

玉花蘭(東洋蘭系) 根莖의 組織 培養時 生育과 分化에 미치는 NAA, BA 및 溫度處理의 影響

李 宗 錫

Effect of NAA, BA and Temperature Alternating on
Growth and Shoot Differentiation of *Cymbidium*
niveo-marginatum Makino (Oriental Cymbidium) Rhizome *in Vitro*

Lee Jong-suk

Summary

Okwhalan (*Cymbidium niveo-marginatum* Makino) native to China is one of the oriental terrestrial orchids, and is characterized by very sweet floral scent. Like other oriental orchids, Okwhalan has a slow growing habit and vegetative or seed propagation is very difficult, in general.

Therefore, this experiment was conducted for mass-propagation of Okwhalan by using rhizomes obtained from germinated seeds and to determine the effects of single and combined treatments of NAA and BA, and alternative treatments of low ($15\pm 1^\circ\text{C}$) and high ($28\pm 1^\circ\text{C}$) temperature on rhizome growth and shoot differentiation in the MS medium.

NAA at $5\text{mg}/\ell$ was most effective for growth and branching of rhizomes. Higher BA concentrations than $1\text{mg}/\ell$ stimulated shoot differentiation, and shoot numbers increased as the concentrations increased. However, the combined concentration of $5\text{mg}/\ell$ BA and 0.1 NAA was most effective for shoot formation.

In case of alternative treatments of low and high temperatures on the rhizomes *in vitro*, high temperature ($28\pm 1^\circ\text{C}$) inhibited rhizome growth and shoot differentiation as a period of treatment was

longer. Even though the treatment of high first and low temperature last slightly stimulated shoot differerntiation, continuous maintenance of temperature at $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ was most effective for shoot formation.

序 論

中國의 內陸地方이 原產地인 玉花蘭(*Cymbidium niveo-marginalum* Makino) (彭, 1978, 最新園藝大辭典編集委員會, 1983)은 香氣가 좋은 一莖 多花性의 地生蘭(terrestrial orchid)으로서 寒蘭(*Cymbidium kanran*), 春蘭(*Cymbidium virensens*), 建蘭(*Cymbidium ensifolium*), 素心蘭(*Cymbidium gyokuchin* var. *sosin*), 一莖九萃(*Cymbidium faberi*), 報才蘭(*Cymbidium hosai* 等과 더불어 所謂, 東洋蘭으로 取扱되고 있는데 生育과 繁殖 速度가 매우 더딘 特徵을가지고 있는 植物이다. 現在 우리나라에서 栽培되고 있는 玉花蘭은 大部分이 日本이나 台灣으로부터 輸入, 供給된 것들이며 一部 極小數가 國內에서 포기나누기(分株) 方法에 依하여 繁殖되는 以外에 別다른 方法이 없는 實情이다. 玉花蘭 뿐만아니라 餘他 東洋蘭들도 마찬가지로의 實情 이지만 寒蘭(李, 1982, 1984), 春蘭(Ueda and Torikata, 1970a), 建蘭(鄭 等, 1983), 金陵邊(Ueda and Torikata, 1970b) 等에서 試圖되었던 바, 種子의 無菌發芽를 通하여 根莖을 獲得하고 이들을 增殖시킨 다음, 多數의 植物體를 分化 시키고자 하는 實驗들이 進行 되었다. 그런데 溫帶產 地生의 *Cymbidium*屬 植物들은 種子를 無菌의으로 播種하여 發芽된다 할 지라도 熱帶產 *Cymbidium*屬 植物들과는 달리 짧은 期間의 protocorm 形成段階를 거치고 長期間의 根莖 形成段階를 經過한 後에 根莖의 先端部에서 shoot가 形成(Kano, 1971) 되는데 이들 根莖은 cytokinin의 生成能力이 낮기 때문에 shoot의 形成이 어렵다(Ueda and Torikata, 1970a). 그렇기 때문에 外生의 cytokinin類를 人爲의으로 供給하여 보다 빠른 時日內에 多數의 shoot를 發生 시키면서 새로운 植物體를 養成하고자 하지만 지금까지 玉花蘭에 關해서는 이에 對한 研究가 進行된 바가

없었다. 그런데 지금까지 이루어진 研究結果들을 綜合해 볼때 同種의 *Cymbidium*이라 할지라도 研究者에 따라 適用되는 生長調節物質의 濃度가 다소 달랐으며, 더우기 異種間에는 各기 外生의 cytokinin類나 auxin類에 對한 反應이 서로 다르다는 것을 알 수 있었다.

따라서, 本 實驗은 玉花蘭의 根莖培養時 BA와 NAA의 濃度別 單用 또는 混用添加가 根莖의 生育과 shoot의 分化에 미치는 效果를 究明함과 同時에 高溫과 低溫 處理가 生育과 分化에 미치는 影響을 알아보고자 實驗을 實施 하였다.

材料 및 方法

本 實驗에 使用된 根莖은 1985年 8月 開花된 것을 自家受粉시킨 後, 1986年 7月에 種子를 採取하여 無菌의으로 播種한 다음, 根莖을 獲得하고 이들을 Murashige and Skoog(1962)의 固體培地에서 增殖시킨 것을 利用 하였다. 培地는 Murashige and Skoog(MS)의 基本培地에 peptone 2g/l, sucrose 30g/l, agar 7.5g/l 을 添加하고 pH는 5.3으로 調整하였다. 한편 NAA(α -naphthyl acetic acid)와 BA(6-benzyl amino purine)는 各各 0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0mg/l의 濃度를 單用과 混用으로 培地에 添加하였으며 容器는 直徑이 약 9cm되는 Lab Tek petridish에 培養液을 30ml씩 注入하고 petridish當 길이가 1.5cm되는 根莖 3個씩 置床한 것을 1反覆으로 하여 5反覆으로 實驗을 實施하였다. 培養條件은 光度 約 2,000lux, 溫度 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, 日長 16hrs/day되는 곳에서 80日間 生育시킨 다음, 根莖의 生體重, 分枝數, 完全한 shoot의 數와 分化 初期의 shoot數를 調査하였다. 溫度 處理는 高溫(28°C)과 低溫(15°C) 條件에서 實施하되 高溫處理 後 低溫, 低溫處理 後 高溫을 各各 2, 4, 8週씩 處理한 다음, $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 條件에서 培養하였고 對照區는 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에

서 계속적으로 培養 하였다. 培地의 造成 및 培養 條件은 앞서 實施한 實驗方法과 同一하게 하였다. 培養期間은 1986年 9月부터 1987年 2月까지 溫度 處理 期間을 포함하여 5個月이었다.

結果 및 考察

MS培地에 NAA와 BA의 濃度別 單用 또는 混

用添加가 根莖의 生育과 shoot의 分化에 미치는 影響은 Table 1에 나타난 바와 같다. NAA만을 單用으로 使用하였을 境遇, 添加濃度가 높아짐에 따라서 生體重이 增加하고 根莖의 分枝數도 一貫性있게 많아 졌는데 特히 本 實驗에서 處理濃度가 가장 높았던 5.0mg/l에서 生體重이 무거웠고 根莖의 分枝數도 가장 많았다. 그러나 NAA 添加濃度의 增加에 따른 生體重과 分枝數의 一貫性있는 增加추세는 BA를 混用 함으로써 均衡이 깨어졌고

Table 1. Effect of NAA and BA on rhizome growth and differentiation of *Cymbidium niveo-marginatum* Makino cultured for 80days in vitro

Treatment		Fresh weight	No. of rhizome tip	Shoot	
NAA	BA			No. of shoot	No. of initial shoot
-	-mg/l	1/07g	36.8 ea	- ea	- ea
0.1	-	0.67	19.6	-	-
0.5	-	0.62	26.6	-	-
1.0	-	1.04	30.8	-	-
5.0	-	1.18	45.8	-	-
-	0.1	0.65	19.0	-	-
0.1	0.1	0.91	34.0	-	-
0.5	0.1	0.71	23.0	-	-
1.0	0.1	0.69	24.8	-	-
5.0	0.1	0.55	20.6	-	-
-	0.5	0.50	18.6	-	-
0.1	0.5	0.73	31.4	-	-
0.5	0.5	0.66	26.6	-	-
1.0	0.5	0.60	19.4	-	-
5.0	0.5	1.13	33.0	-	-
-	1.0	0.76	-	2.4	29.8
0.1	1.0	1.84	-	4.0	31.2
0.5	1.0	0.90	-	5.4	24.2
1.0	1.0	0.64	-	2.4	17.8
5.0	1.0	0.28	-	1.4	7.4
-	5.0	0.54	-	4.6	9.2
0.1	5.0	0.71	-	4.4	23.4
0.5	5.0	0.57	-	6.8	6.0
1.0	5.0	0.26	-	9.6	18.4
5.0	5.0	0.71	-	6.0	15.6

生體重과 分枝數가 減少 되었다. BA와 NAA의 混用 處理區 中에서는 0.1mg/l NAA와 0.1mg/l 또는 0.5mg/l BA를 混用한 區에서 分枝數가 많았다.

玉花蘭과 同屬의 地生蘭인 寒蘭은 2mg/l NAA를 單用하였을 때 根莖의 生育이 좋았고 cytokinin類인 kinetin을 添加하므로써 NAA 單用時보다 效果가 없었으며(Kokubu 等, 1980), 새로운 根莖의 生育은 0.1ppm과 1.0ppm NAA 添加에서 좋았고(李, 1982, 1984), 春蘭의 根莖 培養時에도 1.0ppm NAA가 가장 좋았다는 報告(Hasegawa and Masanori, 1987)로 미루어 볼때 NAA의 單用處理가 根莖의 生育에 效果의이었던 것은 事實이지만, 玉花蘭의 境遇는 寒蘭이나 春蘭보다도 높은 濃度를 要求하는 것으로 생각 되었다. 한편 BA處理는 生體重이나 根莖의 分枝數가 減少되었고 處理濃度가 높아짐에 따라서 그 程度가 더욱 심하게 나타났지만 shoot의 發生을 促進 하였는데 1.0mg/l 以上の 濃度에서 이루어졌고 5.0mg/l 處理區에서는 그 數가 더욱 增加 되었다. 既 發生된 shoot의 數와 發生初期 狀態에있는 shoot의 數를 合算하여 考察해 볼때 BA單獨 處理區에서 보다는 1.0mg/l BA와 0.1mg/l NAA를 混用處理하는 것이 shoot의 發生數가 많아짐을 알 수 있었다(Table 1, Fig. 1). 寒蘭의 器官分化는 0.01~1.0mg/l의 kinetin과 1.0mg/l NAA를 混用處理 하였을 境遇에 shoot의 發生이 促進 되었고(鄭 等, 1985) shoot의 發生에는 光線과 cytokinin이 必須의므로 作用하며(李 等, 1984, 長谷川, 1987), 春蘭(Ueda and Torikata, 1969, 1970b), *Cymbidium insigne*나 *Cymbidium pumilum*(Ueda and Torikata, 1970b) 等 地生의 *Cymbidium*類 뿐만아니라 熱帶產 *Cymbidium*(楠元, 1978), *Calleya*(Kusumoto, 1979), 기타 植物(Murashige, 1974)에 있어서도 cytokinin은 shoot의 分化를 促進한다는 事實은 이미 밝혀진 바 있다. 玉花蘭에 있어도 餘他 東洋蘭類나 洋蘭類처럼 cytokinin은 shoot의 分化를 促進하고 添加濃度가 높아짐에 따라서 shoot의 分化數가 增加되었을 뿐만아니라 分化에 所要되는 期間이 短縮되었다. 그러나 分化된 shoot

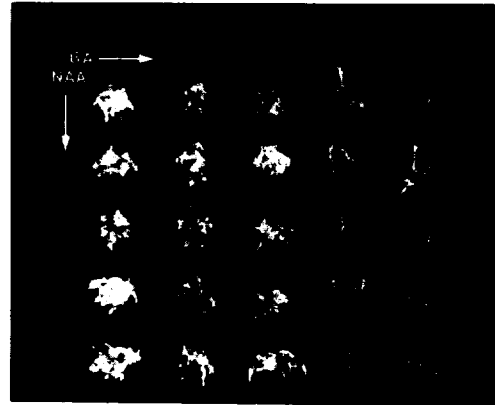


Fig. 1. Effect of NAA, BA and their combinations on rhizome growth and shoot differentiation of *Cymbidium niveo-marginatum* Makino cultured for 80days in vitro
From left to right: BA 0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0mg/l
From top to bottom: NAA 0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0mg/l

의 크기가 작아지고 濃度가 지나친境遇에는 shoot한 的 分化만 多數가 이루어질뿐, 完全한 植物體로 成長하지 못하였고, 發根이 되지 않는 現象을 觀察할 수 있었기 때문에 10mg/l BA 以上の 高濃度 處理는 바람직하지 못한 것으로 생각되었다.

in vitro 狀態에서 高溫과 低溫處理가 根莖의 分枝數와 shoot의 分化에 미치는 影響을 究明하고자 實施한 實驗 結果를 보면 23℃를 계속적으로 維持시킨 것이 分枝數가 많았다. 先 低溫處理, 後 高溫處理區 또는 이와 反對로 處理한 境遇 모두 23℃ 處理區에 比하여 分枝數가 減少 되었는데 그 中에서도 8週間 低溫處理 後에 다시 8週間 高溫處理한 것이 가장 低調하였다.

한편 低溫處理의 先, 後 順序에 따라서 根莖의 生育과 分枝數에 큰 差異가 있었는데 低溫處理를 나중에 實施하는 것이 먼저 實施한 것보다 좋지만 역시 23℃를 계속 維持한 對照區보다는 低調하

였다.

根莖의 分枝數는 모든 處理區에서 BA 添加區에 比하여 NAA 添加區에서 훨씬 많았고 (Table 2) shoot의 分化는 NAA 添加區에서는 전혀 이루어지지 않았던 反面에 1.0mg/l BA 添加區에서 이루어졌다 (Fig. 1).

이러한 結果로 보아 shoot의 分化에는 溫度의 影響을 받는다고 보다는 역시 BA가 作用하고 있음을 알 수 있었고 (Table 3) 寒蘭의 根莖 培養時 shoot의 發生은 cytokinin에 依하여 이루어 진다 (李 等, 1984)는 事實과도 一致하고 있었다.

in vitro 狀態의 根莖은 28°C의 高溫 處理 期間이

Table 2. Effect of different temperature alternating, 1mg/l of NAA and BA on rhizome tip formation in vitro

	Rhizome tip						
	23°C	15°C	→	28°C	28°C	→	15°C
	Continue	2	4	8	2	4	8 weeks
NAA							
1.0mg/l	27.4	16.8	18.6	9.8	15.3	19.0	23.0 ea
BA							
1.0mg/l	11.2	1.6	1.9	2.7	4.7	4.0	6.1 ea

Table 3. Effect of different temperature alternating, 1mg/l of NAA and BA on shoot differentiation in vitro

	Rhizome tip						
	23°C	15°C	→	28°C	28°C	→	15°C
	Continue	2	4	8	2	4	8 weeks
NAA							
1.0mg/l	-	-	-	-	-	-	-
BA							
1.0mg/l	3.8	3.6	2.4	1.9	1.0	3.0	2.3 ea

길어 질수록 shoot의 發生이 抑制 되었고 特히 低溫 處理 後에 高溫 處理하는 境遇, 高溫 處理 期間中에 根莖이 枯死되는 現象을 觀察할 수 있었는데 이는 급작스런 高溫으로 말미암아 根莖이 stress를 받은 것으로 판단되며 高溫 處理 後에 곧 低溫 處理를 할 境遇에는 stress를 받지 않았던 것으로 미루어 볼때 이들 根莖은 高溫에 弱하다는 것을 證明해 주고 있었다. 이를 뒷받침 해 줄 수 있는 研究 結果로는 春蘭의 境遇, 開花期의 氣溫이 18~19°C이며 自生地에서 -13°C 以下の 氣溫에서도

生存(李와 李, 1983) 할 수 있고 熱帶地方產 *Cymbidium*(洋蘭)의 in vitro 培養體를 5°C에서 3個月間 저장한 後, 다시 培養하여도 shoot 形成率이 90% (田中等, 1983) 이었던 事實로 미루어 볼때 低溫에 견디는 힘이 強하다는 것을 알 수 있었다. 結果적으로 玉花蘭 根莖의 in vitro 培養體는 28°C 程度의 高溫 處理 stress로 因하여 shoot의 分化數가 減少되었고 15°C 程度의 低溫 處理는 高溫에서와 같이 決定的인 影響을 주지 않는다는 事實을 알 수 있었다.

摘 要

中國이 原產地인 玉花蘭(*Cymbidium niveo-marginalum* Makino)은 地生의 *Cymbidium*屬 植物이며 香氣가 매우 좋은 東洋蘭의 一種으로서 生長이 더디고 繁殖이 어려운 植物이다. 本 實驗은 玉花蘭의 多量 增殖을 目的으로 種子를 無菌的으로 播種하여 얻어진 根莖을 培養할 境遇, MS培地에 NAA와 BA의 濃度別 單用 및 混用添加 效果와 培養時에 高溫(28±1°C)과 低溫(15±1°C)의 交互處理가 根莖의 生育과 shoot의 分化에 미치는 影響을 究

明하고자 하였다.

根莖의 生育과 分枝數는 MS培地에 5.0mg/l NAA를 添加하는 것이 좋았고, shoot의 分化는 1.0mg/l 濃度 以上の BA를 添加하는 境遇에 이루어 졌으며 BA의 添加濃度가 높아짐에 따라서 shoot의 分化數가 增加 되었지만 5.0mg/l BA와 0.1mg/l NAA를 混用하는 것이 가장 效果의 있었다.

in vitro 狀態의 根莖을 高溫과 低溫에 交互 處理할 境遇, 28°C의 高溫處理는 處理期間이 길어질 수록 生育과 shoot의 分化에 阻害를 招來하였고 先 高溫, 後 低溫處理를 할 境遇, shoot의 分化가 多少 增殖되긴 하였지만 23±1°C를 持續的으로 維持시키는 것이 가장 좋았다.

引 用 文 獻

- 最新 園藝大辭典 編集委員會. 1983. 最新園藝大辭典 第3卷. p.228. 誠文堂新光社. 東京.
- 鄭載東·全在琪·崔修玉. 1983. 建蘭(*Cymbidium ensifolium*) 種子의 無菌培養(Ⅱ). peptone 및 tryptone, 糖, 寒天, charcoal, coconut milk의 濃度와 pH, 明暗處理가 rhizome의 生育 및 器官分化에 미치는 影響. 韓國園藝學會 論文發表要旨 1(2): 54-55.
- 鄭載東·全在琪·金聖洙·李宗錫. 1985. 自生 寒蘭(*Cymbidium kanran*)의 rhizome 生長과 器官分化. 韓國園藝學會誌 26(3): 281-287.
- 田中道男·光崎伸和·五井正憲. 1983. 란科 植物의 in vitro 培養體의 低溫低藏에 關する研究 (第1報) シンピシウムの 莖頂および PLB의 冷蔵. 日本園藝學會 秋季發表要旨: 372-372.
- 長谷川 燿. 1987. 東洋系 シンピシラム의 繁殖에 關する研究. 香川大學農學部紀要 第50號. p.108.
- Hasegawa, A. and G. Masonari. 1987. Rhizome formation in *Cymbidium goeringii* Reichenbach fil. and *Cymbidium kanran* Makino in shoot-tip culture. J. Japan Soc. Hort. Sci. 56(1): 70-78.
- Kano, K. 1971. Seed germination of oriental cymbidium and their stoot tip culture. Pro. 6th World Orchid Conference. p.133-142. Halsted Press. Sydney.
- Kokubu, T., Y. Kaieda and Y. Higashi. 1980. Organogenesis in sterile culture of oriental cymbidium, *Cymbidium kanran* Makino. Mem. Fac. Agri. Kagoshima Univ. 16: 53-64.
- 楳元 守. 1978. 生長調節物質의 組合せ添加せ有機物의 添加가 *Cymbidium* protocorm의 增殖と 器官形成에 及ぼす 影響. 日本 園藝學會雜誌 47(3): 391-400.
- 楳元 守. 1979. 生長調節物質의 組合せ添加せ有機物의 添加가 *Cattleya* 幼苗의 生長에 及ぼす 影響. 日本 園藝學會雜誌 47(4): 492-501.
- 李宗錫. 1982. 韓國自生 寒蘭의 特性, 生育環境 및 繁殖에 關한 研究. 高麗大 大學院 博士學位 論文. p.145.
- 李宗錫. 1984. 濟州道의 自生寒蘭. 亞熱帶農業研究 創刊號. p.157-168. 濟州大 亞熱帶農業研究所.

- 李宗錫·李炳基. 1983. 韓國自生蘭의 生態에 關한 研究—湖南地方의 野生春蘭을 中心으로—. 濟州大 論文集 16(自然科學篇): 59-69.
- 李宗錫·郭炳華·李炳基·鄭載東. 1984. 韓國의 自生寒蘭에 關한 研究 I. 寒蘭의 根莖培養에 關하여. 韓國園藝學會誌 25(2): 129~135.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant Physiology 25: 135-166.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- 彭雙松. 1978. 台灣蘭蕙. p.178. 富蕙圖書出版社. 臺北.
- 島崎一彦·上本俊平. 1984. シンゼシラムの 器官 形成に關する研究 (第1報) 生長調節物質の 影響. 日本園藝學會 秋季發表要旨: 358-359.
- 上田 博·鳥瀧 博高. 1979. Cymbidiumの生長點培養における器官形成(第3報) シュンランの rhizome-tip からの shoot 形成過程についての 組織學的研究. 日本 園藝學會雜誌 38(3): 56-60.
- Ueda, H. and H. Torikata. 1970. Organogenesis in the meristem cultures of Cymbidiums. II. Study on cytokinin activity in the extracts from the protocorm. J. Japan Soc. Hort. Sci. 39(2): 104~107.
- Ueda, H. and H. Torikata. 1970. Organogenesis in the meristem cultures of Cymbidiums. III. Effects of light and culture medium on adventitious root formation. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 39(4): 73-77.