

# *Doritaenopsis* 체세포배의 내배수성 특성과 절편체의 내배수성 세포에 기인한 체세포변이의 발생

박소영<sup>1\*</sup>, 백기엽<sup>2</sup>

<sup>1</sup>생물공학과 국립산림과학원, <sup>2</sup>첨단원예기술개발연구센터 원예학과 충북대학교

## Endoreduplication Pattern of Somatic Embryos and Variants Occurrence Affected by Pre-existed Endoreduplicated Cells in *Doritaenopsis*

So-Young Park<sup>1\*</sup> and Kee-Yoeup Paek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Div., Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350, Korea

<sup>2</sup>Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology, Chungbuk National University, Cheongju  
361-763, Korea

**ABSTRACT** In general, the proliferation of orchids via somatic embryos has been used for mass production of somatic clones because of high propagation efficiency. In spite of high propagation rate, this method often brings somaclonal variation, especially polyploid frequency. Therefore we here concentrated to investigate the relationship between endopolyploidization patterns of explants and the occurrence of tetraploid variant in clonally proliferated *Doritaenopsis* via somatic embryo regeneration system. In the fully developed somatic embryo, upper part contained 2C to 16C while middle and lower parts showed 2C to 32C DNA content. Two-week-old embryo contained 2C to 16C, whereas those regenerated after 4 to 10-week-old contained 2C to 64C nuclei. Results showed that endoreduplication was variable depending upon tissue types, ages, and parts in one species. Lower part of somatic embryo having high endoreduplication degree increased the regeneration of tetraploid variants by about 3-fold comparing to upper part of somatic embryo culture. Polyploid frequency occurrence might be closely related to the high levels of endoreduplication of somatic embryos used as explant. It suggested that the upper part of somatic embryo having comparatively low endoreduplication degree is suitable for the stable in vitro propagation system.

### 서 론

*Doritaenopsis*는 *Phalaenopsis*와 함께 세계적으로 절화나 분화식물로서 중요한 위치에 있다 (Tanaka 1992, Arditti and Pridgeon 1997). 그러나 종자로 번식된 묘는 화색, 저온감응성 등 유전형질이 상이하여 기내배양을 통한 영양계증식이 산업화에 있어 중요한 관건이다 (Arditti and Earnst 1993,

Tokuhara and Mii 2001, Been 2003). *Doritaenopsis*의 영양계 증식은 다신초증식 (multiple-shoots)과 원괴체유사체 (protocorm-like bodies; PLBs)라고 불리는 체세포배발생, 이 두 가지 경로를 통해 증식된다 (Chen and Piluek 1995, Ernst 1994; Park et al. 1996). 일반적으로 이 두 방법 중 체세포배발생 과정을 경유한 증식이 더 효율적인 것으로 알려져 있다 (Park et al. 2000). 그러나 높은 증식효율과 함께 4배체와 같은 배수성변이체의 발생 빈도 또한 높다 (Zhou 1995, Chen et al. 1998, Ishii et al. 1998, Park and Paek 1999, Tokuhara and Mii 2001).

\*Corresponding author Tel 031-290-1164 Fax 031-290-1020  
E-mail: soypark7@foa.go.kr

체세포변이는 기내 배양과정을 통해 재분화된 식물에 있어서 변이를 표현하는 용어로 사용되어왔다 (Larkin and Scowcroft 1981). 이중 유전자 발현의 차이에 의해 표현되는 변이를 ‘후성적변이’ (epigenetic variation)라고 하는 반면, 후대에 유전되는 변이를 ‘유전적변이’ (genetic somaclonal variation)라고 한다 (Bouman and De Klerk 1997, Kaeppler et al. 2000). 이러한 체세포변이 가운데 배수체의 발생은 발생빈도가 가장 높고 표현형이 비정상적이어서 심각하게 여겨진다 (Park and Paek 1999). 따라서 이러한 변이의 발생 원인을 찾아 억제시키는 것이 기내배양을 통해 대량증식되는 원예작물의 산업화에 있어 가장 중요한 점으로 인식되고 있다.

내배수성 (endopolyploidy)은 90% 이상의 피자식물에서 볼 수 있는 일반적인 현상이나 아직까지 발생학적으로 내배수성이 발생하는 원인이나 역할 등 이에 대한 원인규명이 부족하다. 몇몇 연구자들의 연구 결과에 의하면 세포분열 과정에 변화가 일어난, 일명 ‘내배수화된 세포 (endoreduplicated cells)’는 세포분열에서 핵 DNA 함량이 2배로 증가되나 M기의 소실로 인해 정상적인 세포분열은 이루어지지 않고 세포의 배수성만이 증가함에 의해 발생하게 된다고 한다 (Sun et al. 1999). 이러한 내배수성의 유형은 식물 종, 조직의 종류, 식물체의 연령, 혹은 환경적 요인에 따라 다르다 (Gerdreau et al. 1999). 일반적으로 정단 분열세포와 표피세포는 2C의 DNA 함량을 갖는 반면에 이외의 세포들은 더 높은 배수성을 갖는다 (Bouman and De Klerk 1997). 기내배양에서 대부분의 재분화는 2C의 DNA 함량을 갖는 세포에서 시작되나, 만약 재분화를 위한 세포분열이 내배수화된 세포에서 시작되어 식물체로 발달하게 된다면 그 식물은 배수성 변이체가 될 것이다.

본 연구는 *Doritaenopsis* 체세포배의 내배수성 특성을 규명하고, 그 유형과 4배체 변이 발생과의 관계를 규명하여 안정적인 영양계 증식묘 생산 체계를 구축하는데 목적이 있다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

*Doritaenopsis* ‘New Candy’ × *Dtps.* (‘Mary Anes’ × ‘Ever Spring’) (*Dtps.* hybrid) 화경배양을 통해 무균 액아묘를 얻었고, 잎 박편배양 (thin section culture)을 통해 체세포배를 유도하였다 (Park et al. 2002a, b). 체세포배는 2 g/L peptone, 3% 감자 균질물 (w/v), 0.5 g/L 활성탄, 30 g/L sucrose 등이 첨가된 Hyponex 배지 (Kano, 1965)에서 4주간 배양하여 실험재료로 이용하였다.

### 체세포배의 내배수성 유형

내배수성 유형은 다음과 같이 비교 분석되었다: 1) 체세포배와 접합자배, 2) 체세포배의 부위별, 3) 체세포배 발달단계별 (연령). 체세포배와 접합자배의 내배수성 분석을 위해 4주령의 체세포배와 종자파종 후 4주된 접합자배가 사용되었고, 체세포배 조직부위별로는 완전히 발달한 체세포배 (약 3~5 mm)를 정단분열조직이 포함된 상부와 중부, 하부로 나누어 각 부위를 1~1.5 mm 정도로 절단하여 부위별 내배수성 특성을 분석하였다. 마지막으로 체세포배를 Hyponex 배지에 배양하여 배양 후 0~10주까지 2주 간격으로 채취하였다. 배양기간별로 채취된 체세포배는 연령에 따른 내배수성 변화 분석을 위해 사용되었다. 또한 배양기간별로 채취된 체세포배는 일부 고정액에 담가서 조직학적 관찰에 이용하였다.

### 체세포배 유래 식물체의 배수성

체세포배의 부위별 내배수성 정도와 이로부터 재분화되는 식물체의 배수성 변이체 발생과의 관계를 규명하기 위하여 비교적 낮은 내배수성을 갖는 상부와 높은 내배수성을 갖는 하부로 절편체를 각각 나누었다. 절단된 상부와 하부조직 (1~2 mm 두께)은 2차배 유도용 배지가 분주된 petri-dishes (9×1 cm)에 절단면이 배지에 접하도록 배양하여 각각의 조직으로부터 2차배를 유도하였다. 4주 후 상부조직에서 유도된 체세포배에서는 다시 상부절편체를, 하부조직에서 유도된 체세포배에서 다시 하부를 재절취한 다음 배양하여 3차배를 얻었다. 다시 4주 후 얻어진 3차배를 생장조절제가 첨가되지 않은 Hyponex 배지에 옮겨 식물체로 발달시켰다. 그리고 이 식물체의 잎을 채취한 다음, 식물체의 배수성을 확인하였다.

모든 배양은 온도 25±1°C, 백색형광등 (Kumho FL40D, Korea)하에서 30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>의 광량자속밀도로 16시간 광주기가 유지되는 배양실에서 실시하였다.

### Flow Cytometry 분석

절편체 내배수성과 재분화체 배수성 분석을 위해 100 mg/FW 정도의 시료에 250 μl의 핵 추출용 완충액 (Partec, Münster, Germany)을 가하고 해부용칼로 잘게 절단하였다. 절단된 식물체가 포함된 용액은 30 μm nylon sieve로 여과한 다음 여과된 용액에 4,6-diamidino-2-phenylindole-2HCl (DAPI)가 포함된 2.0 ml의 염색용액 (Partec, Münster, Germany)을 가하여 핵을 형광염색하였다. 분석은 Ploidy Analyser (PA, Partec)을 이용하여 실시하였고, 결과는 DPAC software (Partec)로 해석하였다. PA 분석시 한 개의 시료는 최소한

3,000 particles 이상 분석하였다. 모본의 꽃에서 화분과 (pollinia)를 채취하여 그 핵 DNA 함량을 1C로 하였다. 데이터는 2C에서 64C의 높은 내배수성을 한 축에 보여주기 위하여 semi-logarithmic scale로 분석하였으며, 결과는 총 핵 DNA의 양에 대한 백분율로 표현하였다.

조직학적 관찰

시료는 1.5% glutaraldehyde와 1.6% paraformaldehyde가 포함된 고정액 (pH 6.8)에 24시간 이상 고정한 다음 점차적으로 에탄올 농도를 높여서 탈수시켰다. 탈수가 완료된 시료는 Yeung (1999)의 방법에 따라 Technovit 7100 (Kulzer, Germany)으로 포매하였다. 시료가 포매된 블록은 Lieca 2040 Autocut rotary microtome을 이용하여 2~3 μm 두께로 절단하였고, periodic acid-Schiff's reaction과 toluidine blue O로 염색한 다음, 관찰하였다.

결과 및 고찰

체세포배의 내배수성

*Dtps.* hybrid의 내배수성 유형을 조사하고, 절편체로 이용되는 체세포배의 부위별 내배수성이 배수성 변이 발생에 미치는 영향을 구명하기 위하여 다음과 같이 내배수성을 분석하였다; 1) 체세포배와 접합자배의 내배수성 유형 분석, 2) 체세포배 부위별 내배수성 정도, 3) 체세포배 발달단계별 (연령) 내배수성 변화.

우선 체세포배의 내배수성이 배양과정에 의해 발생된 특수한 현상인지, 아니면 접합자배와 같이 정상적인 배 발달 과정에서 볼 수 있는 자연적인 현상인지를 규명하고자 동일한 연령의 접합자배와 체세포배의 내배수성을 비교하였다

(Figure 2). 분석 결과 체세포배에서는 정상적인 2n 개체의 DNA 함량인 2C부터 각각 2배, 4배, 8배, 16배인 4C, 8C, 16C, 32C의 DNA 함량을 갖는 세포들이 확인되었다. 그리고 동일한 연령 (4주)의 접합자배 역시 2C ~ 32C의 동일한 내배수성을 갖고 있었다. 이 결과는 체세포배에서 확인된 높은 내배수성이 체세포배 발생시 사용되는 성장조절제나 배지 등과 같은 특수한 조건에 의해서 발생하는 것이 아니라 배발달 과정에서 일어나는 정상적인 현상이라는 것을 의미한다. 또한 접합자배와 체세포배에서 4C의 DNA 함량을 갖는 세포가 가장 많았는데 이 세포들은 a) 정상세포 (2C)가 S/G2 단계에 있을 때 이거나, 혹은 b) 4C로 내배수화 된 세포 등 2종류가 혼재하고 있어 가장 높은 분포를 보이는 것으로 판단된다. 일반적으로 정상적인 2배체 식물체내에 존재하는 배수성이 높은 세포는 자연상태에서도 흔히 관찰되는데 이러한 현상은 세포의 핵내유사분열 (endomitosis)이나, 혹은 핵융합 (nuclear fusion)

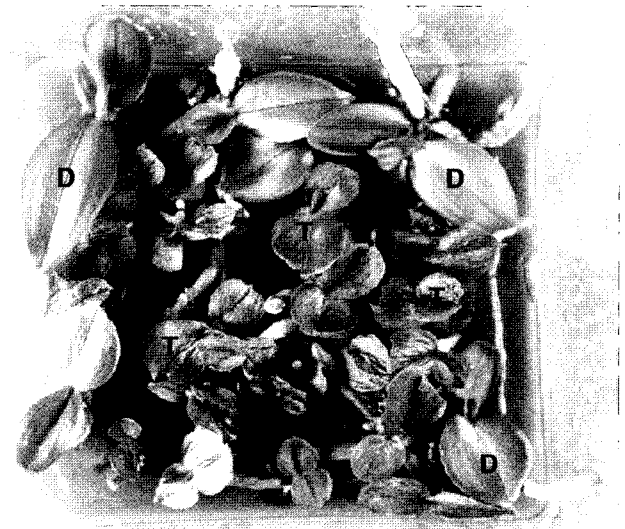


Figure 1. Diploids and tetraploids in clonally proliferated *Dtps.* hybrid via somatic embryo regeneration system (D: diploid, T: tetraploid).

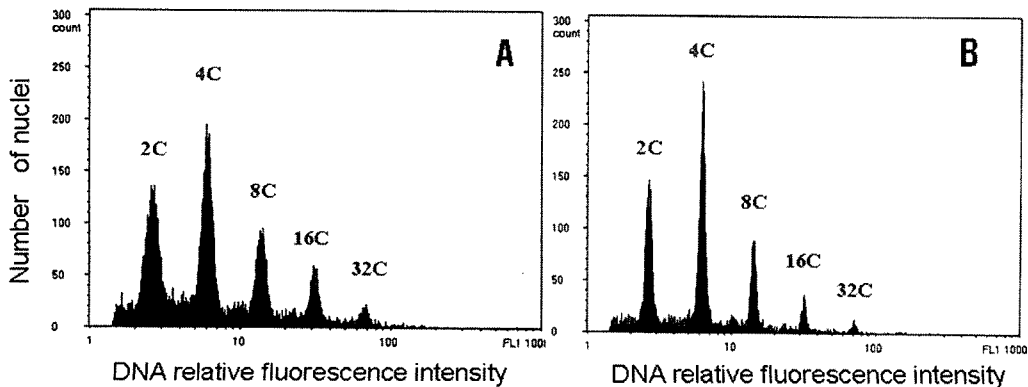


Figure 2. Histograms of nuclei isolated from 30 day-old zygotic embryo (protocorm) (A) and 30 day-old somatic embryo (B) cultured in vitro on a log scale in *Dtps.* hybrid.

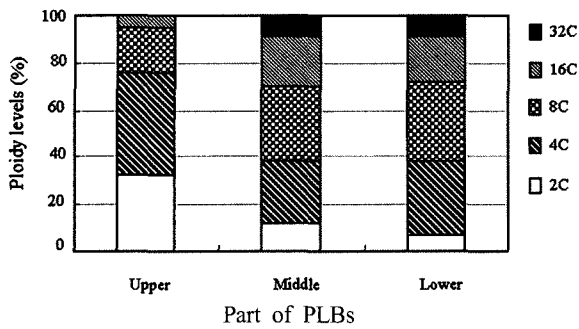


Figure 3. Endoreduplication level by detection of DNA content in different parts of somatic embryo.

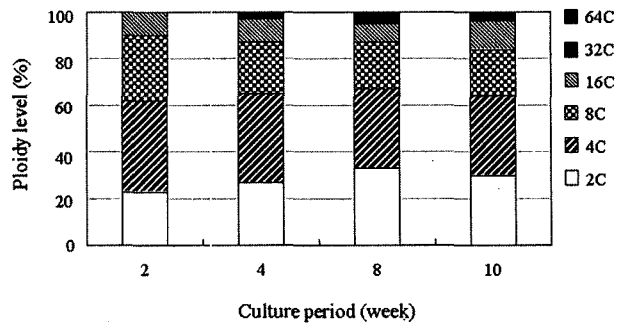


Figure 4. Changes of endoreduplication level by detection of DNA content in the somatic embryo during somatic embryo developing.

에 의해서 일어난다 (Kinoshita et al. 1991).

청경채로 알려진 pakchoi는 자엽, 잎 등에서 2C에서 64C까지 다양한 내배수성 세포들이 내포되어있는 것과는 달리 배에는 2C의 세포만이 검출되었다 (Kudo and Kimura 2001). 그러나 본 실험에서 *Doritaenopsis*의 배는 잎과 뿌리 등 (2C~16C, 결과 미제시) 보다 높은 내배수성을 갖는 것으로 밝혀졌다. 이로 미루어 체세포배의 내배수성 특성은 종마다 다를 수 있다.

체세포변이의 기원에 대해서는 여러 가지 가능성이 거론되고 있는데 (Bouman and Klerk 1997) 그 중 기내에서 발생하는 체세포변이는 모본에서 프로그램 된 DNA에 변화가 생기는 경우, 특히 내배수화와 같은 현상이 발생하는 경우에 변이가 발생할 확률이 높아진다 (Bouman and Klerk 1997). 정상적인 세포분열 프로그램에 의해 대부분은 2C 세포들이 세포분열을 하지만 기내배양시 성장조절제와 배양환경에 의해 일반 환경에서보다 빠른 세포분열이 일어나고 이때 세포분열할 것으로 프로그램 되지 않은 세포, 즉 내배수화된 세포에서 재분화를 위한 세포분열이 시작된다면 이 재분화체는 배수성 변이체가 될 것이다 (Bouman and Klerk 1997, Pierik 1987).

체세포배 부위별 내배수성을 확인하기 위하여 완전히 발달한 체세포배 (4주령)를 정단분열부가 포함된 부분부터 상부, 중부, 하부로 나누어 각 부위별 내배수성을 분석하였다. 결과 상부는 2C에서 16C까지의 세포들이 분포한 반면 중부와 하부에서는 2C에서 32C까지의 DNA 함량을 갖는 세포가 검출되었다 (Figure 3). 또한 체세포배 발달 단계에 따른 내배수성의 변화를 분석한 결과 배양 2주 된 체세포배가 2C~16C까지의 내배수성을 갖는 것과 달리 4주, 8주, 10주로 체세포배의 연령이 증가함에 따라 내배수성은 64C까지 증가 하였다 (Figure 4). 조직학적 관찰 결과 4주령의 체세포배에서는 일반적인 크기를 갖는 세포들이 관찰되었으나 (Figure 5A), 8주령의 체세포배에서는 거대한 크기의 핵을 갖는 내배수성이 높은 세포들이 관찰되었다 (Figure 5B). 다른 종의 식물에서도

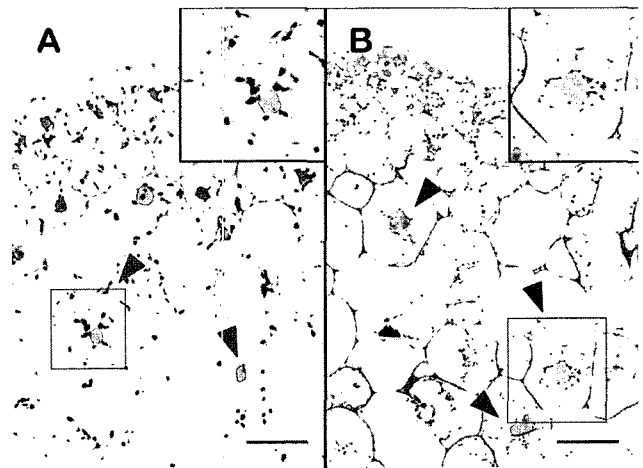


Figure 5. Photomicrographs of somatic embryos (A: after 4 weeks of culture, B: after 8 weeks of culture) showing differences in nucleus size depending upon developing stage (arrows indicate normal nuclei in A, and endoreduplicated nuclei in B). Bar: 50 μm.

한 개체내에서 오래된 조직은 새로 발생된 조직보다 높은 배수성을 가지고 있음이 보고된 바 있어 (Joubes and Chevalier 2000, Kinoshita et al. 1991, Melaragno et al. 1993), 내배수성은 식물 종과 식물체부위, 연령에 따라 상이함을 확인할 수 있었다.

*Dtps. hybrid* 체세포배의 정단분열 부분은 쉽게 식물체로 발달하기 때문에 산업적인 목적으로 체세포배를 대량증식할 때는 일반적으로 정단부위를 제거하고 체세포배의 절단면을 배지에 접하게 배양하여 2차배를 유도한다 (Park et al. 2000). 그러나 본 연구결과에 의하면 체세포배 하부는 상부조직에 비해 내배수성이 높은 세포들이 분포하고 있고 이러한 하부를 배양하여 연속 증식할 경우에 배수성 변이체가 발생할 확률은 더욱 높을 것으로 생각된다. 이러한 의구심에 바탕을 두고 2차배 형성을 위해 체세포배의 상부 (정단부만 제거)와 하부를 각각 배양하여 2차배를 유도하였다. 배양4주 후 각각의 절편체에서 형성된 2차배를 다시 상부와 하부로 나누어 배양

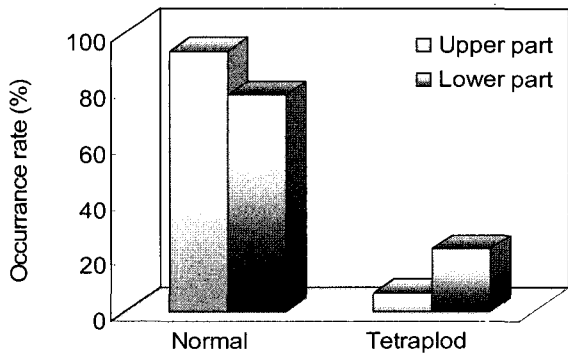


Figure 6. Tetraploids occurrence rate.

하여 이로부터 3차배를 유도하였다. 배양 4주 후 형성된 3차 배를 각각 분리하여 Hyponex 배지에 배양한 다음 식물체로 분화시키고 각 식물체의 배수성을 분석하였다. 분석결과 (Figure 6) 체세포배의 상부를 2회 연속 증식한 처리구에서 정상체 (2n) 발생률은 93.3%인 반면 하부에서는 77.6%만이 정상 식물체였고 22.4%가 배수성 변이체였다.

내배수화된 세포는 뿌리털 (root hair)이나, 이형결정세포 (raphide crystal idioblasts), 배병 (embryo suspensors)과 같이 대부분 특정 부위의 세포들이 많다 (Kudo and Kimura, 2001). 90% 이상의 고등식물에서 내배수성 세포들 ( $\geq 4C$ )이 존재하지만 일반적으로 그 분포 비율은 2C 세포에 비해 현저히 적다. 이는 onion (Bohanec and Jakse 1999), oil palm (Rival et al. 1997)과 *Rhododendron* (Schepper et al. 2001) 등에서 확인된 바 있다. 그러나 최근 난과식물의 내배수성에 관한 연구보고에 따르면 난과식물은 다른 식물 종에 비해 특이하게 내배수성이 높음을 보고하고 있다 (Jones et al. 1998, Schepper et al. 2001).

이상의 결과로 미루어 *Dtps.* hybrid 체세포배의 높은 내배수성은 정상적인 발달과정이며, 체세포배 증식 과정중 발생하는 배수성 변이체의 발생은 *Dtps.* hybrid의 체세포배에 존재하는 높은 내배수성과 밀접한 관련이 있음을 보여준다. 따라서 배수성 변이의 발생을 낮추기 위해서는 비교적 내배수성 세포의 분포도가 낮은 체세포배 상부조직을 절편체로 이용하는 것이 적합하다고 생각된다.

적 요

일반적으로 체세포배를 경유한 대량증식은 증식효율이 높다. 그러나 종종 배수성 변이와 같은 체세포 변이를 야기하기도 한다. 본 연구에서는 *Doritaenopsis* hybrid의 체세포배 증식시 발생하는 배수성 변이체와 체세포배의 세포에 내재되어 있는 내배수화된 세포와의 관계를 구명하여 배수성 변이체

발생 원인을 밝히고자 실시되었다. 내배수성 분석결과 체세포배의 상부는 2C~16C의 DNA를 함유한 세포들로 구성되어 있는 반면, 중부와 하부 조직에는 2C~32C의 내배수성이 높은 세포들이 내재되어 있었다. 또한 체세포배 연령별로는 2주된 체세포배가 2C~16C 정도의 세포로 구성되어 있는 반면 10주령의 체세포배는 2C~64C까지 고도로 내배수화가 진행된 세포들이 존재하였다. 이는 한 식물체에서도 부위, 연령에 따라 내배수성이 다를 수 있음을 보여주는 결과이다. 체세포배 부위중 내배수성이 낮은 상부와 높은 하부로 절단하여 각각의 절편체를 배양한 결과 배수성 변이체의 발생은 내배수성이 높은 하부를 배양하였을 때 3배 이상 높았다. 본 연구결과는 변수성 변이체의 발생원인이 내배수화된 세포에 있음을 보여주며 이를 기초로 *Dtps.* hybrid의 안정적인 증식체계를 구축하는데 기초가 되리라 생각된다.

사 사

본 연구는 산업자원부, 교육인적자원부, 노동부 지정 최우수 실험실 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

인용문헌

Arditti J, Ernst R (1993) Micropropagation of orchids. John wiley & Sons, Inc. pp 467-520  
 Arditti J, Pridgeon AM (1997) Orchid biology: Review and perspectives, Vol. 7, Kluwer Academic Publishers. pp 1-424  
 Been CG (2003) Continuous production of *Phalaenopsis* clones by basal shoot culture. *Kor J Plant Biotechnol* 30: 375-380  
 Bohanec B, Jakse M (1999) Variations in gynogenic response among long-day onion (*Allium cepa* L.) assessions. *Plant Cell Rep* 18: 737-742  
 Bouman H, De Klerk GJ (1997) Somaclonal variation. In.: Geneve RL, Preece JE, Merkle SA (eds) Biotechnology of ornamental plants. CAB INTERNATIONAL  
 Chen YQ, Piluek C (1995) Effects of thidiazuron and N6-benzylaminopurine on shoot regeneration of *Phalaenopsis*. *Plant Growth Reg* 16: 99-101  
 Chen WH, Chen TM, Fu YM, Hsieh RM, Chen WS (1998) Studies on somaclonal variation in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Rep* 18: 7-13  
 Ernst R (1994) Effects of thidiazuron on in vitro propagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 39: 273-275  
 Gerdreau E, Orbovic V, Hofte H, Traas J (1999) Gibberellin and ethylene control endoreduplication levels in the *Arabidopsis thaliana* hypocotyls. *Planta* 209: 513-516  
 Ishii YT, Takamura MG, Tanaka M (1998) Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell*

- Rep 17: 446-450
- Jones WE, Kuehnle AR, Arumuganathan K (1998) Nuclear DNA content of 26 orchid (Orchidaceae) genera with emphasis on *Dendrobium*. *Ann Bot* 82: 189-194
- Joubes J, Chevalier S (2000) Endoduplication in higher plants. *Plant Mol Biol* 43: 735-745
- Kano K (1965) Studies on the media for orchid seed germination. *Mem Fac Agric. Kagawa Univ* 20: 1-68
- Kaeppeler SM, Kaeppeler HF, Rhee Y (2000) Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol Biol* 43: 179-188
- Kinoshita I, Sanbe A, Yokomuraz EI (1991) Increases in nuclear DNA content without mitosis in benzyladenine-treated primary primary leaves of intact and decapitated bean plants. *J Exp Bot* 42: 667-672
- Kudo N, Kimura Y (2001) Flow cytometric evidence for endopolyploidy in seedlings of some *Brassica* species. *Theor Appl Genet* 102: 104-110
- Melaragno JE, Mehrotra B, Coleman AW (1993) Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissues of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 5: 1661-1668
- Park SY, Murthy HN, Paek KY (2000) Mass multiplication of protocorm-like bodies (PLBs) using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 63: 67-72
- Park SY, Murthy HN, Paek KY (2002a) Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk derived leaves. *In Vitro cell dev Biol Plant* 38: 168-172
- Park SY, Paek KY (1999) Occurrence of abnormal plantlets and their morphological characteristics as affected by clones and culture periods in clonally propagated *Phalaenopsis* by leaf culture. *J Kor Soc Hort Sci* 40: 731-734
- Park SY, Yeung EC, Charkrabarty D, Paek KY (2002b) An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. *Plant Cell Rep* 21: 46-51
- Park YS, Kakuta S, Kano A, Okabe M (1996) Efficient propagation of protocorm-like bodies of *Phalaenopsis* in liquid medium. *Plant Cell Tiss Org Cult* 45: 79-85
- Pierik RLM (1987) In vitro culture of higher plants. In: Vegetative propagation of orchids. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Rival A, Beule T, Barre P, Hamon S, Ynoiro YD (1997) Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue cultures and seed-derived plants. *Plant Cell Rep* 16: 884-887
- Schepper S, Leus L, Mertens M, Van Bockstaele E, De Loose M (2001) Flow cytometric analysis of ploidy in *Rhododendron* (subgenus *Tsutsusi*). *HortScience* 36: 125-127
- Sun Y, Flannigan BA, Setter TL (1999) Regulation of endoduplication in maize (*Zea mays* L.) endosperm. Isolation of a novel B1-type cyclin and its quantitative analysis. *Plant Mol Biol* 41: 245-258
- Tanaka M (1992) Micropropagation of *Phalaenopsis* spp. In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and Forestry*, Vol. 20, High-Tech and Micropropagation IV), Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Tokuhara K, Mii M (2001) Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *In Vitro Cell Dev Biol* 37: 457-461
- Yeung EC (1999) The use of histology in the study of plant tissue culture systems-some practical comments. *In Vitro Cell Dev Biol* 35: 137-143
- Zhou TS (1995) In vitro culture of *Doritaenopsis*: comparison between formation of the hyperhydric protocorm-like-body (PLB) and the normal PLB. *Plant Cell Rep* 15: 181-185

(접수일자 2006년 11월 7일, 수리일자 2006년 11월 22일)