

## 심비디움 육종, 조직배양 및 형질전환 연구동향에 관한 고찰

이유미 · 김미선 · 이상일 · 김종보

### Review on breeding, tissue culture and genetic transformation systems in *Cymbidium*

Yu-Mi Lee · Mi-Seon Kim · Sang-Il Lee · Jong-Bo Kim

Received: 15 October 2010 / Accepted: 29 October 2010  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** *Cymbidium* is horticulturally important and has been one of the most commercially successful orchid plants as well as cut flowers around the world including Korea. Up to now, a huge number of elite *Cymbidium* cultivars have been released on the commercial market via cross-hybridization, mutation and polyploidization breeding techniques. To investigate on breeding system in *Cymbidium*, we inquired the brief history and techniques of breeding and the current status on *Cymbidium* breeding in Korea. Also, the general propagation process of elite *Cymbidium* lines via tissue culture should be presented. However, the slow process of conventional breeding and the lack of useful genes in *Cymbidium* species delays the introduction of new cultivars to the commercial market. To solve these limitations, efficient regeneration and genetic transformation systems should be established in the improvement of *Cymbidium* breeding program. During the last several decades, some progress has been made in tissue culture and genetic transformation in *Cymbidium* species. We review the recent status of tissue culture and genetic transformation systems in *Cymbidium* plants.

**Keywords** *Agrobacterium*, *Cymbidium*, Orchid, Particle bombardment, Transformation

#### 서론

심비디움의 원산지는 인도 북부에서 인도네시아, 미얀마, 타이, 남베트남, 중국, 한국, 일본에 걸쳐 심비디움 벨트 (Asiatic *Cymbidium* Belt)를 형성하고 있다. 심비디움은 해발 500~1500 m의 산지에 자생하며 일부 착생종도 있으나 대부분이 지생종이다 (Coker 1993).

심비디움은 상록성 초본식물로 약 44개의 원종이 자생하고 있으며 (Du Puyd and Cribb 1988) 1화경에 10개 이상의 소화가 착생하여 보통 1개 화분에 30송이 이상의 꽃이 피어 매우 화려하고 절화 또는 분화 수명이 약 2개월 정도로 길어 전세계적으로 인기가 높은 난 품목 중의 하나이다 (Kim et al. 2010). 우리나라에서 심비디움은 난 전체 재배면적 253 ha의 약 45%인 115 ha이며 ('09 MIFAFF), 또한 국내 난과식물 중 재배면적도 가장 넓고, 최근에는 수출 화훼산업을 주도하는 품목으로도 각광받고 있다. 우리나라에서 심비디움은 수출위주로 재배되고 있는데 주요 수출국인 중국에서 선호하는 황색과 적색 화색의 중대형 분화품종이 대부분이다 (Kim et al. 2010).

#### 심비디움 육종

난 육종은 영국에서 1731년에 처음 시작되었으며, 미국에서는 1840년대부터 유전자원 도입을 시작으로 1920년

Y.-M. Lee and M.-S. Kim should be considered as co-first authors

Y.-M. Lee · S.-I. Lee · J.-B. Kim (✉)  
건국대학교 일반대학원 생명자원환경과학과  
(Dept. of Life Resources and Environmental Science, Graduate school, Konkuk University, Choong-Ju, 380-701, Korea)  
e-mail: jbhee1011@kku.ac.kr

M.-S. Kim  
국립원예특작과학원 화훼과  
(Division of Floriculture, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Su-Weon 441-440, Korea)

난협회를 조직하여 재배 및 도입을 확대하였다. 1930년 대형 배수체 품종 육성을 계기로 육종연구가 활발해지면서 다양한 품종으로 분화되는 계기가 되어 현재에 이르고 있다. 일본의 경우, 1889년 심비디움의 도입되기 시작해 1932년 '백운' 품종육성을 계기로 절화품종 위주의 대형종에서 분화형의 중소형 품종으로 변화하기 시작하였다.

## 국외 육종현황

1731년 영국에서 취미로 난 육종이 시작된 이래 상업적 목적을 가지고 본격적인 육종으로 전환된 계기는 무균종자 발아성공과 상업적인 영양계묘의 대량생산법 즉, 생장점배양방법이 성공한 1970년대 이후부터 라고 할 수 있다. 과거 유럽과 미국에서 주로 육성한 심비디움 품종은 절화용으로 사용할 수 있는 대형품종이 많다. 이후 일본에서 절화용 품종과 소형종과의 교배로 중, 소형종의 분화용이면서 화색도 다양하게 육성하여 오늘날의 아름답고 우아한 분화 심비디움을 선보이게 되었다. 현재 심비디움 육종은 일본이 주도적으로 유행을 선도하는 신품종을 발표하고 있으며, 네덜란드에서도 최근 본격적으로 신품종 육성프로그램을 시작하였다. 또한 외국에서의 심비디움 육종은 주로 민간육종이 근간을 이루며 공공기관이나 대학에서는 육종기초 및 유전에 관한 연구를 하고 있다. 민간육종 대부분은 기업형태로 이루어지고, 규모화 및 조직화 되어있으며 오랜 육종역사와 우수한 육종기술을 보유하고 있다. 대표적인 심비디움 육종회사는 일본의 '무코야마', '가와노' 그리고 네덜란드의 'Floricultura' 등이 있다.

## 국내 육종현황

우리나라는 1920년에 심비디움이 도입되었으며, 1980년 재배 및 도입이 확대된 이후, 1992년에 국립원예특작과학원에서 본격적으로 심비디움 육종프로그램이 시작되었다. 2003년에 최초로 심비디움 품종이 개발되어 국립원예특작과학원에서 17품종이 개발되었다. 또한 각 도 농업기술원 중 제주도 농업기술원만이 1990년 중반부터 심비디움 육종을 수행해오다 현재는 중단된 상태이어서 현재로서는 국가기관에서 심비디움 육종사업을 하는 곳은 국립원예특작과학원이 유일하다. 한편 민간에서도 육

종에 관심을 가지고 있으나 작목특성상 넓은 재배면적, 긴 육종연한 그리고 막대한 예산 투입 등으로 인해 소규모 재배농가 및 민간육종업체들에게는 부담으로 인해 활발한 육종이 이루어지지 않고 있는 실정이다. 현재 우리나라에서 심비디움 품종 개발 및 보급이 시작단계이며 개발한 품종 수는 적으나 수출농가가 요구하는 품종이 계속 개발 및 보급 중에 있어 향후 일본 보다 우수한 품종개발을 기대하고 있다.

심비디움의 품종개량은 최초의 교배종인 네오-로위아넘 (*Eburneo-lowianum*)이 19세기 후반 (1889년)에 육성된 이래 1930년대까지 영국에서 이루어졌다 (Kim et al. 2010). 특히 이때 육종된 웨스턴버트 (*Alexanderi* 'Westonbirt'), 핑키 (*Rosanna* 'Pinkie'), 렉스 (*Olympus* 'Rex') 등은 이 후의 품종 개량에 있어서 우수한 육종 모본으로 이용되었다 (Kim et al. 2010). 이것을 이용해서 1960년경까지 미국에서 배수성 대륜계 품종이 많이 육성되었으며 (Hugo 1979), 20세기 후반이 되면서 일본에서도 대형의 웨스턴버트 (*Alexanderi* 'Westonbirt')와 초세가 작은 금릉변 (*Cym. pumilum*)과 같은 다양한 소형종과 교배함으로써 현재의 중소형의 분화 심비디움 품종을 개발하게 되었다 (Guest and Guest 1996).

우리나라에서 심비디움 품종개발은 수입대체 및 수출국 기호성 우수 품종 개발을 목표로 1992년도에 착수하여 최초로 국산 심비디움 품종인 '뷰티프린세스' 등 4품종을 개발하였으며 (Kim et al. 2006a, 2006b, 2007) 이후 매년 신품종을 육성하여 현재 '허니걸' 등 (Kim et al. 2008a, 2008b, 2009) 21개 품종이 육성되었다. 이들 중 8개 품종이 2008년도에 품종보호등록이 완료되어 종묘생산업체에 기술이전 하였으며 일부 품종은 품종보호출원 중에 있는 상황을 고려하면, 심비디움 재배농가에 종묘가 보급되는 초기단계라 할 수 있다. 따라서, 난 뿐만 아니라 화훼류 특성상 품종의 다양성이 요구되고 있는 것을 고려해볼 때 국산 심비디움 품종 개발은 아직 부족한 실정이다 (Kim et al. 2010).

현재 심비디움 수출농가가 부담하고 있는 종묘비는 1본당 약 2,000원대로 농가경영비의 약 20%정도를 차지할 만큼 비중이 높다. 국산 품종의 종묘는 약 1,000원대로 공급이 가능해 수출 농가의 경영비 절감 및 수출경쟁력 향상, 그리고 종묘가격 협상력 확보 등의 효과가 있어 국제 경쟁력 있는 국산 품종의 개발이 시급한 상황이다 (Kim et al. 2010).

## 유전적 특성

### 원종의 특성

서론에서 기술한 심비디움 벨트 (Asiatic *Cymbidium* Belt) 지대가 심비디움의 자생지인데, 일부 착생종 (epithetic orchid)도 있으나 대부분이 지생종 (terrestrial orchid)이다. 이 지대에 자생하고 있는 원종은 약 52종에 이르고 그 중에서 30여종이 교배 모본으로 사용되고 있다.

심비디움의 품종개량은 중간 교잡을 사용하여 최초의 교배종인 에버네오-로위아넘 (*Eburneo-lowianum*)이 1989년 영국에서 육성된 이래 1930년대까지 영국에서 육종이 이루어졌다. 특히 이때 육종된 웨스턴버트 (Alexanderi 'Westonbirt'), 핑키 (Rosanna 'Pinkie'), 렉스 (Olympus 'Rex'), 래디안트 (Rio Rita 'Radiant'), 마그니피카 (Pearl 'Magnifica'), 로위스 샌더 (Louis Sander), 미란다 (Miranda), 프래지던트 윌슨 (President Wilson) 등은 1960년대까지의 심비디움 품종 개량에 있어서 우수한 육종 모본으로 이용되었다. 이것을 이용해서 미국에서 배수성 대륙 품종이 많이 육성되었다.

최근 일본에서 심비디움 재배농가에서 전문적으로 많

은 품종을 육성하여 다양한 품종이 보급되고 있는데, 현재 우리나라에서 재배되고 있는 품종들은 대부분 일본에서 육성된 품종들이다. 따라서 로열티 (royalty) 지급 문제가 대두되고, 또한 수출의 확대 및 다변화에 어려움으로 인해 국내 품종 육성이 시급한 실정이다.

심비디움은 생장점배양에 의한 영양번식으로 대량증식이 매우 용이하여 일찍부터 조직배양기술이 발전되어 왔다. 우리나라에서도 조직배양묘 생산기술의 보편화와 국민소득의 증가로 재배면적뿐만 아니라, 절화 및 분화의 소비가 증가함에 따라 다양한 심비디움 품종들이 재배되고 있다 (Fig. 1).

Table 1과 2에 보면 육종 및 대량증식에 사용되고 있는 다양한 심비디움 원종 41종을 소개되어 있는데, 이들은 현재 유통되고 있는 품종과 깊은 관련이 있는 원종만을 선별한 것으로서, 원산지와 화색 별로 분류하였다.

### 화색의 유전

난에서는 실제로 화색 유전에 대한 정보가 거의 없는데 비해, 난의 화색에 관한 유전양식은 많은 육종가들의 관심사항으로 주목받고 있으나 활용가능한 것이 거의 없는



Fig. 1 A variety of major original cultivars in *Cymbidium* plants

**Table 1** Important characteristics of main original cultivars in *Cymbidium* plants

	Species	Origin	Flower color
알로이폴리움	<i>aloifolium</i>	동남아시아 일대	황갈색, 붉은줄
아트르퍼퍼리움	<i>atropurpureum</i>	보루네오, 말레이, 자바, 필리핀	황갈색, 진자색
바이칼라	<i>bicolor</i>	인도, 남중국, 인도네시아, 수마트라	황갈색 복륜
보넨시	<i>borneence</i>	보루네오	연갈색
카나리커라툼	<i>canaliculatum</i>	오스트레일리아	갈색, 녹황색
코크레리	<i>cochleare</i>	시킵, 아셈	
데보니아넘	<i>devonianum</i>	인도, 네팔, 부탄, 타이	황색, 연자색
데이아넘	<i>dayanum</i>	수마트라, 세르베스	백색, 붉은선
에버니움	<i>eburneum</i>	인도, 히말라야, 미얀마, 남중국	백색
엘레강스	<i>elegans</i>	인도 북부	연황, 분홍
에롱가텀	<i>elongatum</i>	말레시아 동부	녹갈색
건란	<i>ensifolium</i>	중국, 일본, 미얀마	녹갈색, 적색선
에리트로스틸럼	<i>erythrostylum</i>	베트남, 네팔, 인도, 부탄, 중국	백색
훼브리	<i>faberi</i>	네팔, 인도, 중국 (지나 춘란)	녹갈색
휠레이소니아넘	<i>finlaysonianum</i>	수마트라, 말레시아, 베트남	연황, 적갈색선
금릉변	<i>floribundum</i>	중국, 대만 (= <i>pumilum</i> )	녹색, 황갈색
기간테움	<i>giganteum</i>	인도네시아, 히말라야, 중국	황록색, 적갈색줄
춘란	<i>viresens</i>	일본, 한국 (= <i>goeringii</i> )	녹색
그랜드후로럼	<i>grandiflorum</i>	히말라야, 중국	녹색, 녹황색
하티나히아넘	<i>hartinahianum</i>	수마트라	녹색
후케리아넘	<i>hookerianum</i>	인도, 히말라야, 부탄, 중국	녹색, 녹황색
아이안소니	<i>i'ansoni</i>	미얀마, 안난	황갈색
인시그네	<i>insigne</i>	베트남	연자색
이리디오드스	<i>iridiodes</i>	네팔, 인도, 부탄, 미얀마	연갈색
한란	<i>kanran</i>	대만, 한국, 일본, 중국	녹색, 적갈색
란시폴리움	<i>lancifolium</i>	인도, 일본, 중국	연록색
롱기폴리움	<i>longifolium</i>	인도, 히말라야	연황~ 진황색
로위아넘	<i>lowianum</i>	미얀마, 타이, 중국	녹황색, 갈색줄
마디툼	<i>madidum</i>	오스트레일리아	녹색, 황갈색
마스테르시	<i>mastersii</i>	인도, 미얀마, 타이	연녹색, 백색
파리쉬	<i>parishii</i>	미얀마	백색

**Table 2** Important characteristics of main original cultivars in *Cymbidium* plants (continued)

	Species	Main origin region	Flower color
렉툼	<i>rectum</i>	말레시아 동서부	황갈색, 복륜
산드레	<i>sanderæ</i>	베트남	백색
시그모이데움	<i>sigmoideum</i>	자바, 수마트라	진갈색
시넨스	<i>sinense</i>	히말라야, 대만, 중국, 일본	황색, 적갈색선
수아브	<i>suave</i>	오스트레일리아 동부	녹갈색
수아비시뎀	<i>suavissimum</i>	미얀마 북부	흑갈색, 연갈색
티그리넘	<i>tigrinum</i>	태국, 인도, 미얀마	녹갈색, 적갈색줄
트래시아넘	<i>tracyanum</i>	미얀마	황록색, 적갈색줄
화이트	<i>whiteae</i>	인도	황록색, 적갈색점
윌소니	<i>wilsonii</i>	중국 남부	갈색

실정이다. 심비디움의 화색은 클로로필, 안토시아닌 등 기타 색소 등으로 구성되어있다. 녹색꽃은 클로로필을 함유하고 있어서 광합성이 가능하며, 안토시아닌의 발현은 우성유전자로 알려져 있다. 백색의 *Cym. lowianum* var. 'Concolor', *Cym. insigne album*, *Cym. ebumeum*과 녹색의 *Cym. sinense*과 *Cym. ensifolium* 등의 원종은 안토시아닌이 적은 것으로 보고되었다. *lowianum* var. 'Concolor' 와 기타 다른 백색 품종은 유전적 구성이 확실하게 관계가 있어, 이들 간 교잡종은 유사한 색이 만들어질 것으로 예상하였다. 한편 *lowianum* var. 'Concolor'는 1개 또는 2개의 유색친과의 교배에서 흰색 9개와 유색 38개로 약 1:3 비율의 교잡종으로 구성되었다. 심비디움 설판의 색과 모양의 변화는 어느 종의 유전적 지배를 받는지 확인되지 않았으며 또한 개체 내에서도 유전적인 변화가 있기 때문에 복잡하다 (Ichihashi 1991).

### 심비디움 주요 육종기술

#### 배수체 육종

난류는 다른 작물에 비하면 배수체를 유기하는데 용이하고 배수성의 특징이 꽃과 식물체에 나타나기 때문에 배수성 이용에 의한 육종이 실용적으로 이용되고 있는 것이 많다 (Wimber et al. 1987). 1947년에 교잡된 난에 콜히친을 처리하여 염색체의 배가로 꽃의 크기가 증가되고 화색이 선명해지며 꽃수가 증가되었다는 결과를 보고한 이래 많은 연구가 계속되었다 (Moore 1947). 배수체 (2배체 이상)의 특성은 대체로 2배체에 비해 생육이 왕성하고 꽃이 커지며 향기가 짙어지는 것이 많다. 또한 3배체에는 우수한 꽃이 많아 육종단계로 많이 이용되고 있으며 (Griesbach 1985) 중간 교배로 얻은 후대의 임성을 회복하는 등 그 유용성은 매우 큰 것으로 알려져 있다 (Wimber et al. 1987). 우리나라에서는 심비디움의 PLB를 이용해 기내에서 콜히친을 처리하여 배가체를 얻은 것을 보고하였다 (Kim et al. 1997).

한편, 동·서양란 교잡종은 향기가 있으나 꽃의 크기와 초세가 비교적 작은 것이 많아 중, 대형종과 절화용으로 이용하기에 부적합한 것이 많으며 서양란 심비디움은 극도로 교잡이 심해서 우수한 품종가운데 유전적으로 불안정한 이수체 상태에 있고 이러한 품종이 불임성을 가지고 있기 때문에 신품종 육성을 위한 교잡육종에 어려움이 많다 (Macleod 1947).

배가체의 확인은 주로 근단을 이용하고 있으나, 신선한 근단을 채취하기가 쉽지 않고, 근단이 채취된 어린 식물체는 생육이 느리다. 또한, 배가체의 확인과정이 복잡하고 시간이 많이 걸려 인위적인 배수성 육종의 어려운 문제점이 있다. 요즘은 백합을 비롯한 많은 화훼류에서 세포분석기(배수성 판정기)를 이용하여 배수성 확인을 하고 있다 (김원진 et al. 2001).

#### 교잡육종

새로운 품종을 만들기 위한 교배조합 작성에 앞서 육종의 목표를 뚜렷하게 설정해야 한다. 우선, 화색, 화형이 우수한 특성을 가지고 있어야 하고 여기에 특정품종이 가지고 있는 단점의 개선, 예를 들면 반직립성의 엽형, 고온적응성, 또는 긴 분화수명 등과 같은 육종목표가 반드시 필요하다. 심비디움의 주요 육종목표는 새로운 화색 창출과 엽형, 내병성, 내서성 등 생육이 강건한 품종 개발이다. 심비디움의 주요 육종목표는 다음과 같다. ① 미와 경제성, ② 화색, 꽃의 수명, 생산성(단위면적당, 1주당 생산가능본), 내서성, 내병성, 내음성, 조생성 ③ 개화형태 (standard → standard, achytype) ④ 개화시기: 작형 다양화 (겨울 → 봄, 가을), ④ 분화 수명 및 상품성 증대.

### 심비디움 육종과정

#### 종자파종 및 계통양성

심비디움 교배 후 꼬투리 성숙과정은 Fig. 2에 나타나 있

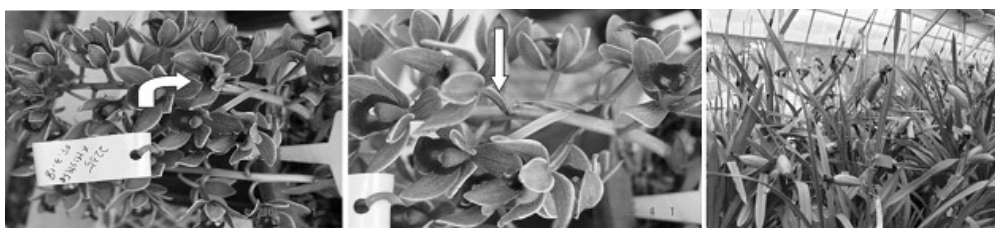


Fig. 2 Mature process of pod after cross-hybridization in *Cymbidium* plants



Fig. 3 Seeding *in vitro* and germination process in *Cymbidium* plants

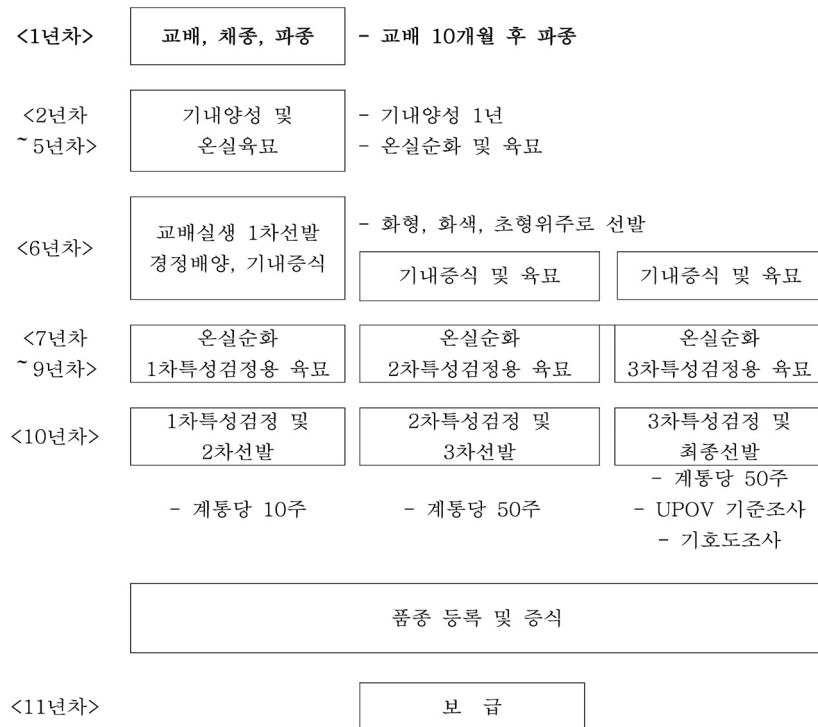


Fig. 4 General breeding process using tissue culture technique in *Cymbidium* plants

는데, 종자는 교배 후 6~8개월이 지나야 파종이 가능하다. 난 종자는 배와 종피로만 구성되어 있고 배유가 없는 종자(무배유종자)이기 때문에 일반작물의 종자파종과는 다르다. 난 종자는 자연상태에서 난균(마이코리자균, Mycorrhiza)이 분해한 양분을 사용하여 발아한다. 난 종자 파종을 기내무균파종이라 하기도 하는데, 이유는 인공적으로 난종자를 파종할 때 난균 대신 무기물 성분(하이포넥스 등)을 일정비율로 조합하여 토양대신 배지를 만들어 사용하기 때문이다. 이외에도 미숙한 배를 배양한다는 의미로 미숙 배배양이라고도 한다. 따라서 난 육종을 하기 위해서는 종자파종을 위한 각종 무균배양시설 및 기구가 갖추어져 있어야 한다. 종자파종은 터지기 전의 꼬투리를 채종한 후, 파종한다. 파종 이후부터 발아에 소요되는 기간은 약 10개월~1년 정도 소요된다. 심비디움

종자 발아과정은 Figure 3에 나타나 있다. 보통 교배 조합당 일정량의 개체를 양성하고 생육단계별 생육상태를 점검하면서 도태시킨다. 계통선발은 각 교배조합(종자묘)들로부터 목표로 하는 화형, 화색, 초세 등이 우수하고 생육도 빠르고 병해충에 강한 주를 선발한다.

특성검정 및 품종화

실생계통 가운데 생육 및 개화특성이 우수한 개체를 선발하면 이 개체의 생육 및 개화특성이 균일하게 발현되는지 그리고 병해 등 환경적응성이 강한 개체 그리고 형질이 균일하게 발현여부를 검정하기 위해 일정량의 동일한 개체를 조직배양하여 증식한 다음 생육특성과 개화특성을 조사하여야 하는데 이를 특성검정이라 한다. 이러

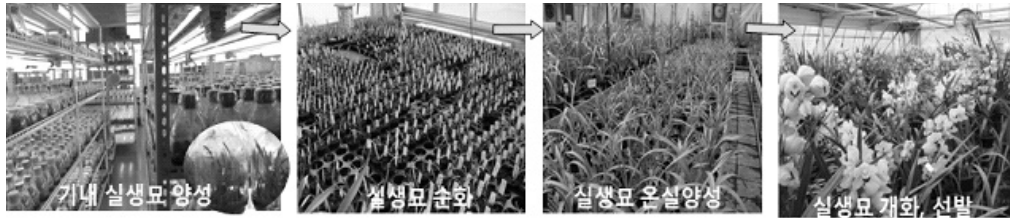


Fig. 5 Characterization screening for elite lines via tissue culture in *Cymbidium* plants

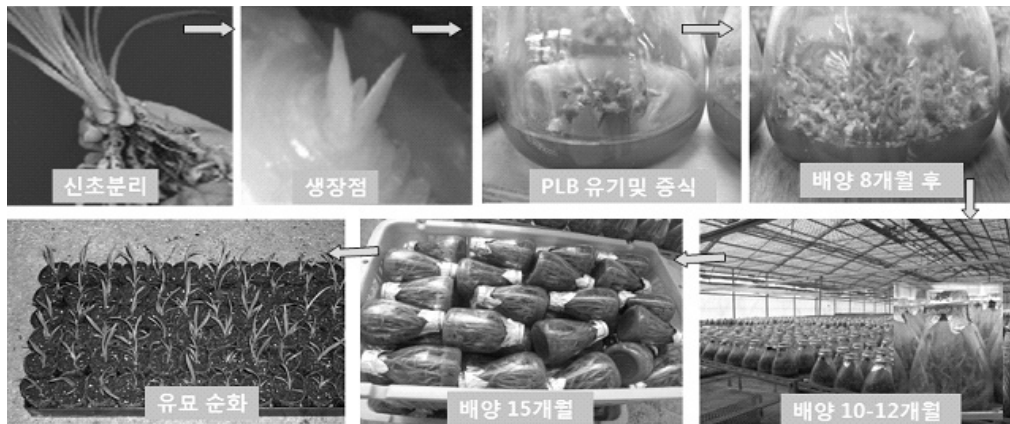


Fig. 6 Production of *Cymbidium* plantlets through meristem culture

한 특성검정은 선발을 포함해 3회에 걸쳐 실시하며 최종적으로 우수한 계통은 선발하여 품종화 한다 (Fig. 4).

### 심비디움 육종 향후 전망

현재까지 심비디움 육종은 주요 수출국인 중국인의 기호에 맞는 화색, 화형 및 초형을 최고의 육종목표로 설정하여 수행해 왔으나, 수출국의 다변화를 위해 유럽형의 화색, 화형 등 다양한 소비자를 대상으로 하는 육종프로그램이 필요하다. 지금은 주요 소비형태가 스탠다드형이지만 아취형 (현애형), 꽃의 양적 형질, 예를 들어 분화수명이 길고 상품성이 길게 유지되는 품종, 우리나라에서 여름철 고온을 잘 견디는 내서성 품종, 병, 충해에 강한 내병성 육종 등의 육종이 필요하다. 또한 10년 정도로 장기간 소요되는 육종기간의 단축과 교배육종법을 보완한 육종효율 증진과 유전공학 기법 적용에 의한 목적형 형질 도입 등 다양한 품종 개발이 필요하다.

### 심비디움 조직배양 및 형질전환 연구

#### 심비디움 조직배양

난과 식물의 번식방법은 종자번식 (유성번식)과 영양번

식 (무성번식)으로 크게 구분된다. 전자의 종자번식방법은 교배를 통한 신품종을 육성하거나 모본의 유전자 조성이 균일할 경우 대량생산에 적용할 수 있다. 후자의 영양번식 방법은 모주로부터 신초를 분리하여 번식하는 분주번식과 식물의 성장점, 잎, 화기 등 기관의 조직을 일부 떼어 배양을 통해 번식하는 조직배양으로 구분된다. 심비디움은 수많은 교잡에 의해 품종화 되어 유전적으로 불균일하기 때문에 상업적 생산의 경우, 영양번식 방법 중 성장점 (또는 경정)을 배양하여 대량으로 증식하는 조직배양기법을 적용한다 (Fig. 5). 이와 같은 증식방법은 심비디움 뿐만 아니라 대부분의 난과 식물에서 적용되며 종류에 따라 배양부위, 따라 배지, 배양환경 등 배양방법이 조금씩 차이가 있다.

육종과정에서 최종적으로 선발된 계통을 품종화하고 상업적인 대량생산을 위해서는 전문적인 조직배양기술과 관련된 시설 및 기구 그리고 우량 조직배양묘에 대한 검정 및 사후인증제도 등이 반드시 필요하다. 이 중 주로 심비디움 우량묘의 번식에 사용되는 성장점 배양기술은 심비디움의 분열조직을 의미하는 것으로 심비디움의 성장점은 새싹의 정단부와 목은 벌브 (위구경)의 눈에서 적출해낼 수 있다. 이러한 성장점 배양을 통해 우량 심비디움 종묘를 비교적 유전적으로 균일하게 생산할 수 있다 (Fig. 6).

**Table 3** A review of tissue culture in *Cymbidium* plants

Type of regeneration plant	Explant	Explant production rate (%)	Regeneration rate (%)	Acclimatization rate (%)	Reference
<i>ensifolium</i>	Callus	40 (rhizome) 100 (pseudobulb) 25 (root)	-	-	Chang and Chang (1998)
<i>aloifolium</i> (L.) Sw.	Rhizome	85.6 ± 2.45	91.5	83	Nayak et al. (1998)
<i>ensifolium</i> var. <i>misericors</i>	Callus-derived rhizomes	-	80	-	Chang and Chang (2000)
Twilight Moon 'Day Light'	Callus	50	90.7	100	Huan et al. (2004)
<i>faberi</i>	Immature seeds	90	90	-	Chen et al. (2005)
Twilight Moon 'Day Light'	PLB and Callus	96.4 and 6.1 (PLB), 100 and 31 (callus)	-	100	Teixeira da Silva and Tanaka. (2006)
Twilight Moon 'Day Light'	PLB and callus	96.4 and 6.1	-	100	Teixeira da Silva et al. (2006)
<i>findlaysonianum</i> Lindl.	Seed	93.6	50-70	70	Tawaro et al. (2008)
<i>giganteum</i>	Seed	100	-	95	Hossain et al. (2010)

심비디움에 있어서 체세포 변이가 발생하지 않는 효율적인 조직배양 체계의 개발은 상업적으로 가능성 있는 우수 품종 개발 시 또는 우량 유전자원 보존과 증식에 있어서 가장 시급히 해결해야 할 과제이다. Morel (1960)이 심비디움 경정조직을 이용해서 조직배양을 시도한 이래로 화경, 위구경, 화아, 경정, PLB (protocorm-like body) 등을 이용하여 조직배양 연구결과가 나와 있다 (Teixeira da Silva and Tanaka 2006). 현재까지 보고된 심비디움 조직배양 연구사례는 Table 3에 요약이 되어 있는데, 절편체는 미성숙 종자, 라이좀 및 callus 등이 주로 이용되었으나, 최근에는 비교적 배양이 쉬운 protocorm-like bodies (PLB)를 사용하고 있는 실정이다.

심비디움 조직배양에 대해 좀 더 살펴보면 화경을 이용한 조직배양 (Wang 1988)을 시작으로 위구경 (Shimasaki and Uemoto 1990), 화아 (Shimasaki and Uemoto 1991), shoot tip (Morel 1960, 1964; Wimber 1963; Ueda and Torikata 1968; Kim and Kako 1984) 그리고 PLBs (Begum et al. 1994a; Huan and Tanaka 2004a, 2004b; Huan et al. 2004)를 이용한 조직배양에 대한 기록이 보고 되었다. 난과식물 조직배양에서 PLB는 Morel (1960)에 의해 첫번째로 사용된 절편체인데, 원과체와 비슷하지만 기내에서 절편체 또는 캘러스에 의해 형성되는 구조이고, 여기서 발생하는 성장점이나 PLB를 사용하여 심비디움의 미세번식이 가능하였다는 기록이 있다 (Wimber 1963; Sagawa et al. 1966; Ueda and Torikata 1968; Wang 1988; Nayak et al. 2002). 또한 심

비디움의 callus 유도는 PLB의 내부 조직으로부터 유도되었지만 생장이 매우 느리고 괴저성 때문에 2차 배양은 되지 않고 갈색으로 변하였으며 2개월 안에 고사하였다 (Begum et al. 1994a). 이후 Chang and Chang (1998)은 자생란인 *cymbidium ensifolium*을 사용하여 위인경, 근경과 뿌리 절편체로부터 callus를 얻는데 성공하였고, 계대배양하여 callus로부터 식물체가 재분화 되었다는 기록이 있다. 난초과에서 PLB를 통해 callus가 생성되어 식물 재분화까지 이루어지는 이 과정은 체세포 배발생을 통해 좋은 결과를 얻을 수 있었다 (Begum et al. 1994b; Steward and Mapes 1971; Ishii et al. 1998). 그러나 난초과에서 체세포배에 대한 기록은 잘 알려져 있지 않다 (Begum et al. 1994a; Steward and Mapes 1971).

이러한 난과 식물의 조직배양 방법에는 성장점배양 (shoot meristem culture; Morel 1960, 1964)과 정단배양 (shoot-tip culture; Wimber 1963) 방법이 있다. 먼저 성장점배양 방법은 위구경 (pseudo bulb)의 눈으로부터 채취한 성장점을 이용하여 배양하는 방법으로 위구경으로부터 눈을 채취하기 위해 눈 주위의 잎을 모두 제거한 후 눈을 덮고 있는 잎을 세로로 절반 절단한 다음 살균하고 잎을 하나씩 제거한 후 엽원기가 1~2매 부착된 반구형의 성장점을 노출시킨 후 성장점의 기부를 절단하고 분리하여 배지에 배양한다. 배양 1~2개월 이내 절편체가 1~2 mm의 크기로 성장하여 PLB를 형성하고, 점점 녹색으로 변하여 rhizome과 엽원기를 형성하는데, 이 시기에 2~4등분하여 계대배양하면 다수의 PLB를 얻을 수 있다. 계대배양한 PLB는 1개월 이내에 다시 PLB를 형성하기도 하고, PLB에서 식



물체로 분화된다 (Fig. 7). 또 다른 방법인 정단배양 방법은 3 cm 정도 성장한 신초를 사용하여 가장 외측 잎을 제거하고 멸균수에 소독한 다음 클린벤치 내에서 외과용 메스와 핀셋을 이용하여 성장점이 노출되도록 하고 나머지 잎은 제거한다. 이때 얻은 성장점을 가급적 빠른 시간 내에 배지에 배양한다. 배지에 배양한 후 1주일 내에 절편체가 급속히 성장하여 녹색을 띠게 되고, 1개월 이내에 PLB를 형성하게 된다. 이 PLB가 약 4 mm로 성장하면 분화가 일어난다. 만약 진탕배양을 하게 된다면 신초가 분화되는 대신 PLB가 증식되고 크기에 따라 분리하여 계대배양 할 수 있다. PLB를 고체 배지에 이식하고 10주간 배양하면 유식물체를 얻을 수 있다 (김원진 et al. 2001).

PLB 절편체 위치인 thin cross sections (TCSs) 또는 thin cell layers (TCLs)에 따른 배양 방법 비교 실험이 이루어졌으나, shoot tip을 제거한 PLB에서 가장 효율이 좋은 결과가 보고되었다 (Teixeira da Silva and Tanaka 2006;

Teixeira da Silva et al. 2006).

따라서 본 연구진은 PLB를 사용하여 조직배양 실험을

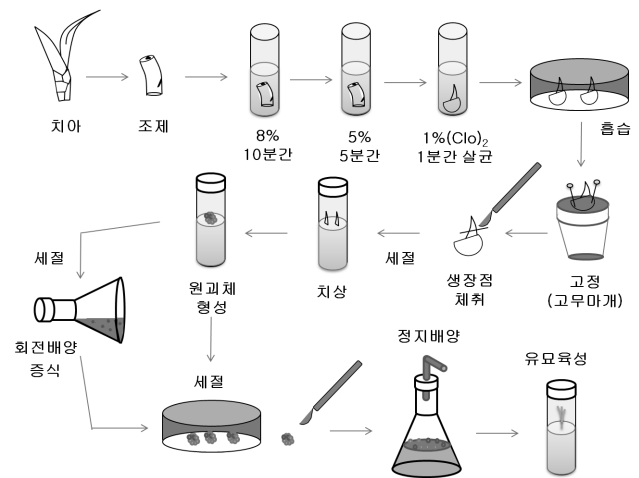


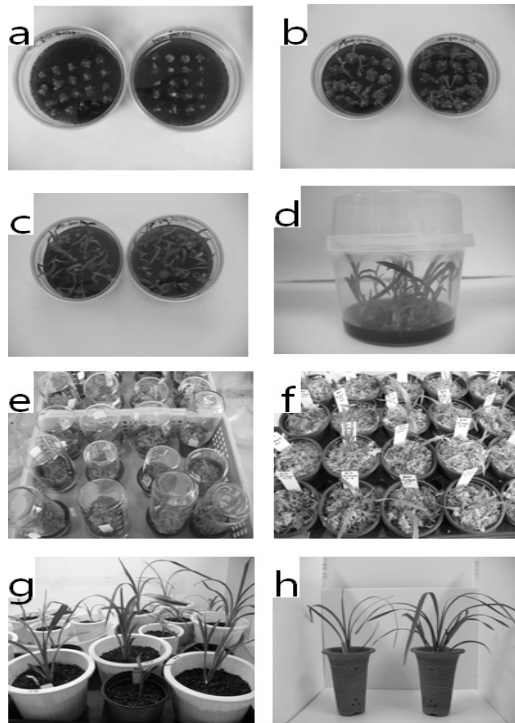
Fig. 7 Meristem culture process in *Cymbidium* plants

Table 4 The composition of the media used in the process of tissue culture and genetic transformation in *Cymbidium* plants

Media	Plant tissue culture media component	<i>Agrobacterium</i> media component	Particle bombardment media component
	HCa		
Basal medium	hyponex 3 g tryton 1.5 g CaNO <sub>3</sub> 0.5 g sucrose 20 g charcoal 1 g agar 7.5 g pH 5.2	HCa	HCa
<i>Agrobacterium</i> culture		YEP peptone 10 g NaCl 5g yeast extract 10 g pH 7.5	
<i>Agrobacterium</i> washing		Washing medium MS powder 4.4 g sucrose 30g BA 500 mg pH 5.8	
<i>Agrobacterium</i> infection		MS <sup>1</sup> (Liquid) MS powder 4.4 g sucrose 30 g pH 5.8	
Cocultivation		HCa +acetosyringone 100 μM	
Delayed selection medium		HCa +cefotaxime 200 mg	HCa
Selection medium		HCa +cefotaxime 200 mg +PPT <sup>2</sup> 5 mg	HCa +PPT 5 mg
Plant regeneration medium		HCa +cefotaxime 200 mg	HCa

<sup>1</sup>MS (Murashige and Skoog 1962)

<sup>2</sup>PPT (DL-Phosphinothricin)



**Fig. 8** Regeneration process from PLB tissues of *Cymbidium* plants. (a) Protocorm-like bodies (PLBs) of *Cymbidium* on HCa medium, (b) PLB growth with shoot formation 6 weeks after tissue culture, (c) PLB growth with shoot elongation 14 weeks after tissue culture, (d) Regeneration of *in vitro* *Cymbidium* plants 5-6 months after culture, (e) Acclimatization of *Cymbidium* plants (6 months after culture), (f) Growth of *Cymbidium* plants 1 month after acclimatization, (g) Growth of *Cymbidium* plants 4-6 months after acclimatization, (h) Growth of *Cymbidium* plants 12 months after acclimatization

수행하였고, 사용 배지는 기본 HCa 배지를 사용하였다 (Table 4). 기본 HCa 배지에 심비디움 PLB를 치상하였고 (Fig. 8a), 6주 이내에 shoot가 발생하였다 (Fig. 8b). 8주 후에는 소식물체로 증식하였고 (Fig. 8c), 처음 PLB 증식에서부터 6개월 이내에 순화가 가능한 크기까지 증식하였다 (Fig. 8d). 이 후 심비디움 식물체는 약 7~10일간 유리 비커를 이용하여 순화 기간을 갖고 (Fig. 8e), 작은 화분에서 시작하여 (Fig. 8f) 순화 1년 후에는 중간 화분으로 옮겨주었으며 (Fig. 8g), 그 이후에는 가장 큰 화분으로 옮겨주었다 (Fig. 8h). 기내 조직배양 시 계대배양은 한 달에 한번 씩 수행하였고, 순화 후 약 7~10일에 한번 씩 관수하였다.

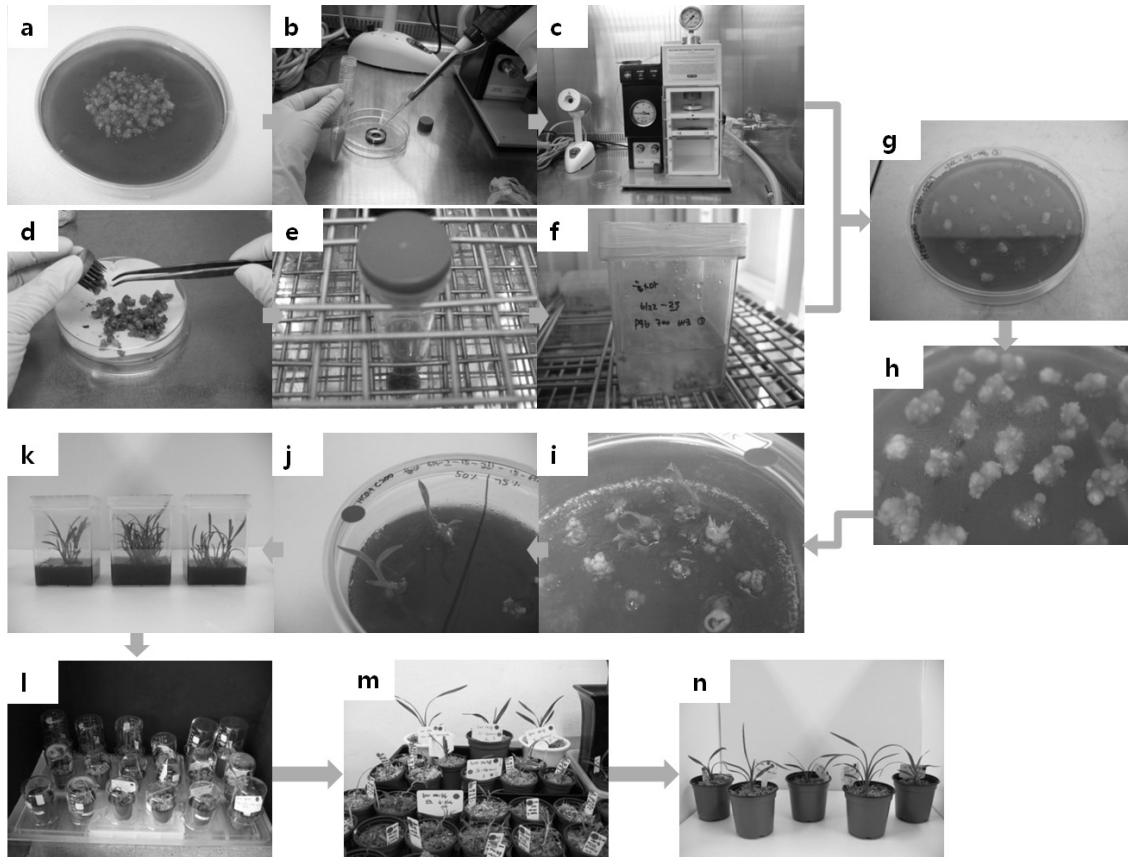
### 심비디움 형질전환

심비디움의 안정적인 형질전환은 춘란 (*Cymbidium virensence*) 종자를 기내에서 발아시켜 얻은 rhizome에 외래 유전자를 직접 도입시키는 방법으로 1996년에 처음 보고되었고 (Hong et al. 1996), 유전자 총 실험에 사용된 rhizome을 2개월 동안 kanamycin-free 배지에서 배양하였고 3개월 이

내에 조그마한 rhizome을 얻을 수 있었다. 이때 얻은 rhizome은 100 mg/l kanamycin이 들어간 배지에서 선발하여 살아남은 rhizome을 *npt II* 유전자가 도입된 형질전환체로 추정하였다. Rhizome 절편체의 GUS 발현을 확인한 결과 72.2%의 효율을 보였고, PCR 분석을 통해 *npt II* 유전자의 삽입을 확인할 수 있었다. 이후 Yang et al. (1999)에서는 심비디움의 PLB를 이용하여 gold particle 종류 및 gas pressures별 차이, 고체배지와 액체배지의 차이점에 관한 실험을 수행하였다. 그 결과 유전자 총 실험 전 7~10일 동안 액체배지에서 pre-culture 후, 다시 액체배지에서 1개월간 배양한 경우, 고체배지를 사용한 식물체보다 약 2배 정도 더 효과가 있었다. 또한 0.6  $\mu$ m gold size에서 GUS 발현이 87%로 가장 높게 나타났고, PCR 및 Southern blot 분석을 통해 *npt II* 유전자가 삽입되었음을 확인할 수 있었다. 이 연구보고에서 유전자총 실험에 사용한 600개의 PLB 중 kanamycin을 이용한 선발을 통해 92개의 형질전환 식물체 (28%)를 얻을 수 있었고, 이들 중 52개를 사용하여 GUS 발현을 확인한 결과 69%의 shoot에서 GUS 발현이 확인되었다.

Chin et al. (2007)에서는 심비디움의 PLB를 사용하여 hygromycin 저항성을 가진 형질전환 식물체의 생산이 보고되었다. 이 실험에서는 20 mg/l hygromycin이 첨가된 배지에서 선발하였고, 100  $\mu$ M acetosyringone (AS)이 첨가된 접종 및 공동배양 배지를 사용하였을 때 형질전환 효율이 증가하였다. GUS 발현을 통해 90% 이상의 효율을 보였고, PCR과 Southern blot 분석을 통해 *gus* 유전자와 *hpt* 유전자의 삽입이 확인되었다. 또한 30 g/l sucrose가 첨가된 배지에서 증식한 PLB에서 더 높은 형질전환 효율 및 *Agrobacterium*의 overgrowth를 줄이는 역할을 하였고, 형질전환 실험 시 100  $\mu$ M AS가 첨가된 배지를 사용하였을 때 형질전환 효율을 증가시키는 역할을 한다는 연구 결과를 얻을 수 있었다.

한편, 본 연구진은 PLB를 사용하여 유전자 총 실험과 *Agrobacterium*을 이용한 실험을 수행하였다. 먼저 유전자 총 실험에서 사용한 배지 조성은 Table 4에서 언급하였고, 심비디움 PLB는 실험 2일 전에 기본 증식배지인 HCa 배지에서 직경 4 cm의 원모양으로 치상하여 준비하였다 (Fig. 9a). 미리 준비된 유전자가 코팅된 gold를 사용하여 실험을 수행하였으며 (Fig. 9b), 유전자총 실험은 biolistic particle delivery system (PDS-1000/He, Bio-rad, USA)을 사용하여 사출거리 6 cm, 1회 shooting 한 후 3주간 PPT-free 배지에서 선발배지에서 배양 하기 전 지연기간을 거쳤다 (Fig. 9c, g, h). 이후 PPT 5 mg/l가 첨가되어 있는 HCa 선발배지에서 약 8-10주간 선발하였고 (Fig. 9i), 5 mg/l PPT에서 살아남은 식물체만 골라낸 후 (Fig. 9j), 항생제가 없는 HCa 배지로 옮겨 재분화를 유도하였다 (Fig. 9k). 이후 화분으로 옮겨 심어 순화시켰고 (Fig. 9l), 이때 얻은 식물체



**Fig. 9** Production of transgenic plants from *Cymbidium* PLBs

(a) Pre-culture of *Cymbidium* PLB (2 days), (b) Prepare of gold particle for transformation, (c) Particle bombardment experiment, (d) Needle treatment for *Agrobacterium tumefaciens* transformation, (e) *Agrobacterium* infection, (f) Washing step, (g) Delayed selection time (3 weeks), (h) PLB selection (5 mg/l PPT), (i) Transgenic shoot selection (5 mg/l PPT), (j) Regeneration of putative transgenic plantlets, (k) Growing of putative transgenic plants, (l) Acclimatization of transgenic plants, (m) Growth of transgenic plants after acclimatization, (n) Transgenic *Cymbidium* plants established in pot

들이 활착되어 심비디움 형질전환 식물체를 생산하였다 (Fig. 9m, n).

아그로박테리움 실험에서는 심비디움 PLB를 사용하여 *Agrobacterium* 접종 2일 전에 식물체를 준비하여 HCa 배지에서 배양한 후, 실험 당일 침봉 처리를 수행하였다 (Fig. 9d). 침봉 처리를 완료하고, 접종 용액에 20분 접종한 후, (Fig. 9e), AS 100  $\mu$ M이 첨가되어 있는 HCa 배지에서 3일간 공동배양 시킨 후 수세하였고 PPT-free 배지에서 3주간 지연선택기간을 주었다 (Fig. 9f, g, h). 이후 유전자 총을 이용한 실험에서와 같이 5 mg/l PPT가 함유된 HCa 배지에서 약 8-10주간 배양하면서 살아남은 식물체를 선발하였고 (Fig. 9i), 선발된 식물체는 cefotaxime 200 mg/l만 들어있는 HCa 배지로 옮겨 재분화를 유도하였다 (Fig. 9j, k). 각각에 사용된 배지 조성은 Table 4에서 언급하였다. 이렇게 얻은 식물체는 수태를 사용하여 7~10일 동안 순화시킨 후 (Fig. 9l), 제초제 저항성을 가진 형질전환 심비디움을 생산하였다 (Fig. 9m, n). 이와 같은 연구 결과를 토대로 수립된 형질전환체계를 이용하여 수량 증

대 및 환경 복합 저항성을 가진 형질전환 심비디움 식물체를 제조하여 그 특성을 분석하고 있다. 그러나 형질전환 심비디움 식물체 개발 관련 학술지 발표는 최근 20년간 5편 내외로 미미한 결과를 보이고 있기 때문에, 보다 안정적인 형질전환 방법을 확립하고자 더 많은 연구가 필요할 것으로 판단된다.

### 결론

최근 많은 원예작물 중 난과 식물, 그중 특히 심비디움에 대한 수요가 높아지고 있으며, 이에 대한 소비자의 요구를 만족시키는 다양하고 우수한 형질을 가진 심비디움 품종개발이 필요한 실정이다. 기존의 심비디움 육종은 교배선발, 콜히친 처리를 이용한 염색체 배가법 그리고 돌연변이 등의 고전적인 육종기술에 의해 이루어졌으나, 다른 작물에서의 경우와 마찬가지로 개화기까지 오랜 시간이 요구되고, 유용 형질을 가진 유전자원의 고갈 그리

고 바이러스, 향기 및 복합 환경적응성 등 고전육종기술로 품종개량이 어려운 형질의 품종개량을 이루기 위해서는 형질전환 기술 도입이 필요한 상황이다. 또한 심비디움 우수품종을 증식하는 과정에서 성장점 배양이 주로 이용되나, PLB나 rhizome같은 절편체로부터 체계화된 식물체 재분화 시스템을 개발하게 되면 향후 식물형질전환 기술을 이용한 우수 계통생산에 적용이 가능하리라 판단된다. 이 외에도 우수 계통을 선발하여 품종을 개발하는 것도 중요하지만 그에 못지않게, 조직배양으로 대량 증식된 우량 심비디움 묘와 그 생산체계에 대한 인증제도 등도 필요하다고 할 수 있다.

심비디움 형질전환에 있어서도 형질전환 논문이 최근 10년간 10여편 이상 보고된 팔레놉시스와는 달리 심비디움 형질전환은 20여 년간 겨우 4~5편에 불과한 실정이다. 좀 더 고효율 그리고 변이개체가 최소로 발생하는 재분화 체계가 확립되고 나면 보다 활발한 심비디움 형질전환 개체 생산에 관한 연구가 진행되리라고 전망된다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 농업공동연구사업 (과제번호: PJ006950201008) 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

김 원진 외 25인 (2001) 화훼육종기술, 농촌진흥청 원예연구소, 수원 pp. 229-239

Begum AA, M Tamaki, S Kako (1994a) Formation of protocorm-like bodies (PLBs) and shoot development through *in vitro* culture of outer tissue of *Cymbidium* PLB. J Jpn Soc Hort Sci 63:663-673

Begum AA, M Tamaki, M Tahara, S Kako (1994b) Somatic embryogenesis in *Cymbidium* through *in vitro* culture of inner tissue of protocorm-like bodies. J Jpn Soc Hort Sci 63:419-427

Chang C, Chang WC (1998) Plant regeneration from callus culture of *Cymbidium ensifolium* var. *misericors*. Plant Cell Rep 17:251-255

Chang C, Chang WC (2000) Micropropagation of *cymbidium ensifolium* var. *Misericors* through callus-derived rhizomes. In Vitro Cell Dev Biol Plant 36:517-520

Chen YQ, Liu Xiao, Liu Youqi (2005) *In vitro* plant regeneration from the immature seeds of *Cymbidium faberi*. Plant Cell Tiss Org Cult 81:247-251

Chin DP, KI Mishiba, M Mii (2007) *Agrobacterium*-mediated transformation of protocorm-like bodies in *Cymbidium*. Plant Cell Rep 26:735-743

Coker, J (1993) The genus *Cymbidium*. In: Gallagher, D., M. Hewitt, and C. Jennings. Australian orchid growing. Australian Orchid Council Inc, Australia

Du Puy D, Cribb P (1988) The classification of *Cymbidium*. P. 50-194. In: D. Du Puy and P. Cribb(eds.). Timber Press, Oregon, USA

Griesbach RJ (1985) Polyploidy in orchid improvement. Amer Orchid Soc Bull 54(10): 1445~1451

Guest G, S Guest. (1996) More *Cymbidiums*. Guest Orchids, Australia

Hong KA, So IS, Lee OK, Cheong CD, Riu KZ, U ZK (1996) Optimization of *Cymbidium* transformation system by the particle gun techniques. Agri Chemi Biotechnol 39(4): 260-264

Hossain M.M., Madhu Sharma, Jaime A. Teixeira da Silva, Promila Pathak (2010) Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. Sci Hort 123:479-487

Huan LVT, Tanaka M (2004a) Callus induction from protocorm-like body segments and plant regeneration in *Cymbidium* (Orchidaceae). J Hort Sci Biotech 79:406-410

Huan LVT, Tanaka M (2004b) Effects of red and blue light emitting diodes on callus induction, callus proliferation, and protocorm-like body formation from callus in *Cymbidium* orchid. Environ Control Biol 42:57-64

Huan Le Van Tuong, Takamura T, Tanaka M (2004) Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. Plant Sci 166:1443-449

Hugo F. 1979. New horizons in orchid breeding. Day printing Co. California, USA

Ichihashi S (1991) Orchid biology reviews and perspectives. printed in Japan, pp. 136-137

Ishii Y, T Takamura, M Goi, M Tanaka (1998) Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. Plant Cell Rep 17:446-450

Kim KW, Kako S (1984) Morphological and histological studies on protocorm-like bodies formation and explant development in the *Cymbidium* shoot apex culture *in vitro*. J Kor Soc Hort Sci 25:156-163

Kim MS, JY Won, CH Song, JS Eun, DW Lee (1997) polyploidy induction of *Cymbidium* kanran by treatment of colchicine *in vitro*. RDA J Hort Sci 39(1):73-76

Kim MS, YR Lee, MI Jung, JS Song, JY Kim (2006a) A new *Cymbidium* hybrid 'Beauty Princess' with red purple petals and medium plant size. Korean J Breed 38:205-206

Kim MS, YR Lee, MI Jung, JY Kim, DW Lee (2006b) A new *Cymbidium* hybrid 'Bright Lemon' with yellow petals and fragrance. Korean J Breed 38:207-208

Kim MS, YR Lee, MI Jung, JY Kim, JS Song (2007) A new *Cymbidium* hybrid 'Bright Evening' with brownish yellow

- petals. Korean J Breed 39:389-390
- Kim MS, HR Cho, HK Lee, JH Lim, SY Choi, YJ Kim (2008a) *Cymbidium* ‘Honey Girl’ with white color and medium-sized plant. Flower Res J 16:291-294
- Kim MS, HR Cho, HK Lee, JH Lim, SY Choi, YJ Kim (2008b) A New cultivar *Cymbidium* ‘White Princess’ with white color and vigorous growth. Flower Res J 16:295-298
- Kim MS, HR Cho, HK Lee, JH Lim, YR Lee, HK Shin (2009) New *Cymbidium* variety ‘Yellow Evening’ with brownish yellow flower color on red spot lip and medium plant. Kor J Breed 41:358-362
- Kim MS, Jung MI, Lee YR (2010) *Cymbidium* hybrid ‘Purple Princess’ with dark purple color. Kor J Hort Sci Technol 28(4):715-718
- Macleod RA (1947) Some effects of colchicine on orchids. Amer Orchid Soc Bull 16:336-337
- Ministry of Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (MIFAFF) (2009) The present status of cultivation in flower crops
- Moore ET (1947) The use of colchicine in orchids. Amer Orchid Soc Bull 16:512-513
- Morel GM (1960) Producing virus-free *Cymbidium*, Amer Orchid Soc Bull 29:495-497
- Morel GM (1964) Tissue culture-a new means of clonal propagation of orchids, Amer Orchid Soc Bull 32:105-107
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497
- Nayak NR, Chand PK, Rath SP, Patnaik SN (1998) Influence of some plant growth regulators on the growth and organogenesis of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. seed-derived rhizomes *in vitro*. In Vitro Cell Dev Biol Plant 34:185-188
- Nayak NR, S Sahoo, S Patnaik, SP Rath (2002) Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). Scientia Hort. 94:107-116.
- Sagawa YT, Shoji T (1966) Clonal propagation of *Cymbidium* through shoot meristem culture. Amer Orchid Soc Bull 35:118-122
- Shimasaki K, S Uemoto (1990) Micropropagation of a terrestrial *Cymbidium* species using rhizomes development from seeds and pseudobulbs. Plant Cell Tiss Org Cult 22:237-244
- Shimasaki K, S Uemoto (1991) Rhizome induction and plantlet regeneration of *Cymbidium goeringii* from flower bud cultures *in vitro*. Plant Cell Tiss Org Cult 25:49-52
- Steward FC, MO Mapes (1971) Morphogenesis in aseptic cell cultures of *Cymbidium*. Bot Gaz 132:65-70
- Tawaro S, Suraninpong P, Chanprame S (2008) Germination and regeneration of *Cymbidium findlaysonianum* Lindl on a medium supplemented with some organic sources. Walailak J Sci & Tech 5(2):125-135
- Teixeira da Silva JA, Tanaka M (2006) Multiple regeneration pathways via thin cell layers in hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae) J Plant Growth Regul 25:203-210
- Teixeira da Silva JA, Singh N, Tanaka M (2006) Priming biotic factors for optimal protocorm-like body and callus induction in hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae), and assessment of cytogenetic stability in regenerated plantlets. Plant Cell Tiss Org Cult 84:135-144
- Ueda HH, Torikata (1968) Organogenesis in meristem culture of *Cymbidium*. I. Studies on the effects of growth substances added to culture media under continuous illumination. J Jpn Soc Hort Sci 37:240-248
- Wang X (1988) Tissue culture of *Cymbidium*: plant and flower induction *in vitro*. Lindleyana 3:184-189
- Wimber DE (1963) Clonal multiplication of *Cymbidium* through tissue culture of the shoot meristem, Amer Orchid Soc Bull 32:105-107
- Wimber DE, S Watrous, AJ Mollahan (1987) Colchicine induced polyploidy in Orchid. Proc. 25th World Orchid Conf pp. 65-69
- Yang J, Lee H, Shin DH, Oh SK, Seon JH, Paek KY, Han K (1999) Genetic transformation of *Cymbidium* orchid by particle bombardment. Plant Cell Rep 18:978-984