

새우난초(*Calanthe discolor*)의 조직배양으로부터 다신초형성을 통한 토양순화

배기화^{1,3}, 윤의수², 윤필용¹, 최용의³

¹제주하이테크산업진흥원 제주생물종다양성연구소, ²공주대학교 생명과학과, ³강원대학교 산림자원학부

Soil Acclimatization of *Calanthe discolor* through Multiple Shoot Formation from Tissue Culture

Kee Hwa Bae^{1,2}, Eui Soo Yoon³, Pil Yong Yun¹ and Yong Eui Choi²

¹Jeju Biodiversity Research Institute, Jeju Hi-Tech Industry Development Institute, Jeju, 690-121, Republic of Korea

²Department of Biological Science, College of Natural Sciences, Kongju National University, Gongju, 314-701, Republic of Korea

³Division of Forest Resources, College of Forest and Environmental Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea

Abstract - This experiment was conducted to establish the micropropagation of *Calanthe discolor* through multiple shoot formation from the culture of leaf, corm and root explants. Frequency of adventitious shoot formation from leaf explants was higher than those of corms and root explants. Frequency of adventitious shoot formation on medium with various concentrations of BA (0, 1.0, 3.0, and 5.0 mg/L) and NAA (0, 0.1, 0.5, and 1.0 mg/L) was tested. The maximum induction of adventitious shoot was obtained on half strength Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 3.0 mg/L BA and 1.0 mg/L NAA after 6 weeks of culture. Multiple shoots were transferred onto half strength MS medium with various concentrations of GA₃ (0, 0.1, 0.5, 1.0, 3.0, and 5.0 mg/L). The number and length of multiple shoots on medium were highest on medium with 3.0 mg/L GA₃. All the adventitious shoot grew well and rooted on half strength MS medium with 3.0 mg/L NAA. The plantlets were acclimatized up to 100% on sand with TKS-II or perlite with TKS-II.

Key words - *Calanthe discolor*, adventitious shoot initiation, multiple shoot, soil acclimatization

서 언

새우난초속은 한국, 일본, 대만, 호주 등의 열대, 아열대 및 온대지역에 약 180여종이 자생하고 있다(Kim and Kim, 1989). 우리나라의 자생지는 제주도와 남부도서 일부지역으로 알려져 있었지만 지구온난화의 영향으로 중부 이북지역도 자생지로 보고되고 있다(Hyun *et al.*, 1999). 새우난초는 난과 새우난초속의 다년생 초본으로 잎이 지고 난 위 구경의 모양이 새우의 등처럼 골이 지고 굽었다하여 새우난초라 명명되어졌고 속명에서 알 수 있듯이 아름다운 꽃 [calos(아름답다)+anthes(꽃)]을 피우고, 꽃의 색 또한 개체마다 다른[dis(다른)+color(색)] 특징을 보여 정원 또는

화분에 식재하여 감상하거나 절화 등의 원예용으로 이용 가치가 매우 높은 식물이다(이창복, 1993). 지금까지 보고된 우리나라의 새우난초의 종류는 새우난초(*Calanthe discolor* Lindl.), 금새우난초(*C. discolor* for. *sieboldii* (Decne.) Ohwi), 여름새우난초(*C. reflexa* Maxim), 왕새우난초(*C. bicolor*), 및 섬새우난초(*C. coreana* Nakai) 등이 제주도, 울릉도, 안면도, 추자도 등에 자생하고 있다(Hyun *et al.*, 1999). 그러나 최근 새우난초는 다른 자생식물과 같이 무분별한 채취로 인하여 자생지의 훼손이 심각하게 진행되고 있다(Lee and Kwack, 1983). 이에 산림청에서 보존가치를 인정하여 금새우난초(60위), 새우난초(70위), 여름새우난초(149위)를 산림청 지정 멸종위기종으로 등재하여 보존 및 증식방법을 연구하고 있다(산림청, 2006).

*교신저자(E-mail) : yechoi@kangwon.ac.kr

새우난초는 자연상태에서 주로 줄기 기저부에서 유도되는 신초에 의해 증식하고 있으나 증식효율이 낮을 뿐더러 인간과 동물에 의한 자생지 훼손으로 개체수가 점점 감소하고 있다. 이들 새우난초의 자생지 복원 및 원예상품화 노력은 수년전부터 이루어져 왔는데 새우난초와 금새우난초의 중간교배에 의한 1대잡종 종자의 기내무균 발아에 관한 연구(Kim *et al.*, 2008), 새우난초와 해오라비난초의 종자 발아와 유묘생장에 미치는 배지의 영향(Chung *et al.*, 1998) 등의 종자발아에 관한 연구들과 액아배양을 통한 다신초유도(Lim *et al.*, 2008) 및 구경배양을 통한 대량증식 시스템확립(Seo, 2002) 등이 있다. 전, 후자 모두 배양에 따른 증식 및 자생지의 보전이라는 공통점은 있지만 새우난초의 우량 형질전환시스템을 통한 원예종으로의 개량에는 모본과 유전적으로 특성이 동일한 우량개체를 대량으로 증식시킬 수 있는 성장점 배양 등의 개발이 필수적으로 요구되고 있고 형질전환을 통한 새우난초의 우수한 품종의 개발에는 배배양을 통한 개체의 확보보다는 조직배양을 통한 식물체 재분화 시스템의 확보가 무엇보다 중요하다고 사료된다.

그러므로 이 실험에서는 새우난초의 잎, 줄기, 뿌리 절편으로부터 다신초 형성을 통한 재분화 조건을 확립하고 유묘생장에 미치는 성장조절제의 영향에 대하여 알아보고자 하였다. 이러한 결과는 앞으로 새우난초의 효과적인 형질전환 시스템의 확립에 기초자료로 활용될 것으로 기대된다.

재료 및 방법

식물재료 및 배양조건

실험에 사용된 새우난초(*Calanthe discolor* Lindley)는 강원대학교 온실에서 생육하고 있는 개체를 사용했다. 이른 봄에 올라오는 어린 새우난초를 잎, 구경, 뿌리로 나누어 흐르는 수돗물에 흠을 씻은 후 70% 에탄올에 1분, 1% 차아염소산나트륨용액에 잎, 구경은 15분, 뿌리는 30분간 침지한 후 멸균수로 5회 세척하였다. 멸균된 재료는 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 1/3MS(Murashige and Skoog, 1962) 배지에 치상하여 기내 배양을 실시 하였다. 실험에 사용한 모든 배지는 121°C, 1.5기압으로 20분간 고온고압 멸균하여 petri dish에 각각 30 mL씩 분주하여 실험에 사용하였다.

배양부위에 따른 다신초 유도

잎, 구경, 뿌리 부위를 기내 무균 배양한 후 3주간 계대 배양을 통해 세균 및 곰팡이를 제거하였다. 잎 절편은 0.2 × 0.2 cm로 잘게 절단하였고 구경 부위는 0.2 cm두께로 횡 절단하였다. 뿌리는 근단을 포함하여 1 cm로 절단하여 실험에 사용하였다. 부정아 유도배지는 1/2MS배지를 기본으로 sucrose는 20 g/L와 0.2 g/L activated charcoal을 첨가하고 0, 1.0, 3.0, 및 5.0 mg/L의 BA와 0, 0.1, 0.5, 및 1.0 mg/L의 NAA를 혼용하여 배지를 제조하였다. 위에 제조된 배지위에 잎, 구경, 뿌리를 치상하여 6주후 부정아 유도를 조사하였다. 절편은 Petri dish당 10개씩, 총 30개씩 각각 치상하였고 22 ± 1°C, 1600 Lux, 16/8 h의 광주기하에 배양하였다.

GA₃의 농도에 따른 다신초 증식

잎 절편으로부터 유도된 부정아를 sucrose가 30 g/L 포함된 1/2MS배지에 0, 0.1, 0.5, 1.0, 3.0, and 5.0 mg/L의 GA₃가 단용처리 된 배지위에 10개씩 각각 30개의 절편을 치상하였다. 배양 6주후에 부정아의 유도개수와 shoot의 길이를 조사하였다. 배양은 22 ± 1°C, 1600 Lux, 16/8 h의 광주기하에서 배양을 하였다.

유묘의 발근유도

각각의 초장이 5~8 cm로 증식된 다신초를 선택하여 모조직으로부터 분리하였다. 분리된 유식물체는 1/2MS 배지에 30 g/L의 sucrose를 첨가하고 0, 0.1, 1.0, 및 3.0 mg/L의 IBA 또는 NAA를 단용처리한 배지위에 치상하였다. 실험에 사용한 개체는 5개체씩 3반복하였으며 6주후에 발달된 뿌리의 수와 길이를 각각 조사하였다. 배양은 22 ± 1°C, 1600 Lux, 16/8 h의 광주기하에서 배양을 하였다.

무균 배양묘의 순화

기내에서 확립한 배양체계에 따라 기외 생존율에 적합한 토양조성을 알아보기 위하여 평균초장이 6~10 cm 내외, 근장 2.5 cm로 성장한 유식물체를 사용하였다. 토양조성은 모래단용상(Sand), 모래와 TKS-II(Floragard, Germany)를 1:1로 배합한 모래와 TKS-II혼용상(ST), 펠라이트(선진교역, 한국) 단용상(Pearlite), 펠라이트와 TKS-II를 1:1로 배합한 펠라이트와 TKS-II혼용상(PT), TKS-II단용상(TKS)을 조성하고 관수에 의한 토양유실 및 수분증발을 막기 위

해 난석을 덮어 주었다. 위 조성상에 4개체씩 3반복 처리하여 4주후에 신장률, 줄기직경, 뿌리길이, 생존률을 조사하였다. 유리온실 내 생육환경은 차광 60%, 습도 50~70%로 조절하였다.

통계적인 분석

모든 데이터는 means ± standard deviation으로 표시하였다. 변인들의 집단간 차이를 알아보기 위해서 ANOVA를 실시하였고, 유의성이 있는 경우 Duncan's multiple range test로 사후검증을 하였다. 통계적 유의성은 P < 0.05로 설정하여 분석하였다.

결과 및 고찰

식물생장조절제와 배양부위에 따른 다신초 유도

기내 조직배양을 통한 재분화 시스템의 확립은 초기 배양재료의 선택이 중요하다. 새우난초 역시 효과적인 재분화 시스템을 확립하기 위해 잎, 구경, 뿌리 부위 및 BA와 NAA에 따른 부정아 유도율을 조사하였다. 새우난초의 다신초 유도시 배양부위 및 식물생장조절제의 영향을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 구경 및 뿌리 부위에서는 부정아 유도율이 저조했으며 잎 절편을 통한 부정아 유도율은 뿌리에 비해서는 10배 이상, 구경 절편에 비해서는 4~6배 높았다. 뿌리의 경우 부정아 유도는 거의 일어나지 않았는데 뿌리 근단 부분이 노랗게 변하면서 부풀어 오르는 경향을 보였다

(Fig. 1A). 구경 부위에서는 초록색의 부정아와 흰색의 부정아가 동시에 유도됨을 관찰 할 수 있었다(Fig. 1B). 잎 절편에서는 초록색의 부정아가 절편 당 약 4~5개가 유도되었으며 유도됨과 동시에 신초의 분화가 빠르게 진행됨을 관찰 할 수 있었다(Fig. 1C). 잎 절편을 치상한 BA와 NAA의 혼합배지 중에 특히 3.0 mg/L의 BA와 1.0 mg/L의 NAA가 혼합된 배지에서 부정아 유도율이 45.6%로 현저히 높았는데, 이는 난과 식물은 아니지만 홍경천의 잎 절편을 통한 식물체 재분화 시스템의 확립에 관한 연구와 비슷한 결과를 나타냈다(Bae *et al.*, 2005). 이와 같이 배지에 첨가하는 성장조절물질의 종류와 농도에 따라 신초분화 양상이 다르게 나타남을 알 수 있다(Ryu *et al.*, 1992). 신초의 분화 및 성장에는 세포의 성장과 분열을 촉진하는 옥신의 첨가가 필수적이며 사이토키닌을 혼합했을 때 신초분화를 촉진한다는 보고가 있어 본 실험의 결과도 비슷하였다(Devlin, 1975; Skoog *et al.*, 1965).

다신초 증식

다신초의 증식을 위해 잎 절편으로부터 얻어진 부정아를 GA₃가 포함된 1/2MS 배지에 치상하여 6주간 배양한 후 절편 당 유도 개수와 shoot의 길이를 조사하였다. 1.0 mg/L의 GA₃가 포함된 배지부터 다신초의 증식을 관찰 할 수 있었으며, 1.0 mg/L 이만의 GA₃가 포함이 되었을 때는 유도된 부정아의 증식 및 신장을 이루어지지 않았다. 3.0 mg/L의 GA₃가 첨가된 배지는 다신초 증식이 평균 6.3개 shoot

Table 1. Effect of plant growth regulators on adventitious shoot initiation from leaf, corm, and root of *C. discolor* on 1/2MS solid medium supplemented with 0.2 mg/L activated charcoal and 20 g/L sucrose after 6 weeks of culture

PGR (mg/L)		Frequency of adventitious shoot induction (%)		
BA	NAA	Leaf	Corm	Root
0	0	0.0	0.0	0.0
1.0	0.1	22.2	6.7	0.0
	0.5	20.6	4.4	0.0
	1.0	16.7	5.1	0.0
3.0	0.1	15.6	7.4	0.0
	0.5	24.4	8.9	4.3
	1.0	45.6	12.2	5.1
5.0	0.1	25.6	9.7	5.7
	0.5	21.1	6.0	0.0
	1.0	31.1	5.1	0.0

Table 2. Effect of GA₃ concentrations on adventitious shoot growth of *C. discolor* on 1/2MS medium supplemented with 30 g/L sucrose after 6 weeks of culture

GA ₃ concentration (mg/L)	No. of adventitious shoots/segment	Length of adventitious shoots (mm)
0	0.0 ± 0.0*d	0.0 ± 0.0d
0.1	0.0 ± 0.0d	0.0 ± 0.0d
0.5	0.0 ± 0.0d	0.0 ± 0.0d
1.0	3.8 ± 1.3bc	15.7 ± 3.3bc
3.0	6.3 ± 2.0a	36.0 ± 6.7a
5.0	4.3 ± 2.8b	22.3 ± 4.7b

*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.

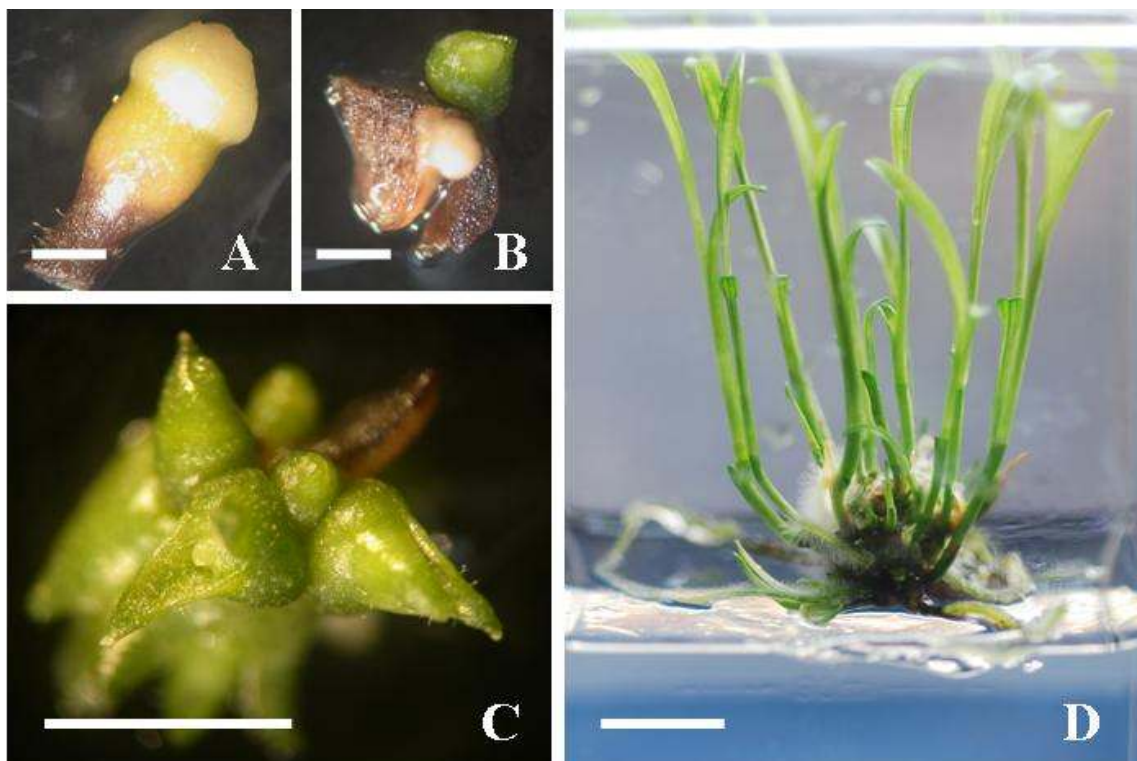


Fig. 1. Induction and proliferation of adventitious shoot from *C. discolor*. A: Root segment, B: Corm segment, C: Leaf segment on 1/2MS medium supplemented with BA and NAA after 6 weeks of culture, D: Growth of multiple shoots derived from leaf segments on 1/2MS medium supplemented with GA₃ after 6 weeks of culture, Scale bar, A, B, C=5 mm, D=3 cm.

의 길이신장은 평균 36 mm로 가장 양호 하였으며 5.0 mg/L의 GA₃가 첨가된 배지에는 이보다 적은 4.3개와 22.3 mm의 수치를 나타냈다(Table 2). GA₃가 1.0 mg/L이상 배지에 첨가되면 다신초의 신장이 이루어지는데 (Fig. 1D), 특히 잎의 벌어지는 분화속도가 빠르며 줄기의 신장이 현저히 증가됨을 관찰 할 수 있었다(데이터미제시). 신초로부터 다신초를 형성, 유지, 증식하는 과정에서 신초나 유식물체들이 필요이상으로 사이토키닌에 장시간 노출될 경우 잎이

뒤틀리거나 오그라드는 현상을 비롯한 덩어리 현상을 보인다고 알려져 있다(Chung *et al.*, 2004; Baek *et al.*, 1996). 하지만 본 실험에서는 GA₃를 처리한 배지에서 성장한 유식물체들은 모두 신초증식이 양호했다. 특히 잎의 뒤틀림, 오그라듬, 덩어리짐 현상을 관찰 할 수 없었다. 이는 왕자귀나무(*Albizzia coreana*) 기내배양에서 배지 내 GA₃의 첨가가 정상적인 개체의 증식에 효율적인 것이라는 연구결과와 동일하다(Park *et al.*, 2003).

유묘의 발근유도 및 무균배양묘의 토양순화

신초의 증식과정을 통해 얻어진 유식물체의 효율적인 생장과 뿌리발달을 이루기 위해 발근에 적합한 배지를 조사하였다. 1/2MS 배지에 IBA 또는 NAA를 단용처리하여 4주간 배양한 결과는 Table 3과 같다. 뿌리를 포함하지 않는 새우난초의 유식물체는 생장하며 발근이 이루어졌는데 식물체당 발근 형성개수는 배양 6주까지 1개만이 유도되었다. 유도된 뿌리의 길이는 3.0 mg/L의 NAA가 첨가된 배지에서 4.7 cm로 가장 높았고 옥신을 처리하지 않은 대조구에서는 발근이 이루어지지 않았다(Table 3). 본 실험에 사용한 새우난초의 경우 초기(배양 4주) 발근율이 다른 난과 식물에 비해 현저히 낮았다(Fig. 2A). Chung 등(1998)은 심비디움의 생장점 배양을 통한 다신초 유도시 옥신을 처리할 경우 발근율이 50% 증가한다는 보고를 하였다. 그러나 Malabadi 등(2004)은 *Vanda coerulea*에서, Emst (1994)는 *Doritaenopsis*와 *Phalaenopsis*에서 식물생장조절제의 농도가 높은 배지에서 생장, 분화된 신초일수록 발근율이 감소한다고 하였다. 본 실험결과 역시 GA₃의 농도

가 비교적 높았고 신초의 하단부위를 절단한 다음 치상하였기 때문에 발근이 지연 또는 감소한 것으로 사료되고 배지에 충분히 적응한 12주 후부터는 뿌리의 생육이 왕성한 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 2B). 발근이 이루어지고 생장 및 분화하여 모체와 비슷한 형태로 생장한 유묘의 효율적인 기외순화를 위해 다양한 종류의 상토를 처리하여 생존률과 유묘신장, 줄기직경, 뿌리길이를 조사한 결과는 Table 4와 같다. 기내에서 발근이 이루어진 상태에서 기외에 순화시킨 경우 배수가 비교적 잘되는 모래상과 펄라이트상에서는 생존률이 60%정도로 감소하였다(Fig. 2C). 하지만 이들 처리구에 TKS를 1:1로 혼합하여 제조된 상토의 경우 100% 생존률을 보였다(Table 4).

따라서 본 결과에서 새우난초의 유식물체를 이용하여 각각의 부위(잎, 구경, 뿌리) 및 BA와 NAA의 농도에 따른 최적의 부정아 유도조건을 조사하였고 유도된 부정아를 이용하여 GA₃의 농도에 따른 다신초유도와 분화양상을 확인하였다. IBA와 NAA의 농도에 따른 발근율을 조사하여 성공적인 기내배양을 통한 재분화 시스템을 확립하였다. 또한 기외

Table 3. Effect of IBA and NAA concentrations on adventitious root in duction and growth of *C. discolor* after 6 weeks of culture

Auxins (mg/L)		No. of rooting/segment	Length of rooting (mm)
IBA	NAA		
0.0	0.0	0.0 ± 0.0*bc	0.0 ± 0.0de
0.1	0.0	1.0 ± 0.0a	2.4 ± 0.5d
1.0	0.0	1.0 ± 0.0a	3.4 ± 0.2c
3.0	0.0	1.0 ± 0.0a	3.2 ± 0.9c
0.0	0.1	1.0 ± 0.0a	3.6 ± 1.1b
0.0	1.0	1.0 ± 0.0a	4.2 ± 1.2a
0.0	3.0	1.0 ± 0.0a	4.7 ± 0.9a

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

Table 4. Effect of several substrates on the growth and survival of plantlets of *C. discolor* transplanting to soil pot after 4 weeks of culture

Substrate	Plant height (cm)	Stem diameter (mm)	Root length (cm)	Survival rate (%)
Sand	3.6 ± 1.1*bc	5.3 ± 0.4b	2.3 ± 1.3d	66
ST	6.6 ± 1.6a	6.3 ± 1.2a	6.3 ± 2.3a	100
Pearlite	3.2 ± 2.3ba	5.8 ± 1.4b	3.6 ± 1.1bc	68
PT	8.6 ± 2.6a	7.3 ± 1.1a	7.6 ± 2.1a	100
TKS-II	3.6 ± 1.8b	4.9 ± 0.9bc	4.6 ± 1.9bc	59

*Data are the means ± SD, of three experiments (n=15). Different alphabetical letters are significantly different according to Duncun's multiple range test at P<0.05. Substrate mixures used for the test: Sand, only sand; ST, mixed sand and TKS-II (1:1); Pearlite, only pearlite; PT, mixed pearlite and TKS-II (1:1); TKS-II, only TKS-II treatment.

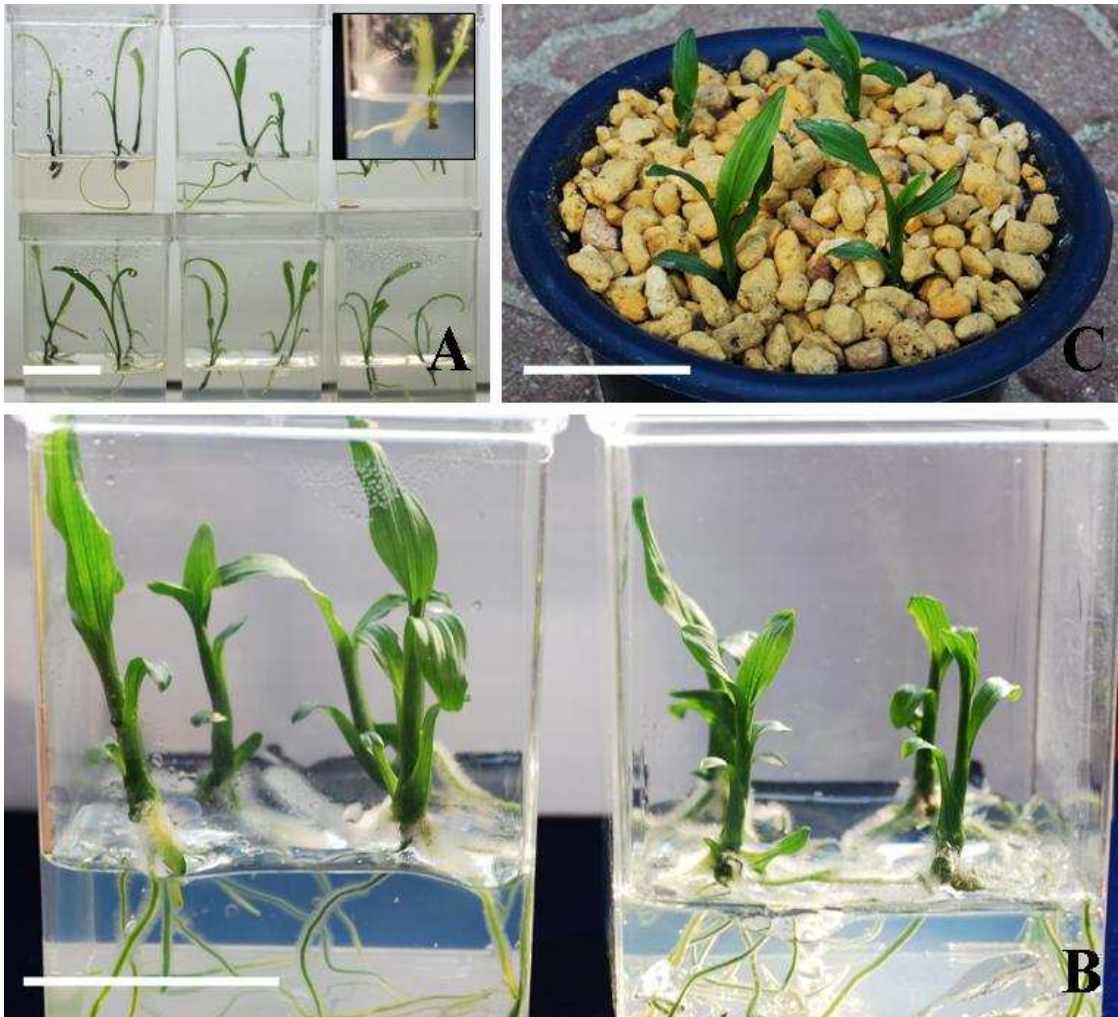


Fig. 2. Growth of adventitious shoots and soil survival of plantlets in *C. discolor*. A: Proliferated plantlets via adventitious shoot formation derived from leaf segments on 1/2MS medium supplemented with 3.0 mg/L NAA. B: Rooting and growth of plantlets on 1/2MS medium supplemented with 3.0 mg/L NAA after 12 weeks of culture. C: Plantlet transplanted in the soil pot. Scale bar, A, B=3 cm, C= 7 cm.

순화를 통한 재분화체의 서식지의 보존을 할 수 있는 연구결과를 도출하였다. 이러한 결과는 향후 새우난초의 형질전환을 통한 품종개량이나 유용한 유전자를 통한 형질전환 식물체의 개발에 중요한 기초자료를 제공할 것으로 생각된다.

적 요

본 실험은 새우난초의 기내 다신초 유도를 통한 재분화 조건의 확립과 이를 통한 토양순화를 목적으로 수행되었다. 우선 새우난초의 유식물체로부터 잎, 구경, 뿌리를 달리하여 부정아를 유도한 결과, 잎 부위는 구경이나 뿌리보다 양호한 부정아의 유도를 보였다. 또한, 부정아 유도시

3.0 mg/L의 BA와 1.0 mg/L의 NAA가 첨가된 배지에서 가장 높은 부정아 유도율을 보였다. 유도된 부정아를 이용하여 GA₃의 농도에 따른 다신초 증식률을 조사한 결과, 3.0 mg/L의 GA₃가 포함된 배지에서 가장 높은 결과를 보였다. 최적의 발근조건을 확인하고자 IBA와 NAA의 농도는 달리하여 실험한 결과, 3.0 mg/L의 NAA가 첨가된 배지에서 가장 높은 발근수와 발근길이를 보였다. 발근이 되어 모본과 유사하게 배양된 새우난초의 유식물체를 모래단용상, 모래와 TKS-II를 1:1로 배합한 ST혼용상, 펠라이트 단용상, 펠라이트와 TKS-II를 1:1로 배합한 PT혼용상, TKS-II단용상을 조성하여 심재한 후 신장률, 줄기직경, 뿌리길이, 생존률을 조사한 결과 모래와 펠라이트에 TKS-II를

1:1로 혼용하여 제조된 배양토에서 가장 양호한 결과를 보였다.

사 사

본 연구는 농림부 농림기술 개발사업, 환경부 차세대 핵심환경기술 개발사업과 2008학년도 교육인적자원부의 한국대학교육협의회 대학교수 국내교류 연구비 지원에 의해 수행되었음에 감사드립니다.

인용문헌

- Bae, K.H., J.A. Yoo, and E.S. Yoon. 2005. Effect of growth regulators of plant regeneration from *Rhodiola sachalinensis* leaf segments. Korean J. Plant Res. 18:410-416.(In Korean).
- Baek, Y.W., K.S. Kim, and B. Hwang. 1996. Micro-propagation of *Centella asiatica* through terminal bud culture. Kor. J. Plant Biotechnol. 23:235-238. (In Korean).
- Chung, J.D., M.Y. Chung, and S.O. Jee. 1998. Effect of culture media on asymbiotic seed germination and those seedling growth of *Calanthe discolor* and *Habenaria radiata*. Kor. J. Plant Biotechnol. 25:189-194. (In Korean).
- Chung, J.D., J.H. Seo, S.O. Jee, and C.K. Kim. 2004. Effect of medium composition on multiple shooting and subsequent growth of mericlone from rhizome of shoot tip culture of temperate *Cymbidium* species. J. Kor. Hort. Sci. 39:343-349.(In Korean).
- Devlin, R.M. 1975. Plant growth hormones, In: Plant physiology (3rd), (ed) D. Van Nostrand Company, New York, pp.411-517.
- Emst, R. 1994. Effects of thidiazuron on in vitro propagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* (Orchidaceae). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 39:273-275.
- Hyun, M.R., J.Y. Choi, J.N. Suh, I.S. So, and J.S. Lee. 1999. Studies on distributions and morphological characteristics of *Calanthe discolor*, *C. sieboldii*, and *C. bicolor* native to Jeju province. Kor. J. Hort. Technol. 17:497-499.(In Korean).
- Kim, K.S., J.S. Kim, and J.H. Park. 2008. Aseptic germination of F1 hybrid seed by inter-species pollination of *Calanthe discolor* Lindl. and *C. discolor* for. *sieboldii* (Dence.) Ohwi. Korean. J. Plant. Res. 21:341-345.(In Korean).
- Kim, Y.S. and S.H. Kim. 1989. A taxonomic study on *Calanthe* in Korea. Kor. J. Plant Tax. 19:273-287. (In Korean).
- Lee, J.S. and B.H. Kwack. 1983. Classification of horticultural cultivars on cultivated *Calanthe striata* R. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 24:62-67.(In Korean).
- Lim, J.H., M.Y. Chung, C.K. Kim, K.B. Lim, and J.D. Chung. 2008. Micropropagation of *Calanthe discolor* Lindl. through induction of multiple shoots from axillary bud culture. Flower Res. J. 16:239-246.(In Korean).
- Malabadi, R.B., Mulgund, G.S., and Nataraja. K. 2004. Efficient regeneration of *Vanda coerulea*, an endangered orchid using thiadiazuron. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 76:289-293.(In Korean).
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-479.
- Park, S.Y., Kwon, A.J., and Lee. W.Y. 2003. High frequency shoot induction from root segments of *Albizza coreana*. J. Kor. Forestry Soc. 92:626-631. (In Korean).
- Ryu, J.H., H.S. Doo, and T.H. Kwon. 1992. Induction of haploid plants by anther culture in sesame (*Sesamum indicum* L.). Kor. J. Plant Biotech. 19:171-177.(In Korean).
- Seo, B.K. 2002. Establishment and using of mass-propagation system for *Calanthe discolor* L. J. Kor. Plant Res. 15:221-226.(In Korean).
- Skoog, F., Strong, F.M., and Miller. C.O. 1965. Cytokinin. Science. 148:532-533.
- 산림청. 2006. 산림자원의 조성 및 관리에 관한 법률시행령. 농림부. pp.63.
- 이창복. 1993. 대한식물도감. 향문사. 서울특별시. pp.810.

(접수일 2009.9.28; 수락일 2010.1.21)