

금새우난초(*Calanthe striata* f. *sieboldii* Decne. ex Regel) 종자의 비공생 발아 및 신초증식

배기화 · 김수영

Asymbiotic germination and seedling growth of *Calanthe striata* f. *sieboldii* Decne. ex Regel

Kee Hwa Bae · Soo-Young Kim

Received: 22 May 2015 / Revised: 26 June 2015 / Accepted: 15 September 2015
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract *Calanthe striata* f. *sieboldii* Decne. ex Regel is a terrestrial orchid with beautiful flowers arranged in racemose inflorescences. This species is threatened due to over-collection and loss of suitable habitats. Asymbiotic germination is useful in the conservation efforts to re-establish plants in the wild, and for commercial propagation. In this study, we investigate the effects of sodium hypochlorite (NaOCl), three types of culture media (Phytomax Orchid Maintenance - POM, Seed Germination Maintenance - SGM, and Murashige and Skoog 1962 - MS), and plant growth regulators on embryo swelling, protocorm formation, and embryo diameter of *C. striata* f. *sieboldii*. Treatment with 1% NaOCl for 30 min greatly enhanced embryo swelling (28.3%), embryo diameter (205.8 μ m), and embryo protocorm formation (54.8%) compared to seeds without NaOCl treatment (embryo swelling 8.5%, embryo diameter 14.6 μ m, and protocorm formation 13.4%) on POM medium. Protocorm formation on POM medium supplemented with 1.0 mg/L N6-benzyladenine (BA) (95.6%) was better than the control (54.5%). Additionally, the effects of activated charcoal (AC)

and sucrose on seedling growth in *in vitro* culture were examined. The protocorm converted into healthy plants with well-developed shoot primordia on the POM medium with AC and sucrose. The most suitable conditions for seedling growth after 10 weeks of culture were the POM medium with AC or sucrose. These results show effective asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling growth of *C. striata* f. *sieboldii*.

Keywords Activated charcoal, *in vitro*, Medium, Sodium hypochlorite, Sucrose

서론

새우난초속(*Calanthe*)은 인도, 중국, 한국, 일본 등 열대, 아열대 및 온대지역에 약 200여종이 자생하고 있다(Gale and Drinkell 2007; Kim and Kim 1989; Lee 2011; Lee et al. 2008). 우리나라 새우난초속 5종(새우난초: *Calanthe discolor* Lindl., 큰새우난초: *C. biscalor* Lindl., 신안새우난초: *C. aristulifera* Rchb. f., 여름새우난초: *C. reflexa* Maxim., 금새우난초: *C. striata* f. *sieboldii* Decne. ex Regel)의 주요 자생지는 제주도, 울릉도, 안면도, 추자도 등 일부 도서지역으로 알려져 있지만(Hyun et al. 1999a; Hyun et al. 1999b; Lee 2006; Lee 2011; Lee and Choi 2006; Lee et al. 2008), 새우난초(*C. discolor*)의 경우, 기후변화로 인한 기온상승의 영향으로 중부지역(전북 완주군 모악산)에도 자생지가 있다고 보고된 바 있다(Lee et al. 1993; Hyun et al. 1999a).

금새우난초(*C. striata* f. *sieboldii*)는 상록성이며 반 음지(숲 내)에 자라는 여러해살이풀로 지생란(terrestrial orchid)

K. H. Bae
국립생물자원관
(National Institute of Biological Resources, 42 Hwangyeong-ro, Seo-gu, Incheon, 404-708, Republic of Korea)
국립낙동강생물자원관
(Nakdonggang National Institute of Biological Resources, 137, Donam 2-gil, Sangju-si, Gyeongsangbuk-do, 37242, Republic of Korea)

S.-Y. Kim (✉)
국립생물자원관
(National Institute of Biological Resources, 42 Hwangyeong-ro, Seo-gu, Incheon, 404-708, Republic of Korea)
e-mail: sy7540@korea.kr

이다. 잎은 주름이 많고, 넓은 타원형으로 길이 20~30 cm, 폭 5~10 cm이다. 꽃은 4~6월에 노란색의 총상화서로 달려 자주색 또는 연녹색 꽃이 피는 새우난초와 뚜렷이 구분되며(Lee 2011), 서식지는 제주도, 울릉도, 안면도, 흑산도, 홍도 등 일부 도서이다(Lee 1980; Lee 2006; Lee 2011). 금새우난초는 다른 새우난초속 식물에 비해 화형과 화색이 우수하여, 원예 또는 관상용으로 이용 가치가 높으나, 자생지가 일부 도서지역에 국한되며 개체수도 적다(Lee 1980; Lee 2006). 또한, 불법채취의 증가로 자생지에서 사라질 위협성이 높아(Hyun et al. 1999a), 환경부가 국외반출승인대상생물자원으로 지정하여 무분별한 채집과 국외반출을 금지하고 있다.

새우난초속에 대한 연구로 국내 자생 새우난초속에 관한 분류(Kim and Kim 1989)와 제주도 자생 새우난초속의 분류학적 연구(Kim et al. 1990), 제주지역 새우난초, 금새우난초, 왕새우난초의 분포와 형태적 특성 분석(Hyun et al. 1999a) 및 Isozyme과 RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA)분석을 통한 새우난초, 금새우난초, 왕새우난초의 유전학적 특성분석(Hyun et al. 1999b)이 있다. 또한, 새우난초, 금새우난초 및 왕새우난초(새우난초×금새우난초)의 기내 무균발아와 증식에 관한 연구결과가 보고된 바 있다(Miyoshi and Mii 1988; Miyoshi and Mii 1995a; Miyoshi and Mii 1995b; Kim and Chung 1997; Chung et al. 1998; Park et al. 2000). 새우난초속 식물의 증식은 다른 난초과식물처럼 영양번식(포기나누기, 별브띄우기)으로 가능하며, 모주의 형질을 물려받는 장점은 있지만 번식 속도가 느리다. 종자를 이용한 번식법은 화분파종법과 무균배양법이 있다. 화분파종법은 공생균근균(myccorrhiza)을 지닌 성체의 주변에 종자를 파종하여 균근균의 도움으로 발아시키는 방법으로 간편하지만 발아율이 낮고, 개화까지 많은 시간이 소요되는 단점이 있다(Mathews and Rao 1980). 무균배양법은 다양한 양분과 식물생장조절물질이 첨가된 인공배지에 발아시키는 방법으로 발아율을 높일 수 있고 파종부터 3~4년 안에 개화주를 얻을 수 있는 장점이 있다(Chung et al. 1998; Miyoshi and Mii 1988; Miyoshi and Mii 1995a; Park et al. 2000). 금새우난초를 포함하는 난초과식물 종자의 배는 미숙한 상태이며, 발아시 에너지 공급원인 배유가 없다(Kano 1972). 또한 종피에 발아억제물질이 존재하며, 균근과의 공생을 통한 발아 등 복잡한 원인으로 발아가 어렵고 시간이 오래 걸려(Mathews and Rao 1980), 보존과 활용성 증대를 위해 발아율을 증가시키는 무균배양기술 개발과 기내 건전묘 생산 조건 확립이 필요하다고 판단된다.

따라서, 본 연구는 원예 또는 관상용으로 활용 가치가 높은 금새우난초의 대량증식을 목적으로 효율적인 비공생 발아기술 개발과 최적의 기내 건전묘 생산체계를 확립하고자 수행되었다.

재료 및 방법

식물재료 및 기내 배양

실험에 사용된 금새우난초(*C. striata* f. *sieboldii*)의 열매는 제주도 남원읍에서 채집되었으며(2013년 10월), 국가야생식물종자은행에서 분양 받았다(자원번호: NIBRGR0000153639). 배지와 기구는 고온·고압(121°C, 1.5기압)상태로 20분간 멸균하여 실험에 사용하였다.

Sodium hyperchlorite (NaOCl) 처리와 배지 종류에 따른 비대배 유도 및 발아조건

Sodium hyperchlorite (NaOCl, Sigma-Aldrich, USA)의 처리와 배지 종류가 금새우난초 종자의 배비대와 발아율에 미치는 영향을 조사하기 위해 열매를 70% 에탄올에 30초간 침지 한 후, 멸균수로 3회 수세하였다. 대조구로 사용된 종자는 멸균된 핀셋을 사용하여 열매에서 분리하여 POM (Phytomax Orchid Maintenance medium, Sigma, USA), SGM (Seed Germination Maintenance medium, Sigma, USA), MS (Murasige and Skoog 1962)배지 위에 각각 치상하였다. 반면, 실험구로 사용된 종자는 NaOCl(1%)을 30분간 처리한 후, 멸균수로 5회 수세하여 NaOCl을 완전히 제거한 후 POM, SGM, MS배지 위에 치상하였다. 금새우난초 종자의 배비대 및 발아실험은 온도(22 ± 1°C), 광주기(16/8시간), 광도(46 μmol m⁻²s⁻¹)가 일정하게 유지되는 배양실에서 실시하였다. 3종류의 배지는 sucrose (20 g/L)와 gerlite (3.0 g/L)를 첨가하고, pH는 5.5로 조절하여 조제하였다. 배비대(embryo swelling)율은 8주 후, 발아(germination)율은 12 후에 각각 조사하였고, 배직경은 2주 간격으로 8주 동안 현미경하에서 측정하였다.

식물생장조절물질의 종류와 농도에 따른 발아

식물생장조절물질(사이토키닌, 옥신)의 종류와 농도가 금새우난초 종자발아에 미치는 영향을 알아보기 위해 종자를 NaOCl(1%)용액에 30분간 처리 한 후, 사이토키닌류인 BA (6-benzyl amino purine: 0, 1.0, 3.0 mg/L)와 KT (Kinetin: 0, 1.0, 3.0 mg/L), 옥신류인 NAA (Naphthalene acetic acid: 0, 0.5 1.0 mg/L)와 IAA (Indole acetic acid: 0, 0.5 1.0 mg/L)를 첨가한 POM배지에 치상하였다. 배지는 sucrose (20 g/L)와 gerlite (3.0 g/L)를 첨가하고, pH는 5.5로 조절하여 조제하였다. 실험은 온도(22 ± 1°C), 광주기(16/8시간), 광도(46 μmol m⁻²s⁻¹)가 일정하게 유지되는 배양실에서 수행되었다. 발아율은 배양 12주 후에 조사하였다.

활성탄과 sucrose 처리에 따른 식물체 증식

활성탄(Activated charcoal, AC, Duchefa, Netherland)과 sucrose의 농도별 처리가 금새우난초의 기내 식물체 증식에 미치는 영향을 조사하기 위해 발아체를 AC (0, 100, 200, 400 mg/L)와 sucrose (0, 10, 30, 50, g/L)가 농도별로 첨가된 POM배지(Agar 7.0 g/L, pH 5.8)에 50개체씩 3반복하여 치상하였다. 실험은 온도(25 ± 1°C), 광주기(12/12시간), 광도(46 μmol m⁻²s⁻¹)가 일정하게 유지되는 배양실에서 실시되었다. 배양 10주 후 싹과 뿌리의 길이, 생중량과 건조량을 각각 조사하였다.

통계분석

모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표시하였고, 집단 간 변이차이를 알아보기 위해서 one-way ANOVA를 실시하여, 유의성이 있는 경우 Duncan's multiple range test로 사후검증을 실시하였다. 통계적 유의성은 P<0.05로 설정하여 분석하였다.

결과 및 고찰

비대배 유도 및 발아조건

NaOCl은 일반적으로 표백 또는 살균제로 사용되며, 식물 조직배양에서는 오염된 외부조직을 무균상태로 기내도입하기 위해 이용되는 강알칼리성 화학물질이다. 이러한 용도 외에도 우리의 과거 결과에 의하면 NaOCl은 새우난초(*C. discolor*), 털복주머니란(*Cypripedium guttatum* Sw.), 복주머니란(*Cypripedium macranthum* Sw.), 한라천마(*Gastrodia verrucosa* Blume), 애기천마(*Hetaeria sikokiana* Tuyama), 광릉요강꽃(*Cypripedium japonicum* Thunb.), 감자난초(*Oreorchis patens* Lindl.) 등 파종된 종자의 배비대를 촉진시켜 발아율을 높이는 데 중요한 역할을 한다. NaOCl 처리와 배지 종류가 금새우난초 종자의 배비대율, 발아율 및 배직경에 미치는 영향을 조사한 결과, 배비대율은 NaOCl 처리 후 POM배지에 치상했을 때 28.3%로 높았고, SGM배지는 22.1%, MS배지는 20.9%로 각각 조사되었다(Fig. 1A). 배직경은 NaOCl 처리 후 POM배지에 치상했을 때 205.8 μm로 가장 길었고(Fig. 2), SGM배지(144.8 μm), MS배지(104.6 μm)의 순으로 조사되었다(Fig. 2). 그러나 대조구(NaOCl 무처리 종자)를 3종류(POM, SGM, MS)의 배지에 치상했을 때 모든 배지에서 배비대율은 10% 미만, 배직경은 14.6 μm 이하로 각각 조사되었다(Fig. 1A, Fig. 2). 발아율은 NaOCl 처리 후 POM배지에 종자를 치상했을 때, 54.8%로 가장 높았고, SGM (41.6%), MS (39.4%)배지의 순으로 조사되었

다(Fig. 1B). NaOCl 무처리구의 발아율은 모든 배지에서 15% 이하로 조사되었다(Fig. 1B). 최근 일부 난초과식물(광릉요강꽃, 복주머니란, 털복주머니란, 감자난초, 두잎감자난초, 한라천마, 애기천마)의 기내 발아 시 NaOCl의 처리가 무처리에 비해 배비대율과 발아율을 50% 이상 증가시킨다는 연구결과가 보고된 바 있다(Bae et al. 2009; Bae et al. 2010; Bae et al. 2012; Bae and Choi 2013; Bae et al. 2014). 특히 복주머니란의 경우, NaOCl이 종피를 파상

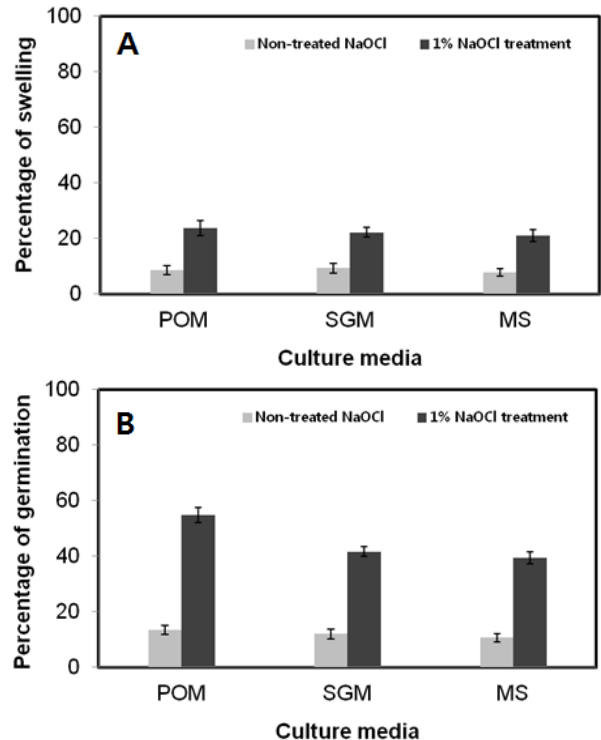


Fig. 1 Effects of 1% NaOCl treatment and culture media on embryo swelling and protocorm formation from *C. striata* f. *sieboldii* seeds after 10 weeks of culture. A: Percentage of swelling embryo, B: Percentage of germination

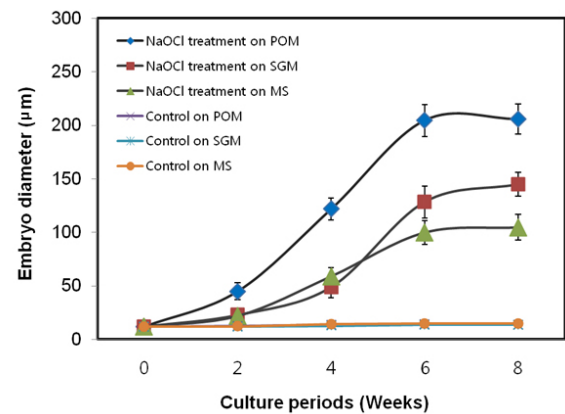


Fig. 2 Effects of 1% NaOCl treatment and culture media on embryo diameter of *C. striata* f. *sieboldii* seeds after 0, 2, 4, 6, and 8 weeks *in vitro* culture

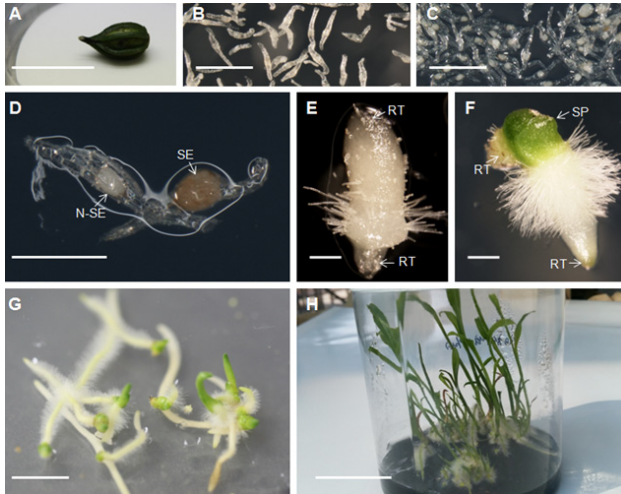


Fig. 3 Asymbiotic germination and *in vitro* seedling growth of *C. striata f. sieboldii*. A: Capsule (scale bar, 20 mm), B: Control (Non-treated NaOCl) (scale bar, 0.1 mm), C: Hyaline seed coat (treated NaOCl) and embryos swollen after eight weeks of culture (scale bar, 0.1 mm), D: Swollen (SE) and non-swollen (N-SE) embryo (scale bar 0.1 mm), E: Germinated embryo (equal protocorm) (scale bar, 0.1 mm), F: Further growth of protocorm (scale bar, 1.0 mm), G: Shoot and root elongation after 10 weeks of culture (scale bar, 10 mm), H: The well-developed plantlets in culture box after five weeks of culture (scale bar, 20 mm)

하여 인공배지로부터 배까지 양분이동이 용이해져 배비 대율과 발아율이 증가 하였고, 단자엽식물인 붓꽃(*Iris sanguinea*)의 종자발아 시 NaOCl의 처리는 종피 내 발아 억제물질을 제거하여 발아율을 50% 이상 증가시킨다고 하였다(Lee and Koh 2002). 따라서, 무배유종자인 난초과 식물의 효율적인 종자배양을 위해 인공배지에서 배 (embryo)까지 양분과 수분 이동이 원활해야 하고 종피 내 발아억제물질이 제거되어야 한다.

기내 비대배 유도과 발아를 위해 사용한 금새우난초 열매는 표면이 짙은 녹색이었고(Fig. 3A), 종자는 열은 유백색을 띠며(Fig. 3B), 길이는 11 μm 로 조사되었다(데이터 미제시). 금새우난초 종자에 NaOCl(1%)을 30분간 처리하면 백색으로 탈색되고(Fig. 3C), 8주 후 비대배가 유도되기 시작하였다(Fig. 3D). 비대배가 유도된 후, 발아가 진행되면서 종자표면에 다량의 가근(rhizoid)이 형성되고, 양극단에서 뿌리원기(root primordia)가 발달하였다(Fig. 3E). 2~3주 후 가근과 뿌리원기가 생장하였고, 발아체 중앙부 위에서 초록색 정아(shoot primordia)가 유도되었다(Fig. 3F).

식물생장조절물질(사이토키닌, 옥신)의 종류와 농도 차이가 금새우난초 종자의 기내 비대배와 발아율에 미치는 영향을 조사하기 위해 금새우난초 종자에 NaOCl(1%)을 30분 처리한 후 BA (1.0, 3.0 mg/L), KT (1.0, 3.0 mg/L), NAA (0.5, 1.0 mg/L), IAA (0.5, 1.0 mg/L)가 각각 첨가된 배지에 배양한 결과, 1.0 mg/L의 BA가 첨가된 POM배지에 배양

Table 1 Effects of cytokinin (BA and Kinetin) and auxin (NAA and IAA) concentrations on protocorm formation from *C. striata f. sieboldii* seeds after 10 weeks of culture on POM medium supplemented with 20 g/L sucrose and 3.0 g/L gelrite

Cytokinins (mg/L)		Auxins (mg/L)		Protocorm formation (%)	
BA	KT	NAA	IAA	Non-treated NaOCl	NaOCl treatment
0	0	0	0	8.4±0.2f*	54.5±2.6i
1				26.1±3.2a	95.6±1.4a
3				16.2±1.7b	91.3±2.3b
	1			11.3±0.5e	86.0±3.9c
	3			12.3±0.6d	80.5±0.8ef
		0.5		16.8±0.4b	83.5±1.0d
		1.0		15.8±0.7bc	81.6±0.8e
			0.5	12.5±1.1d	72.7±1.0gh
			1.0	11.4±0.9e	73.5±1.2g

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

했을 때 가장 높은 발아율(95.6%)을 보였고, 3.0 mg/L의 BA 처리구는 91.3%, 1.0 mg/L의 KT 처리구는 86%, 3.0 mg/L의 KT 처리구는 80.5%의 발아율로 각각 조사되었다(Table 1). 한편, 비공생 발아를 위한 옥신류(NAA, IAA)의 처리는 사이토키닌류(BA, KT)의 처리보다 발아율이 25% 낮았지만, 식물생장조절물질 무처리구에 비해서는 7배 이상 높은 결과를 보였다(Table 1). 동일속인 새우난초의 기내 종자배양 시 0.2 mg/L의 BA처리는 무첨가(발아율 18.6%)에 비해 발아율을 2배 이상 증가시켰다(Godo et al. 2010). 또한 본 연구자의 지난 연구결과로 복주머니란속(*Cypripedium*) 광릉요강꽃의 기내 종자발아 시 BA 처리는 KT처리 보다 발아율을 증가시켰다(Bae and Choi 2013). 본 연구 결과에서도 BA처리는 KT, NAA, IAA처리에 비해 발아율을 높였지만, 발아체체의 10%정도가 비정상개체(기저부 팽창 및 캘러스 유도)로 발달하는 경향을 보였다(데이터 미제시). 본 결과는 왕새우난초 기내배양 시 BA처리가 발아체의 기저부 팽창과 캘러스화를 유도하고, 뿌리발달을 억제하여 비정상개체로 분화되는 결과와 유사하였다(Kim et al. 2008).

활성탄(activated charcoal)과 sucrose 농도에 따른 신초와 뿌리생육

금새우난초 발아체의 기내 식물체 생장에 미치는 AC와 sucrose의 농도를 조사한 결과, 엽장(shoot length)은 10 g/L의 sucrose처리에서 평균 6.8 cm로 가장 긴 반면, 대조구는 평균 3.3 cm로 짧았다(Table 2). 근장(root length)은 50 g/L

Table 2 Effects of AC and sucrose concentrations on seedling growth from germinated embryos from *C. striata* f. *sieboldii* after 10 weeks of culture on POM medium

AC (mg/L)	Sucrose (g/L)	Length of shoot (cm)	Length of root (cm)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)
0	0	3.3±0.8*c	1.7±1.3f	4.4±1.2c	1.2±0.9d
100	-	5.5±0.5b	3.4±1.5e	7.8±1.7b	2.3±0.7c
200	-	6.6±0.2a	4.1±1.9cd	8.6±1.1a	3.4±1.2b
400	-	6.2±1.1a	4.8±1.2c	8.4±1.6a	3.1±1.3b
-	10	6.8±1.3a	5.3±1.6ab	9.1±1.4a	5.3±0.9a
-	30	6.1±0.9a	4.9±1.3c	9.3±0.8a	5.2±1.1a
-	50	6.2±0.8a	5.8±1.6a	8.8±1.3a	5.6±1.4a

*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.

의 sucrose 처리구에서 평균 5.8 cm로 가장 길었고, 대조구는 1.7 cm로 짧았다(Table 2). AC와 sucrose를 처리한 실험구는 대조구에 비해 생중량과 건중량이 2~5배 이상 증가한 결과를 보였다(Table 2). Sucrose는 식물체 내 대사 활동에 필요한 에너지원으로, 기내 조직배양개체의 세포 내 삼투조절제로 이용된다(Gabriela et al. 2005). 그러나 고농도(50 g/L)의 sucrose 처리는 일본산 나리류(*Lilium bulboscapes*)의 기내 배양 시 잎 발생을 억제하고, 캘러스 유도를 촉진하여 생육이 저해된다고 하였다(Takayama and Misawa 1979). 반면, *Cocos nucifera* L의 경우는 저농도(5 g/L)의 sucrose 처리는 고농도(70 g/L) 처리에 비해 광합성능을 향상시켜 토양순화에 적합한 독립영양식물로 발달을 촉진시켰다(Gabriela et al. 2005). 또한, 터키산 마르타곤 나리(*Lilium martagon*)에서는 sucrose 저농도 처리가 고농도 처리에 비해 배지 내 양분흡수를 촉진시키고, 생장억제물질 생성을 감소시켜 구근의 형성과 발달에 효과적이었다(Magdalena and Anna 2005). 본 연구 결과도 기내 식물체 생장은 sucrose 저농도(10 g/L) 처리가 고농도(50 g/L) 처리에 비해 양호한 생장을 보임을 알 수 있었다(Table 2). 배지 내 AC의 첨가는 고온·고압 멸균 후 교질재료(gelling agent)에 의해 pH가 낮아지는 현상을 억제하여 배지의 pH를 안정화시켜 세포 또는 기관의 생장과 발달에 긍정적인 영향을 주고(Eymar et al. 2000; Pan and van Staden 1998), 신초형성 및 뿌리유도를 촉진하는 역할을 한다(Dumas and Monteuuis 1995). 결과적으로, 본 연구결과는 야생 금새우난초 종자의 기내 발아 및 식물체 증식에 필요한 최적 조건을 확립하였고, 이러한 결과는 향후 야생에서 발아가 더딘 난초과식물의 유전적 다양성을 유지하면서 서식지외에서 보존하거나 증식된 식물체를 서식지에 복원하는 활동에 중요한 참고자료로 활용 될 수 있을 것이다.

적 요

본 연구는 자생 난초과식물인 금새우난초의 기내 비대배 유도, 발아 및 배직경에 미치는 몇 가지 영향(NaOCl, 배지, 식물생장조절제)을 조사하기 위해 수행되었다. 1% NaOCl을 30분간 처리한 후 POM배지에 배양할 경우, 비대배 유도는 28.3%, 발아율은 54.8%, 배직경은 205.8 μm로 가장 높게 조사되었다. NaOCl 무처리 종자를 POM배지에 배양할 경우, 비대배 유도는 8.5%, 발아율은 13.4%, 배직경은 14.6 μm로 조사되었다. 또한 식물생장조절물질의 처리가 발아에 미치는 영향을 조사한 결과, 1.0 mg/L의 BA 처리구(95.6%)의 발아율은 대조구(54.5%)에 비해 1.75배 높게 조사되었다. AC와 sucrose의 처리 농도가 기내 식물체 생장에 미치는 영향을 조사한 결과, 엽장은 10 g/L의 sucrose 처리구에서 6.8 cm로 가장 길었고, 대조구는 3.3 cm로 가장 짧았다. 근장은 50 g/L의 sucrose 처리구에서 5.8 cm로 가장 길었고, 대조구는 1.7 cm로 가장 짧았다. 생중량과 건중량은 AC와 sucrose 처리구가 대조구에 비해 2~5배 이상 높은 결과를 보였다. 결과적으로 본 연구는 금새우난초의 기내 발아 및 증식에 미치는 몇 가지 요인에 관해 구체적인 결과를 제시하였고, 이러한 결과는 향후 자생 난초과식물의 증식 및 보존전략 개발에 중요한 기초자료로 제공 될 것이다.

사 사

본 논문은 환경부 국립생물자원관 사업(국가 야생식물종자 확보 및 은행 운영, NIBR201519101)의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

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 by NaOCl pre-treatment. *Prog Ornament Plant* 10:107-113

Bae KH, Choi YE (2013) Factors affecting fruit baring in natural habitate and in vitro culture of zygotic embryos of *Cypripedium japonicum*. *Prog Ornament Plant* 11:146-152

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, Ko MS, Choi SA, Lee HB, Kim NY, Song JM, Song G (2012) In vitro germination of *Gastrodia verrucosa* Blume and *Hetaeria sikokiana* Tuyama treated by NaOCl. *J Plant Biotechnol* 39:163-168

Bae KH, Oh KH, Kim SY (2014) Sodium hypochlorite treatment

- and light-emitting diode (LED) irradiation effect on in vitro germination of *Oreorchis patens* (Lindl.) Lindl. J Plant Biotechnol 41:44–49
- 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*. Kor J Plant Tiss Cult 25:189–194
- Dumas E, Monteuis O (1995) In vitro rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants influence of activated charcoal. Plant Cell Tiss Org Cult 40:231–235
- Eymar E, Alegre J, Toribio M, Lopez-vela D (2000) Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine on in vitro nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica*. Plant Cell Tiss Org Cult 63:57–65
- Gabriela F, Carlos T, Carlos O, Yves D, Jorge MS (2005) Exogenous sucrose can decrease in vitro photosynthesis but improve field survival and growth of coconut (*Cocos nucifera* L.) in vitro plantlets. In Vitro Cell Devel Biol 41:69–76
- Gale S, Drinkell C (2007) *Calanthe arisanensis* Orchidaceae. Curtis's Bot. Mag. 24:206–210
- Godo T, Komori M, Nakaoki E, Yukawa T, Miyoshi K (2010) Germination of mature seeds of *Calanthe tricarinata* Lindl., an endangered terrestrial orchid, by asymbiotic culture in vitro. In Vitro Cell Dev Biol Plant 46:323–332
- Hyun MR, Choi JY, Suh JN, So IS, Lee JS (1999a) Studies on distributions and morphological characteristics of *Calanthe discolor*, *C. sieboldii*, and *C. bicolor* native to Cheju Province. Kor J Hort Sci Technol 17:498–500
- Hyun MR, Choi JY, Suh JN, So IS, Lee JS (1999b) Isozyme and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for genetic relationship among *Calanthe discolor*, *C. sieboldii*, and *C. bicolor* native to Cheju Island. Kor J Hort Sci Technol 17:141–143
- Kano K (1972) The orchids. Seibundo-shinkosha, Tokyo
- Kim BC, Kim MH, Oh MY (1990) A taxonomic study on *Calanthe* in Cheju island - A comparative study on isozyme by electrophoresis. Kor J Plant Tax 20:53–64
- Kim CH, Chung JD (1997) Asymbiotic germination of Korean native *Calanthe* species. Agric Res Bull Kyungpook Natl Univ 15:47–52
- Kim KS, Kim JS, Park JH (2008) Aseptic germination of F1 hybrid seed by inter-species pollination of *Calanthe discolor* Lindl, and *C. discolor* for. *Sieboldii* (Decne.) Ohwi. Kor J Plant Res 21:341–345
- Kim YS, Kim SH (1989) A taxonomic study on *Calanthe* in Korea. Kor J Plant Tax 19:273–287
- Lee, EJ, Koh JC (2002) Improvement of seed germination in native *Iris sanguinea* donn ex horn. Kor J Hort Sci Technol. 20:345–351
- Lee GJ, Kim KS, Kim JS, Park JH, Kim JB, Kim DS, Kang SY (2008) A wide array of phenotypic components and their contributions to variations in *Calanthe* orchid land races. Hort Environ Biotechnol 49:418–426
- Lee JS, Bae JH, Yoo SO (1993) Useful Plant Resources in Mt. Moak Sited Jeonlabuk-do, Korea. J Kor Flower Res Soc 2:55–72
- Lee JS, Choi BH (2006) Distribution and red data of wild orchids in the Korean Peninsula. Kor J Plant Taxon 36:335–360
- Lee K (1980) The wild orchids of Korea. Jungsung publisher. Seoul. Korea. p. 193
- Lee NS (2011) Illustrated flora of Korean Orchids. Ewha Womans University publisher. Seoul. Korea. p. 208
- Lee YN (2006) Flora of Korea. Gyohaksa, Seoul
- Magdalena K, Anna B (2005) Morphogenesis of *Lilium martagon* L. explants in callus culture. Acta Biol Craco Series Bot 47:65–73
- Mathews VH, Rao PS (1980) In vitro multiplications of *Vanda* hybrids through tissue culture technique. Plant Sci Lett 17:383–389
- Miyoshi K, Mii M (1988) Ultrasonic treatment for enhancing seed germination of terrestrial orchid, *Calanthe discolor*, in asymbiotic culture. Scientia Horticulturae 35:127–130
- Miyoshi K, Mii M (1995a) Phytohormone pre-treatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by the terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae), in asymbiotic culture. Scientia Horticulture 63:263–267
- Miyoshi K, Mii M (1995b) Enhancement of seed germination and protocorm formation in *Calanthe discolor* (Orchidaceae) by NaOCl and poly phenol absorbent treatments. Plant Tiss Cult Lett 12:267–272
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473–479
- Pan MJ, van Staden J (1998) The use of charcoal in in vitro culture-a review. Plant Growth Regul 26:155–163
- Park SY, Murthy NH, Paek KY (2000) In vitro seed germination of *Calanthe sieboldii*, an endangered orchid species. J Plant Biology 43:158–161
- Takayama S, Misawa M (1979) Differentiation in *Lilium bulbocaulis* grown in vitro: Effect of various cultural conditions. Physi Planta 46:184–190