도 $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 광주기 16/8시간, 광도 $46 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 조절하여 실시하였다. 실험에 사용한 모든 배지와 기구는 121°C , 1.5기압으로 20분간 고온·고압 멸균하여 페트리디쉬에 30 mL씩 배지를 분주하여 실험에 사용하였다.

석곡의 종자발아 및 배양부위별 유사원괴체(protocorm like body) 유도

3개월간 저온 처리된 석곡의 종자를 POM 배지에 무균적으로 파종하여 2개월간 기내배양을 통해 초장 2 cm, 근장 1 cm, 크기의 유식물체를 확보하여 유사원괴체(PLB) 유도의 재료로 사용하였다. 배양부위별 PLB 유도는 석곡의 잎, 줄기, 뿌리 부위를 분절하여 실험에 사용하였다. 잎 절편은 $0.2 \times 0.2 \text{ cm}$ 로 잘게 절단하였고 구경 부위는 0.2 cm 두께로 횡 · 절단하였다. 뿌리는 근단을 포함하여 0.4 cm로 절단하여 실험에 사용하였다. PLB 유도배지는 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지를 기본으로 sucrose는 20 g/L와 plant agar 8 g/L을 첨가하고 0, 0.5, 1.0 및 3.0 mg/L의 NAA (Naphthalene acetic acid)와 IBA (Indol 3-butylic acid)가 첨가된 배지를 제조

하였다. 위에 제조된 배지위에 잎, 구경, 뿌리를 치상하여 8주후 PLB 유도율과 크기를 조사하였다. 절편은 페트리디쉬당 10개씩, 총 30개씩 각각 치상하였고 배양실의 환경은 온도 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 광주기 16/8시간, 광도 $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 로 조절하였다.

석곡의 PLB 증식에 미치는 식물생장조절물질의 영향

석곡의 잎, 줄기, 뿌리 절편으로부터 유도된 PLB의 증식에 미치는 식물생장조절물질의 영향을 확인하기 위해 각각의 부위에서 유래된 캘러스를 모조직으로 부터 분리하여 MS배지를 기본으로 sucrose는 20 g/L와 plant agar 8 g/L을 첨가하고 옥신류인 0, 1.0 mg/L의 NAA와 0, 1.0, 3.0 mg/L BA, Kinetin, Tidiazuron을 혼합하여 제조된 배지위에 치상하여 8주간 배양한 다음 PLB의 증식율과 크기를 조사하였다.

신초의 발달 및 발근에 미치는 활성탄(Activated charcoal) 및 sucrose의 영향

석곡의 PLB로부터 효과적인 기내 식물체 생장에 미치는 활성탄(AC)와 sucrose의 효과를 확인하기 shoot primordia가 형성된 PLB를 모조직으로부터 분리하여 0, 10, 30, 50 g/L의 sucrose가 첨가된 MS 배지(8 g/L의 plant agar)에 200 mg/L의 AC가 첨가된 배지위에 치상하였다. 실험에 사용한 개체는 15개체씩 3반복하였으며 6주후에 발달된 신초의 수와 길이, 발근된 뿌리의 수와 길이를 각각 조사하였다.

통계분석

모든 데이터는 means $\pm$ standard deviation으로 표시하

였다. 변이들의 집단 간 차이를 알아보기 위해서 one-way ANOVA를 실시하였고, 유의성이 있는 경우 Duncan's multiple range test로 사후검증을 하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 로 설정하여 분석하였다.

결과 및 고찰

배양부위 및 식물생장조절물질(auxins)농도에 따른 캘러스 유도

유사원괴체(protocorm like body, PLB) 유도

기내 조직배양을 통한 재분화 시스템의 확립은 초기 배양재료의 선택이 중요하다. 석곡 역시 효과적인 재분화 시스템을 확립하기 위해 종자로부터 발아한 유식물체의 잎, 줄기, 뿌리부위를 NAA와 IBA가 농도별로 첨가된 MS배지에 치상하여 8주 동안 배양한 다음 PLB 유도율을 조사한 결과(Table 1), 배양 4주가 지난 후부터 절단부위에서 PLB가 형성되기 시작하였다(Fig. 1B). 배양 부위에 따른 PLB유도를 보면 뿌리부위의 유도율이 가장 양호하였고(Fig. 1D), 옥신종류 및 농도에 따른 0, 1.0 3.0 mg/L NAA와 IBA 6종의 배지 가운데 1.0 mg/L NAA가 첨가된 배지의 PLB유도율이 69%로 가장 높게 조사되었다(Table 2). 반면 NAA와 IBA가 첨가되지 않은 MS 배지에서 배양한 배양부위에서는 PLB가 형성되지 않았다(Fig. 1A, C). 난과 식물의 PLB유도는 주로 경정조직 배양을 통해 이루어지기 때문에 식물생장조절물질의 처리 없이도 PLB를 유도할 수 있다(Goh and Wong 1990; Nayak et al. 2002; Kim and Kim 2003; Roy et al. 2007). 하지만 본 실험은 잎, 줄기, 뿌리 절편을 실험재료로 사용했기 때문에 식물생장조절물질 무첨가 배지에서

Table 1. Effect of NAA and IBA on callus formation from leaf, stem and root of *D. moniliforme* after 8 weeks of culture

Treatments (mg/L)		PLB formation (%)			PLB size (mm)		
NAA	IBA	Leaf	Stem	Root	Leaf	Stem	Root
0	0	0	0	0	0	0	0
0.5	-	44	52	55	$2.5 \pm 0.1^{\text{b}*}$	$2.7 \pm 0.2^{\text{a}}$	$2.6 \pm 0.2^{\text{b}}$
1.0	-	48	57	69	$2.4 \pm 0.2^{\text{c}}$	$2.5 \pm 0.6^{\text{b}}$	$2.8 \pm 0.2^{\text{a}}$
3.0	-	41	32	57	$2.6 \pm 0.4^{\text{a}}$	$2.4 \pm 0.6^{\text{c}}$	$2.6 \pm 0.3^{\text{c}}$
0	0	0	0	0	0	0	0
-	0.5	32	42	55	$2.4 \pm 0.2^{\text{c}*}$	$2.5 \pm 0.2^{\text{a,b}}$	$2.6 \pm 0.2^{\text{a}}$
-	1.0	40	46	64	$2.6 \pm 0.3^{\text{a}}$	$2.5 \pm 0.6^{\text{a}}$	$2.4 \pm 0.2^{\text{c}}$
-	3.0	38	41	58	$2.5 \pm 0.5^{\text{b}}$	$2.2 \pm 0.6^{\text{b}}$	$2.5 \pm 0.3^{\text{b}}$

*Data are the means $\pm$ SD, of three experiments. Different alphabetical letters are significantly different according to Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

는 PLB가 형성되지 않은 것으로 보여 진다. 또한 난과 식물인 새우난초(*Calanthe discolor*)의 조직배양을 통한 식물체 생산에서도 새우난초의 배양부위(잎, 구경, 뿌리)에 따라 부정아 유도율과 캘러스 유도율이 다르고 식물

Fig. 1. Induction of PLB of root explants from *D. moniliforme*. (A) Control, Scale bar 4 mm, (B) root on 1.0 mg/L NAA in MS medium after 8 weeks of culture, Scale bar 4 mm, (C) Propagation of PLB on MS medium without PGR's, scale bar 25 mm, (D) Propagation of PLB on MS medium supplemented with 1.0 mg/L NAA and 3.0 mg/L BA after 8 weeks of culture, scale bar 25 mm.

체 재생율에 많은 영향을 주는 것으로 보고되었다(Bae et al. 2010). 이와 같이 배양부위 및 배지에 첨가하는 생장조절물질의 종류와 농도에 따라 캘러스 유도 및 신초 분화 양상이 다르게 나타남을 알 수 있다(Ryu et al. 1992). 신초의 분화 및 생장에는 세포의 생장과 분열을 촉진하는 생장조절물질(옥신과 사이토키닌)의 첨가가 필수적이며, 배양부위의 분열부위 존재 유무 등이 초기 배양의 성패를 좌우하는 중요한 인자로 작용하는 것으로 보여진다.

신초의 발달 및 발근에 미치는 AC 및 sucrose의 영향

AC와 sucrose의 혼합처리가 석곡 유묘의 기내생장에서 유묘의 shoot 부분 증식과 기내발근에 미치는 영향을 조사한 결과, 증식된 신초의 수는 200 mg/L의 AC와 10 g/L이 sucrose를 혼합처리 한 처리구에서 3.4개로 높았지만 모든 실험구에서 유의적인 결과를 나타내지는 않았다(Table 3, Fig. 2C). 엽장은 200 mg/L의 AC와 30 g/L이 sucrose를 혼합처리한 처리구에서 6.8 cm로 가장 높았다(Table 3, Fig. 2A). 근수는 200 mg/L의 AC와 30 g/L이 sucrose를 혼합처리 한 처리구에서 11.5개로, 근장은 18.7 cm로 가장 효과가 좋았다(Table 3, Fig. 2B). 기내 배양시 sucrose 농도의 감소는 고농도의 sucrose에 비해 CO₂를 증가시켜 광합성능을 향상시키는 역할을 수행하며 독립영양체 식물로서의 발달을 도모한다. 고농도 sucrose는 잎이 발생되지 않고 구근의 비대가 촉진되거나

Table 2. Effect of plant growth regulations on PLB proliferation from leaf, stem and root of *D. moniliforme* after 8 weeks

Treatments (mg/L)				PLB proliferation (%)			PLB size (mm)		
NAA	BA	KT	TDZ	Leaf	Stem	Root	Leaf	Stem	Root
0	0	0	0	11	18	17	3.6±0.6 ⁱ	4.2±0.5 ⁱ	5.6±1.2 ^f
0	1.0	-	-	66	68	72	5.3±0.8 ^{h*}	5.6±1.2 ^f	6.9±1.2 ^b
	3.0	-	-	61	65	68	5.6±0.6 ^f	5.2±1.5 ^h	6.6±1.3 ^c
1.0	1.0	-	-	67	68	86	6.6±0.4 ^c	6.2±1.1 ^d	7.6±1.2 ^a
	3.0	-	-	72	78	89	5.6±0.6 ^f	6.4±1.2 ^d	6.9±1.3 ^b
0	-	1.0	-	58	62	64	5.2±0.4 ^h	5.8±1.1 ^e	6.2±0.8 ^d
	-	3.0	-	54	51	59	5.4±0.1 ^g	5.7±1.3 ^f	5.9±1.2 ^e
1.0	-	1.0	-	55	58	62	5.7±0.5 ^f	5.8±1.4 ^e	6.1±1.2 ^d
	-	3.0	-	62	65	68	5.9±0.9 ^e	5.7±0.6 ^f	6.3±1.1 ^d
0	-	-	1.0	44	52	59	5.4±0.5 ^g	5.6±0.7 ^f	5.9±0.5 ^e
	-	-	3.0	52	58	61	5.2±1.1 ^h	5.3±1.6 ^g	5.8±0.8 ^e
1.0	-	-	1.0	52	58	68	5.4±0.5 ^g	5.8±1.2 ^e	6.2±0.8 ^d
	-	-	3.0	48	56	61	5.1±0.4 ^h	5.4±0.8 ^g	5.8±1.6 ^e

*Data are the means±SD, of three experiments. Different alphabetical letters are significantly different according to Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

Table 3. Effect of sucrose on development of shoot formation and rooting from shoot of *D. moniliforme* after 6 weeks

Treatments		Frequency of shoot formation		Frequency of root formation	
AC (mg/L)	Sucrose (g/L)	No. of shoot	Length of shoot/plantlet (cm)	No. of root	Length of root/plantlet (cm)
0	0	$2.1 \pm 0.4^{f*}$	3.8 ± 1.2^h	2.8 ± 0.6^h	9.5 ± 0.9^{fg}
	10	3.2 ± 0.4^c	4.6 ± 1.3^f	3.1 ± 1.6^g	11.6 ± 0.5^d
	30	$3.3 \pm 0.8^{a,b}$	4.8 ± 0.9^e	$3.4 \pm 2.4^{c,f}$	8.9 ± 2.7^f
	50	$3.1 \pm 0.5^{d,e}$	4.2 ± 0.7^g	3.6 ± 1.9^e	8.3 ± 0.8^h
200	0	$3.1 \pm 0.3^{d,e}$	$5.8 \pm 1.1^{c,d}$	4.8 ± 0.4^d	$11.5 \pm 0.8^{d,e}$
	10	3.4 ± 0.6^a	6.6 ± 1.2^b	8.1 ± 1.5^b	14.6 ± 0.1^b
	30	$3.3 \pm 0.7^{a,b}$	6.8 ± 1.9^a	11.5 ± 1.4^a	18.7 ± 2.4^a
	50	3.1 ± 0.5^d	5.9 ± 0.8^c	7.1 ± 1.4^c	13.3 ± 0.7^c

*Data are the means $\pm$ SD, of three experiments. Different alphabetical letters are significantly different according to Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

Fig. 2. *In vitro* propagation of *D. moniliforme* using PLB. (A) Elongation of shoot and root the MS medium supplemented without sucrose and AC, scale bar 15 mm, (B) Elongation of shoot and root the MS medium supplemented with 30 g/L sucrose and 200 mg/L AC after 6 weeks of culture, scale bar 15 mm, (C) Propagation of PLB derived plantlet of *D. moniliforme* after 6 weeks of culture, scale bar 33 mm.

캘러스가 다량 발생하는 반면 저농도의 sucrose는 배지 내 영양분 흡수를 촉진시키고 생장 억제물질의 생성을 감소시킴으로써 구근의 형성 및 엽상 인편의 발달을 촉진하는 역할을 수행한다(Malabadi et al. 2004). Kim and Song (1997)은 sucrose 농도와 0.1 mg/L NAA 첨가 유무에 따른 연구를 진행한 결과, NAA 무첨가 배지와 고농

도 sucrose 첨가에서 뿌리 11.4개를 유도하였으며, 0.1 mg/L NAA를 첨가하고 3% sucrose를 첨가한 배지에서 14.4개의 뿌리를 유도하였다. 본 실험 결과와 Kim and Song (1997)의 연구를 비교하였을 때 본 연구에서 sucrose를 처리하지 않은 대조구 보다 30 g/L의 sucrose를 처리하였을 때 약 1.5배 이상의 뿌리를 유도를 나타냈고, 근장 또한 2배 이상 신장시킬 수 있었다.

따라서 본 결과에서 석곡의 종자발아체를 이용하여 각각의 부위(잎, 구경, 뿌리) 및 옥신종류 및 농도에 따른 최적의 PLB 유도조건을 조사하였고, 유도된 PLB를 이용하여 분화에 최적인 사이토키닌 농도를 확인하였다. 또한, AC와 sucrose의 처리에 따른 최적 지상부 분화를 및 지하부 발근율의 확인으로 성공적인 기내 식물체 재분화 시스템을 확립하였다. 이러한 결과는 향후 멸종위기에 처한 야생식물의 증식을 통한 개체 확보에 중요한 기초자료로 활용되어 질 것이고 더 나아가 캘러스를 활용한 난과 식물의 형질전환을 통한 품종개량이나 유용한 유전자를 통한 형질전환 식물체의 개발에도 활용되어 질 것으로 생각된다.

결론

멸종위기 자생난초인 석곡 PLB의 유도 및 증식을 통한 기내 유식물체 재분화에 미치는 몇 가지 요인에 관하여 연구하였다. 석곡의 배양부위(잎, 근경, 뿌리)에 따라 고빈도의 PLB를 유도하기 위해 NAA와 IBA의 농도조건을 달리하여 배지를 제조한 후 각각의 절편을 배양한 결과, 1.0 mg/L의 NAA가 첨가된 배지에 석곡의 뿌리부위를 배양한 경우, 69%의 높은 PLB유도율을 나타냈고,

PLB의 크기도 2.8 mm로 가장 크게 조사되었다. 식물생장조절물질의 조합처리에 따른 PLB의 증식 및 분화에 미치는 영향을 조사한 결과, 1.0 mg/L의 NAA와 3.0 mg/L의 BA가 조합처리 된 처리구에서 뿌리유래 PLB를 배양한 경우, 89%의 높은 PLB증식율을 나타냈다. AC와 sucrose의 조합처리에 따른 지상부와 지하부의 신장과 발달에 미치는 영향을 조사한 결과, 지상부의 신장은 200 mg/L AC와 30 g/L sucrose를 조합처리 할 경우 6.8 cm로 엽장의 크기가 가장 컸으며, 같은 처리구에서 근장의 길이 역시, 18.7 cm로 가장 길었다. 결과적으로 본 연구는 석곡의 기내 재분화체 생산 시 배양부위, 식물생장조절물질, 활성탄, sucrose의 영향에 관해 구체적인 결과를 제시하였고, 이러한 결과는 특산식물 또는 멸종위기 식물의 보존 및 생산에 중요한 기초자료로 제공될 것으로 사료된다.

References

- Arditti J, Ernst R. 1993. Micropropagation of orchids. John Wiley and Sons, New York, USA, pp 373-375.
- Bae KH, Choi YE. 2013. Factors affecting fruit bearing in natural habitat and *in vitro* culture of zygotic embryos of *Cypripedium japonicum*. Prog Ornament Plant 11: 146-152.
- Bae KH, Kim CH, Sun BY, Choi YE. 2010. Structural changes of seed coats and stimulation of *in vitro* germination of fully mature seeds of *Cypripedium macranthos* Swartz (orchidaceae) by NaOCl pretreatment. Prog Ornament Plant 10: 107-113.
- Bae KH, Kwon HK, Choi YE. 2009. *In vitro* germination and plantlet conversion from the culture of fully mature seeds of *Cypripedium guttatum* Swartz. Prog Ornament Plant 9: 160-165.
- Bae KH, Yoon ES, Yong YP, Choi YE. 2010. Soil acclimatization of *Calanthe discolor* through multiple shoot formation from tissue culture. Korean J Plant Res 23: 7-13.
- Chen YC, Chang C, Chang W. 2000. A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*. In Vitro Cell Dev Biol Plant 36: 420-423.
- Chung JD, Chun CK, Suh YK, Byun SY. 1981. Studies on aseptic culture of seeds in *Dendrobium monile*. J Korean Soc Hort Sci 22: 139-145.
- Chung MY, Chung JD, Jee SO. 1998. Effect of culture media on asymbiotic seed germination and those seedling growth of *Calanthe discolor* and *Habenaria radiata*. Korean J Plant Biotechnol 25: 189-194.
- Chung JD, Lee JH, Jee SO, Kim CK. 2004. Effect of medium composition on multiple shooting and subsequent growth of mericlone from rhizome of shoot tip cultures of temperate *Cymbidium* species. J Kor Soc Hort Sci 39: 343-349.
- Goh CJ, Wong PF. 1980. Micropropagation of the monopodial orchid hybrid *Aranda* 'Deborah' using inflorescence explants. Sci Hort 44: 315-321.
- Hussey G. 1976. *In vitro* release of axillary shoots from apical dominance in monocotyledonous plantlets. Ann Bot 40: 1323-1325.
- Song WS, Kim HS. 1997. Effect of plant growth regulators and medium salt strength on *in vitro* propagation of *Belamcanda chinensis* DC. Korean J Plant Res 10: 114-121.
- Kim MS, Kim JY. 2003. Micropropagation of *Dendrobium* hybrids through shoot tip culture. Acta Hort (ISHS) 624: 527-533.
- Kim YG, Yang GH, Cho SI. 2005. Anti-oxidative Effects of *Dendrobii Herba* on toxic agent induced kidney cell injury. Kor J Herbology 20: 53-60.
- Koh JC. 2005. Callus culture and plant Regeneration from shoot apex of *Iris Sanguinea* Donn ex. Horn. J Plant Biotechnol 31: 19-23.
- Lee EJ, Lee JS. 1993. Studies on *in vitro* cutting of *Dendrobium moniliform* native to Korea. J Kor Soc Hort Sci 11: 314-315.
- Lee K. 1980. The wild orchids of Korea. Jungsung publisher, Seoul, Korea, pp 193.
- Madubanya LA, Makunga NP, Fennell CW. 2006. *Dierama luteoalbidum*: Liquid culture provides an efficient system for the ex situ conservation of an endangered and horticulturally valuable plant. S Afr J Bot 72: 584-588.
- Malabadi RB, Mulgund GS, Nataraja K. 2004. Efficient regeneration of *Vanda coerulea*, an endangered orchid using thidiazuron. Plant Cell Tiss Org Cult 76: 289-293.
- Meyer HJ, van Staden J. 1998. *In vitro* multiplication of *Ixia fflexuosa*. Hort Sci 23: 1070-1071.
- Ministry of Environment (MEV). 2005. Enforcement decrees drafted for the Wildlife Protection Act. Gwacheon, Korea, pp 83.
- Ministry of Environment (MEV). 2012. Enforcement decrees drafted for the Wildlife Protection Act. Gwacheon, Korea, pp 66.
- Moon HK, Kim SJ, Park SY, Kim YW, Yi JS. 2009. Effect of plant growth regulators on micropropagation of a rare and endangered species, Tsuru-rindo (*Tripterispermum japonicum*). J Plant Biotechnol 36: 13-17.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497.
- Nayak NR, Sahoo S, Patnaik S, Rath SP. 2002. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). Sci Hort 94: 107-116.
- Park SY, Murthy HN, Paek KY. 2003. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. Plant Sci 164: 919-923.
- Park SY, Yeung EC, Chakrabarty D, Paek KY. 2002. An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf sub-epidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. Plant Cell Rep 21: 46-51.

- Raup DM. 1986. Biological extinction in earth history. *Science* 231: 1528-1533.
- Rotor Jr G. 1950. A method of vegetative propagation of *Phalaenopsis* species and hybrids. *Amer Orchid Soc Bull* 18: 738-739.
- Roy J, Naha S, Majumdar M, Banerjee N. 2007. Direct and callus-mediated protocorm-like body induction from shoot-tips of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. (Orchidaceae). *Plant Cell Tiss Org Cult* 90: 31-39.
- Ryu JH, Doo HS, Kwon TK. 1992. Induction of haploid plants by anther culture in sesame (*Sesamum indicum* L.). *Kor J Plant Biotech* 19: 171-177.
- Schemske DW, Husband BC, Ruckelshaus MH, Goodwillie C, Parker IM, Bishop JG. 1994. Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants. *Ecology* 75: 584-606.
- Shibli RA, Ajlouni MM. 2000. Somatic embryogenesis in the endemic Black *Iris*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 61: 15-21.
- Tanaka M. 1992. Micropropagation of *Phalaenopsis* spp. *Biotechnology in agriculture and forestry*. In: High-tech and micropropagation IV (Bajaj YPS ed). Springer, Berlin.
- Wolfe SC. 1987. World watch paper 78, on the brink of extinction: conserving the diversity of life. Worldwatch Institute, Washington DC, pp 53.
- Yoon MY, Kim JY, Hwang JH, Cha MR, Lee MR, Jo KJ, Park HR. 2007. Protective effect of Methanolic extracts from *Dendrobium nobile* Lindl. on H₂O₂-induced neurotoxicity in PC12 cells. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 50: 63-67.