

다양한 배지종류, sucrose 농도 및 갈변억제물질 처리에 의한 팔레놉시스 PLB 증식 및 재분화 체계 확립

노희선 · 김종보

Establishment of proliferation and regeneration system of PLBs in *Phalaenopsis* by treatments of a variety of types of medium, sucrose concentrations and anti-browning agents

Hee Sun Roh · Jong Bo Kim

Received: 14 November 2014 / Revised: 17 November 2014 / Accepted: 18 November 2014
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract To establish an efficient proliferation and regeneration of PLBs (protocorm-like bodies) of *Phalaenopsis* plants, a variety of propagation medium types, various concentrations of sucrose as well as liquid and solid type were tested in this study. Further, activated charcoal, citric acid and ascorbic acid were compared whether these agents are suppose to reduce the browning in culture process using PLBs of *Phalaenopsis* plants. With regard to the proper propagation medium, VW medium showed 1.3 ~ 2 times higher than those of other medium in an index of increasing for fresh weight and 50% higher than those of other medium in the frequency of shoot regeneration. However, regarding liquid and solid types of culture, there were no significant differences in the proliferation of PLBs and regeneration of shoots from PLBs. In the experiment for a variety of sucrose concentrations (0 ~ 50 g/l), 10 g of sucrose showed 30 ~ 50% higher than other concentrations in increasing index and 10 ~ 50% higher in the regeneration of shoots from PLBs. Regarding the reduction of browning in tissue culture via PLBs of *Phalaenopsis* plants, 1 g of activated charcoal showed only 1.5% browning of PLBs cultured. Whereas, other treatments including citric acid and ascorbic acid showed 6 ~ 16% of browning of PLBs. Therefore, activated charcoal was selected

as an efficient anti-browning agents for the culture of PLBs in *Phalaenopsis* plants. Using above-described results can be contributed to the establishment of mass propagation system using PLBs of *Phalaenopsis* plants in the future.

Keywords Orchids, *Phalaenopsis*, PLBs (protocorm-like bodies), Regeneration, Tissue culture

서론

난은 800여 속(屬)에 60,000여 종(種)으로 그 종류가 다양하고 재배 역사가 길며 단자엽식물 중 가장 많이 진화된 식물로 알려져 있으며, 난은 주로 승진이나 개업, 졸업식 등 경축행사에 선물용으로 이용되며, 최근에는 공기정화 식물로서의 능력을 인정받아(Yun and Jung 2011) 가정용 화분으로도 인기가 높다. 그중 팔레놉시스는 재배기간이 다른 난보다 짧고 개화기간이 길뿐 아니라 실내 환경에 잘 적응한다. 또한 공기 중에 있는 실내오염물질 등을 제거하는데 상당한 효과가 있는 것으로 밝혀져 있다.

팔레놉시스는 열대 아시아 지방인 말레이시아, 싱가포르, 미얀마 남부에서 오스트레일리아에 이르는 넓은 지역에 40 ~ 50종이 분포하고 있으며, 근래에는 팔레놉시스 아마빌리스(흰색)와 팔레놉시스 실러라이나(분홍색)를 중심으로 백색 계통, 분홍색 계통, 황색 계통, 세미백색 계통, 스프라이트 계통 등으로 진전 되었으며(Yun and Jung 2011), 심비디움과 달리 속간교배가 가능하다. 우리나라에서는 1990년대 초반 국립원예특작과학원에서 팔레놉

H. S. Roh · J. B. Kim (✉)
건국대학교 의료생명대학 생명공학과
(Department of Biotechnology, College of Biomedical & Health Sciences, Glocal Campus, Konkun university, Choong-Ju, 380-701, Korea)
e-mail: jbhee1011@kku.ac.kr

시스 육종을 위해 유전자원을 수집하고 평가한 것을 시작으로, 경기도와 경남화훼육종연구소 및 민간단체에서도 품종연구를 시작하여 매년 새로운 팔레놉시스 품종들이 육성되고 있다. 그럼에도 불구하고 현재까지 국내에서 재배되고 있는 품종의 대부분이 대만 등에서 생산되는 해외 품종이며, 수입료의 대부분은 실생묘로, 유전적으로 고정되어 있지 않은 상태이기 때문에 육묘 시 묘 손실율이 크고 개체간의 생육, 화색 및 화형 차이 그리고 개화기의 불균일성 등 문제점을 가지고 있다. 그에 비해 조직배양에 의해 번식되는 영양계 묘들은 유전적으로 균일하여 실생 번식 시 발생하는 문제점들을 극복할 수 있고, 형질전환 시 안정적인 조직배양 환경은 형질전환 효율을 높여주는 역할을 한다(Kim et al. 2001a).

팔레놉시스 조직배양 연구는 Roter (1949)에 의해 처음 시작되어 연구초기에는 생장점 또는 경정배양(Intuwong and Sagawa 1974)이 시도 되었으나, 생장점 적출을 위해서는 묘주를 희생시켜야하고, 폐놀 성분이 과다 발생하여 생장점 조직이 쉽게 죽어 성공률이 매우 낮다는 문제가 있어(Been 2003), 화경유래 엽절편(Tanaka and Sakanishi (1978))과 화경 절간 절편체(Homma and Asahira 1985; Lin 1986), 근단(Kobayashi et al. 1991) 및 액아(Tse et al. 1971; Inchihashi 1992) 등의 절편체 등이 널리 이용되고 있다. 이들 절편체로부터 유도된 callus, shoot 및 PLB (protocorm-like bodies) 등은 클론묘 생산에 많이 이용되고 있다. 그 중 PLB는 PLB유도를 위하여 환경이 많이 필요하지 않고, PLB자체의 증식속도가 액아나 부정아보다 빠르며, 조직배양 작업 시에도 PLB를 분리하는 작업이 액아를 분리하는 작업보다 쉬운 이점을 가지고 있어(Kim 2010), PLB를 이용한 대량 생산 체계에 대한 조건 확립이 필요하다 판단된다.

한편, 난 조직배양 초기부터 폐놀화합물 분비에 의한 갈변화(browning) 현상은 난 조직배양 시 문제점으로 대두되어 왔는데, 식물조직배양에서는 이를 방지하기 위한 수단으로 폐놀화합물의 산화를 방지하는 항산화제인 비타민 C (ascorbic acid)와 구연산(citric acid)을 주로 이용하였으며(Paek et al. 2001), 바나나(Ko et al. 2009), 참두 (Abdelwahd et al. 2008), 포도(Roubelakis-Angelakis and Zivanovitch 1991), *conostephium pendulum* (Antony et al. 2004)에서 비타민 C 또는 구연산이 갈변억제에 효과가 있음을 보고하였다. 활성화탄소(activated charcoal)는 에틸렌 및 폐놀을 흡수하여 식물체의 갈변화를 억제(Paek et al. 2011)하는 물질로, 고추(Madhusudhanan and Rahiman, 2000), 감자(Carlberg et al. 1983) 및 참두(Abdelwahd et al. 2008)에서 갈변억제제로서의 효과가 입증되었으며, 난의 종자 발아 연구에도 종종 이용 된다(Kauth et al. 2008).

따라서 본 연구에서는 다양한 배지종류 그리고 고체와 액체배지, sucrose 농도 처리를 통해 최적의 배지 조건을 찾고, 비타민C, 구연산 그리고 활성화탄소 처리구 사이에

서의 갈변율을 비교하여 갈변화 현상이 최소로 발생하는 동시에 PLB 증식이 가능한 팔레놉시스 대량증식 체계를 확립하고자 한다.

재료 및 방법

식물재료 및 PLB 증식

본 연구에 사용된 식물재료는 부산 강산난원(서 재환 대표)에서 분양 받은 팔레놉시스 KN-02 계통을 이용하여 기내에서 PLB (protocorm-like bodies)를 증식 시킨 후 실험에 이용하였다.

배지조성 및 배양환경

팔레놉시스 PLB는 증식을 위해 뿌리 및 신초를 제거 한 후 가로×세로 약 5 mm의 크기로 잘라 VW (Vacin and Went 1949) 변형 배지인 VWAB배지(1.625 g/l VW, 30 g/l sucrose, 0.5 g/l activated charcoal, 8 g/l phyto agar (Duchefa, Haarlem, The Netherlands), pH 5.2)를 기본배지로 하여 4주마다 계대배양을 실시하였다. 본 연구에서 모든 기내 배양은 24±1°C, 16시간 광주기 조건하에서 이루어졌다.

배지별 팔레놉시스 PLB 생장 비교

배지의 종류가 팔레놉시스 PLB배양 시 PLB증식 및 재분화에 미치는 영향에 대해 알아보기 위하여 PLB절편체를 VW, Knudson C (Knudson 1946), Orchimax 배지(Duchefa, Haarlem, The Netherlands) 및 HCa배지(Lee et al. 2010)에 각각 치상하여 PLB증식율 및 재분화율을 배양 4주 후에 조사하였다.

배지 타입별 PLB 생장 비교

팔레놉시스 PLB증식 및 재분화 시 배지의 타입(액체, 고체)에 따라 어떠한 영향을 미치는 지 알아보하고자 본 연구를 수행하였다. Agar를 제외한 VWAB배지를 액체 배지로 이용하였으며, 4주간 배양 후 PLB 생체중 증가율과 신초 발생율을 측정하였다.

Sucrose 농도별 PLB 생장 비교

배지에 첨가되는 탄소원(sucrose)의 농도가 팔레놉시스 PLB 증식 및 재분화에 어떠한 영향을 미치는지 알아보하고자 sucrose를 0, 10, 20, 30, 40, 50 g/l 농도별로 VWAB배지에 첨가하여 4주간 배양 후 PLB의 생체중 증가율 및 신초발생율을 조사하여 비교하였다.

갈변방지제 처리 효과

팔레놉시스 배양 시 갈변 방지제 처리에 따른 팔레놉시스 PLB 갈변방지 효과에 대해 알아보기 위해 활성탄소(activated charcoal)와 항산화제인 비타민 C (ascorbic acid), 구연산(citric acid)을 0.5, 1.0 g/l씩 VWAB배지에 첨가하여 팔레놉시스 PLB의 갈변화율을 조사하였다.

결과 및 고찰

배지별 팔레놉시스 PLB 성장 비교

배지의 종류가 팔레놉시스 PLB배양 시 PLB증식 및 재분화에 미치는 영향에 대해 알아보기 위하여 PLB절편체를 4종류의 난 배지(VW, Knudson C, Orchimax, HCa)에 치상하였다. 최초 배양한 PLB를 4주 후 생체중을 측정하여 그 증가율을 지수로 측정된 결과, VW배지에서 3배정도 증가하여 가장 높은 PLB 증식효율을 보였으며(Fig. 1a), 재분화율 역시 74.0±2.2%로 orchimax (53.3±5.8%), HCa (21.0±3.6%), Knudson C (14.2±1.4%)에 비해 PLB에서 신초발생율이 20~50% 이상 높은 것으로 나타났다(Fig. 1b). Park et al. (1996)의 연구결과에서도 VW, Hyponex, 그리고 MS (Murashige

and Skoog 1962) 액체 배지에서 팔레놉시스 PLB의 증식율을 비교한 결과, VW 액체 배지에서 30%로 PLB증식에 가장 적합한 것으로 나타나 본 연구와 동일한 결과를 보였다. 하지만, Kim et al. (2001b)의 연구에서 MS, NDM (Tokuhara and Mii 1993) 및 VW배지를 비교한 결과 PLB증식율은 MS와 NDB배지에서 다소 높은 것으로 나타났으며, 특히 NDB배지에서 배양된 PLB는 다른 배지의 PLB보다 갈변이 적고 정상적인 형태가 많은 것으로 나타났다. 이와 같이 연구에 따라 PLB증식에 차이가 있는 것은 배양 부위별로 적정배지가 다르고 PLB유도 시 사용한 배지는 증식 시에도 영향을 미치기 때문이라 판단된다(Kim et al. 2001b). 본 연구에서는 가장 높은 PLB증식효율을 보였던 VW배지를 기본으로 천연산물인 apple powder와 banana powder를 추가로 첨가한 VWAB배지가 이러한 첨가물질이 없는 기본 VW배지와 비교하여 더 좋은 증식효율을 나타내어 PLB증식 배지로 이용하였다(데이터 미제시).

배지 타입별 PLB 성장 비교

액체 또는 고체 배지 형태에 따른 팔레놉시스 PLB의 성장을 비교한 결과 고체배지에서 생체중이 2.7배 증가하여 액체 배지보다 0.1배 높은 수치를 보였으며, 신초발생율 역시 36.3%로 액체 배지보다 1.7% 높았으나 유의적인

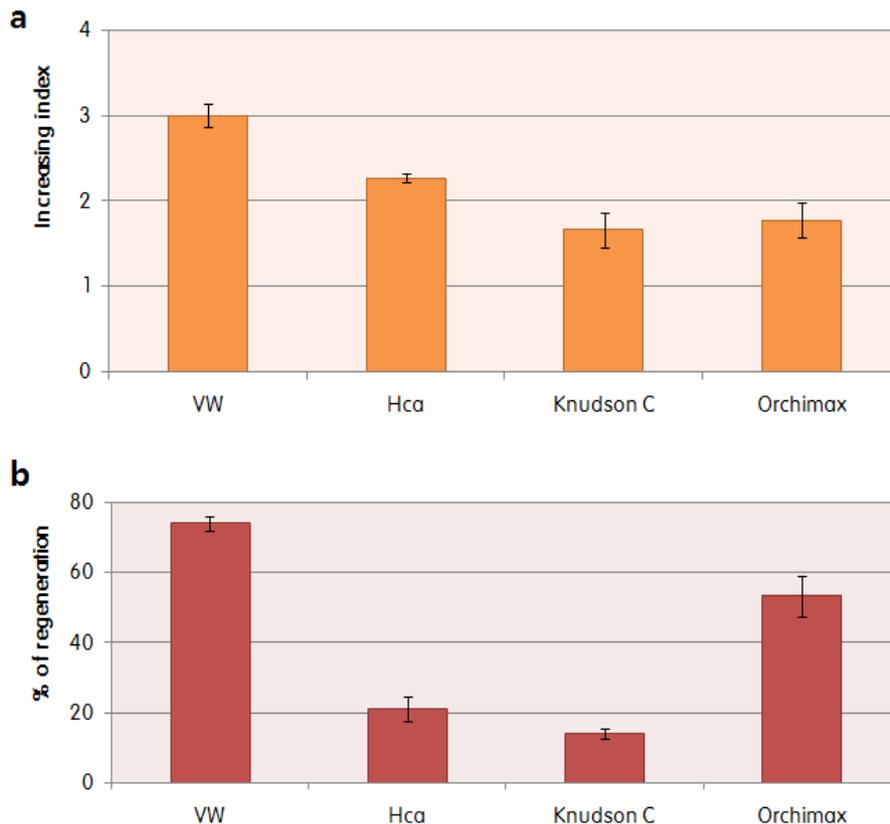


Fig. 1 Comparison of medium types on the proliferation and regeneration of PLBs of *phalaenopsis* plants

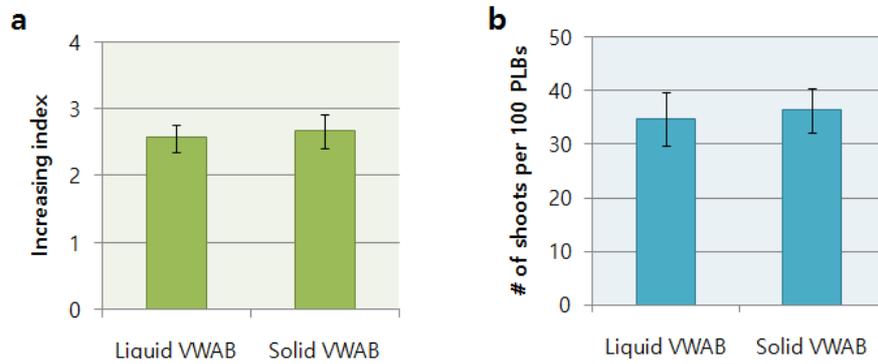


Fig. 2 Comparison of medium types on the proliferation and regeneration of PLBs of *phalaenopsis* plants

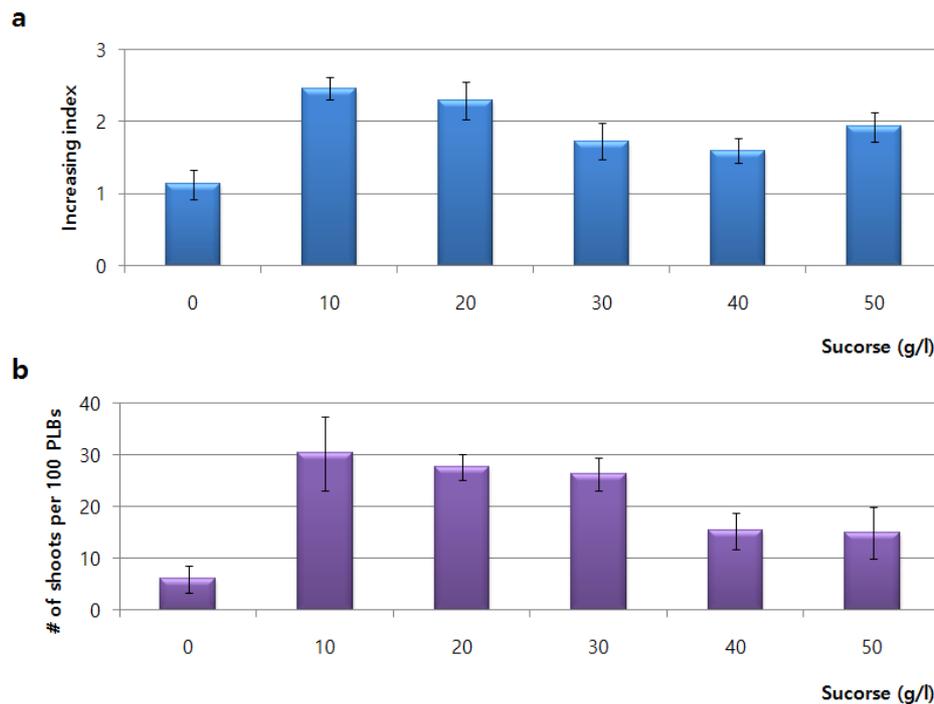


Fig. 3 Comparison of sucrose concentrations on the proliferation and regeneration of PLBs of *phalaenopsis* plants

차이는 관찰되지 않았다(Fig. 2a, 2b). Kim et al. (2001b)의 연구에서 흰색계통의 팔레놉시스는 고체 배지와 액체배지(탈지면 배양)간의 증식율에 큰 차이가 없는 반면 분홍색 계통에서는 고체배지에서 52.2%로 액체배지보다 0.9% 높은 증식율을 보였다. 심비디움에서도 PLB 및 callus유도에 고체 배지가 액체 배지나 membrane raft보다 높은 효율을 보였다(Teixeira da Silva et al. 2006). 반면 Park et al. (1996)에서는 팔레놉시스에서 PLB증식에 액체 탈지면 처리구에서 고체 배지 및 bubble column 처리구보다 2~4배 높은 효율을 보였다.

Sucrose 농도별 PLB 성장 비교

Sucrose농도에 따른 PLB 성장에 미치는 효과에 대해 알아보기 위해 0, 10, 20, 30, 40, 50 g/l의 sucrose를 각각 첨가

한 결과 10~20 g/l 첨가 시 2.3~2.5배 생체 중 증가하여 0, 30~50 g/l (1.1~1.9 배) 첨가한 경우 보다 생체중 증가에 효율적인 것으로 나타났다(Fig. 3a). 또한 10 g/l에서 30.3%로 가장 높은 효율의 신초 발생율을 보여 VWAB배지에 10 g/l sucrose를 첨가 시 PLB 성장에 가장 효율적이라 판단된다(Fig. 3b). 다른 팔레놉시스(Kim et al. 2001b) 연구 결과에서도 0, 10, 20, 30, 40 g/l의 sucrose를 처리한 결과 10 g/l의 sucrose농도가 가장 적합한 것으로 나타나 본 연구결과와 동일하였으며, 심비디움 액체 배양에서도 sucrose 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6%를 첨가한 결과 2%의 상대적으로 낮은 농도에서 가장 높은 성장률을 보였다(Kusumoto 1980). 하지만 카네이션 체세포배양(Karami et al. 2006)과 나리 자구 배양(Eum et al. 2010)의 경우 각각 12% 혹은 60~90 g/l의 sucrose 첨가 시 높은 효율의 체세포배발생 및 자구 생산율을 보였다. 이와 같은 결과는 난과 식물의

Table 1 Effect of anti-browning agents in media on browning from PLBs of *phalaenopsis* plants

anti-browning agents	% of browning	
	0.5 g/l	1 g/l
Activated charcoal	4.1±0.9	1.5±0.5
Citric acid	6.7±1.4	12.5±2.5
Ascorbic acid	15.8±1.4	15.8±3.8

배지에는 상대적으로 천연산물을 첨가하는 경우가 많아 (Paek et al, 2001), 고농도의 sucrose 처리 시 배지의 삼투압을 높여 식물체의 생육을 억제하기 때문이라 판단된다. 따라서 과즙 등을 첨가할 때는 배지의 삼투압이 높아지지 않도록 sucrose의 농도를 감소시킬 필요가 있다 (Inchihashi 1993).

갈변방지제 처리 효과

본 연구에서 팔레놉시스 조직배양 시 문제가 되는 갈변화를 방지하고자 조직배양 시 갈변방지 수단으로 보편적으로 이용되는 활성탄소, 비타민 C, 구연산을 VWAB배지에 0.5, 1.0 g/l 씩 각각 처리하여 갈변율을 비교하였다. 그 결과 활성탄소 1 g/l 첨가 시 1.5±0.5%로 가장 낮은 갈변율을 보였으며, 비타민 C 첨가 시 15.8%, 구연산 첨가 시 6.7~12.5%로 나타나 팔레놉시스 갈변화 방지에 비효율적인 것으로 나타났다 (Table 1). 고추에서 5품종에 100~250 mg/l 의 활성탄소를 처리한 결과, 한 품종을 제외한 4품종에서 갈변방지에 효과적이라고 보고하였으며 (Madhusudhanan and Rahiman 2000), 심비디움에서 비타민 C, α -tocopherol 그리고 활성탄소를 첨가한 결과 갈변방지에는 효과적이었으나, PLB증식에는 비효율적인 것으로 나타났다 (Teixeirada silva 2013). Paek et al. (2011)의 보고에 의하면 활성탄소는 난과 종자의 발달에 도움이 되며, 에틸렌과 페놀화합물을 흡수하여 갈변화 방지에도 도움이 되지만, 고농도의 활성탄소는 에틸렌 및 페놀화합물뿐만 아니라 배지 내 비타민, 식물생장조절제등을 흡수하므로 농도조절에 유의해야 한다고 보고하였다. 본 연구에서 배지종류, 액체 및 고체배지형태, sucrose 및 갈변방지 목적의 다양한 첨가제를 처리한 결과 도출된 최적의 배지조합은 향후 팔레놉시스 기내 PLB 증식 및 이로부터의 신초 재분화 체계 확립에 크게 기여하리라 판단된다.

적 요

팔레놉시스 PLB (protocorm-like bodies) 조직을 이용하여 대량증식 및 신초재분화 체계 확립을 위하여 다양한 증식배지, 액체배지와 고체배지의 효과, sucrose 농도 등이

PLB 증식과 신초 재분화에 효과가 있는지 그리고 활성탄소, citric acid 및 ascorbic acid 등이 팔레놉시스 PLB 배양 시 갈변화 현상을 감소하는데 효과가 있는지 알아 보고자 본 연구를 수행하였다. 그 결과, 난과 식물에서 증식 배지로 널리 사용되는 VW, HCa, Orchimax 및 Kudson C 배지 중 VW 배지가 PLB 증식에서 타 배지와 비교해서 최소 1.3배에서 최대 2배의 증식효율 그리고 신초 재분화에서도 50% 이상 높은 효율을 보여 주었다. 최적 배지로 선정된 VW배지에 apple powder 및 banana powder를 첨가한 VWAB 배지를 기반으로 액체 및 고체배양에서 PLB 증식 효율과 신초재분화율을 비교한 결과, 통계적으로 유의한 차이는 발견되지 않았다. Sucrose 농도를 0~50 g 처리한 실험에서는 PLB 증식과 재분화 효율 둘 다 10 g 처리구에서 가장 좋은 결과를 보여 주었다. 마지막으로 팔레놉시스 PLB 증식 및 재분화 과정에서 자주 발생하는 갈변화를 감소시키기 위하여 활성탄소, citric acid와 ascorbic acid를 처리한 실험에서는 활성탄소 1 g이 1.5%의 가장 낮은 갈변율을 나타내었다. 이러한 실험결과는 향후 팔레놉시스 PLB를 이용한 대량증식 및 재분화 체계 확립에 크게 기여하리라 판단된다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 농업공동연구사업(project no. PJ0092-96082014)의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

References

- Abdelwahd R, Hakam N, Labhilili M, Udupa SM (2008) Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. *Afri J of Biotech* 7(8):997-1002
- Anthony JM, Senaratna T, Dixon KW, Sivasithamparam K (2004) The role of antioxidants for initiation of somatic embryos with *Conostephium pendulum* (Ericaceae). *Plant Cell Tiss and Org Cult* 78(3):247-252
- Been CG (2003) Production of *Phalaenopsis* clones by shoot propagation. *Flower Res J* 11(2):171-176
- Carlberg I, Glimelius K, Eriksson T (1983) Improved culture ability of potato protoplasts by use of activated charcoal. *Plant Cell Rep* 2:223-225
- Eum S.J, Park KI, Oh W, Kim KW (2010) Promotion of Bulblet Enlargement through Liquid Stationary Culture in Korean Native Lilies *In Vitro*. *Hort Environ biotechnol* 51(1):45-50
- Homma Y and T Asahira (1985) New means of *Phalaenopsis* propagation with internodal zawa sections of flower stalk. *J of the Jpn Soc for Hort Sci* 54:379-387

- Inchihashi S (1992) Micropropagation of *Phalaenopsis* through the culture of lateral buds from young flower stalks. *Lindleyana* 7:208-215
- Inchihashi S (1993) *Phalaenopsis* (Breeding and culture) III carbohydrate source on growth of embryogenic callus in *Phalaenopsis* and allied genera. *Hirosawa Univ* 10:81-88
- Intuwong O and Y sagawa (1974) Clonal propagation of *Phalaenopsis* by shoot tip culture. *Ameri Orchid Soc Bull* 43:893-895
- Karami O, Deljou A, Esna-Ashari M, Ostad-Ahmadi P (2006) Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Sci Hort* 110(4):340-344
- Kauth PJ, Dutra D, Johnson TR, Stewart SL, Kane ME, Vendrame W (2008) Techniques and applications of in vitro orchid seed germination. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues* 5:375-391
- Kim JH (2010) Production system of *in vitro Phalaenopsis* plants and problems on domestic tissue culture facilities in Korea. 10 th Orchid symposium. Abstract p. 11-19
- Kim MS, Eun JS, Kim JY (2001b) Effect of culture medium, temperature, and light intensity on PLB propagation of *Phalaenopsis*. *Kor J Plant Tissue culture* 28(4):215-219
- Kim WJ, Jeong HY, Kim YJ, Hwang KS, Choi SR, Shin HK, Kim HD, Koo DH, Cho HR, Lee HK, Lim JH, Kim KJ, Kim JY, Lee DW, Song JS, Lee KS, Yoo BS, Kim WH, Oh YN, Lee EK, Jeong MI, Kim MS, Bang CS, Lee YR, Yoo EH, Lee YS (2001a) Breeding techniques in ornamentals, RDA, Suwon, p. 289-309
- Knudson L (1946) A new nutrient solution for germination of orchid seed. *Am Orchid Soc Bull* 15:2124-217
- Ko WH, Su, CC, Chen CL, Chao CP (2009) Control of lethal browning of tissue culture plantlets of Cavendish banana cv. Formosana with ascorbic acid. *Plant Cell Tiss Org Cult* 96(2):137-141
- Kobayashi M, Komatuda M, Yonar S (1991) Studies on the vegetative propagation of *Phalaenopsis* through root tip culture Abstr. *J of Jpn Soc for Hort Sci* 59:664-665
- Kusumoto M (1980) Effects of coconut milk, agar and sucrose concentrations and medium pH on the proliferation of *Cymbidium* protocorm-like bodies cultured in vitro. *J of the Jap Soc for Hort Sci* 48(4):503-509
- Lee YM, Kim MS, Lee SI, Kim JB (2010) Review on breeding, tissue culture and genetic transformation systems in *Cymbidium*. *J Plant Biotechnol* 37:357-365
- Lin CC (1986) In vitro culture of flower stalk internodes of *Phalaenopsis* and *Dorutaenopsis*. *Lindleyan*
- Madhusudhanan K and Rahiman BA (2000) The effect of activated charcoal supplemented media to browning of in vitro culture of Piper species. *Biologia Plant* 143(2):297-299
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3):473-497
- Paek KY, (2001) *Plant tissue culture techniques*, Hyang-Moon publisher, Seoul, p. 466
- Paek KY, Hahn EJ, Park SY (2011) Micropropagation of *Phalaenopsis* orchids via protocorms and protocorm-like bodies. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ), 710:293-306
- Park YS, KakutaS, Kano A, Okabe M (1996) Efficient propagation of protocorm-like bodies of *Phalaenopsis* in liquid medium. *Plant Cell Tiss Org Cult* 45:79-85
- Roter G (1949) A method of vegetative propagation of *Phalaenopsis* species and hybrids. *A O S Bull* 18:738-739
- Roubelakis-Angelakis KA, Zivanovitch SB (1991) A new culture medium for in vitro rhizogenesis of grapevine (*Vitis* spp.) genotypes. *HortScience* 26(12):1551-1553
- Tanaka M and Y sakanishi (1978) Factors affecting the growth of in vitro cultured lateral buds from *Phalaenopsis* flower stalks. *Sci Hort* 8:169-173
- Teixeira da Silva JA, Chan MT, Chai ML, Tanaka M (2006) Priming abiotic factors for optimal hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae) PLB and callus induction, plantlet formation, and their subsequent cytogenetic stability analysis. *Sci Hort* 109(4):368-378
- Teixeirada silva JA (2013) Impact of paper bridges, activated charcoal, and antioxidants on growth and development of protocorm-like bodies of hybrid *Cymbidium*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 49:414-420
- Tokuhara K, Mill M (1993) Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Rep* 13(1):7-11
- Tse AT, Smith RJ, Hackett WP (1971) Adventitious shoot formation on *Phalaenopsis* nodes. *Ameri Orchid Soc Bull* 40:807-810
- Vacin E and Went FW (1949) Some pH changes in nutrient solutions. *Bot Gaz* 110:605-613
- Yun KY and Jeong SY (2011) *Orchids of World*. Kim-Young publisher, Pa-ju, Kyong-Ki, Korea