

무엽란의 기내 종자 발아로부터 개화에 관한 연구

강윤숙¹, 소인섭¹, 김인중², 강 훈¹

¹제주대학교 생명자원과학대학 생물산업학부 원예환경전공

²제주대학교 아열대농업생명과학연구소

A Study for Mass Propagation System from Seeding to Flowering in Seeding of *Cymbidium nipponicum*

Yoon-Sook Kang¹, In-Sup So¹, In-Jung Kim², Hun Kang¹

¹Industry of Biology, College of Applied Life Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

²Research Institute for Subtropical Agriculture and Biotechnology, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

ABSTRACT

This study established its mass propagation system from seeding to flowering *in vitro* of *Cymbidium nipponicum*. In germination of *Cymbidium nipponicum*, the liquid KC medium was effective, and Peters 3g/ℓ medium and Kyoto medium which include the activated charcoal was effective for rhizome culture.

The treatment in dark was more effective for the growth of rhizome, the number of flowering, and the length of flower stalk than the treatment in light. However, the treatment in light was more effective for the number of flower bud being formed than the treatment in dark.

The two examination - TTC test and *in vitro* culture - identified that its seed obtained from self-pollination *in vitro* is being germinated as normal.

서 론

난과식물(Orchidaceae)은 전 세계적으로 800여 종, 30,000여 종이 있다(Bailey와 Bailey, 1976). 우리나라에는 전국적으로 92종, 11변종, 7품종 등 총 110종류의 야생란이 분포되어 있다. 이중 상록성인 것은 한란, 보춘화, 새우난초, 사철란 등 39종으로 약 35%를 차지하고 있으며, 낙엽성인 야생란류는 복주머니란, 자란, 은난초, 금난초, 닭의난초, 잠자리란초 등 모두 71종으로 약 65%를 차지하고 있다(이, 1984).

무엽란(*Cymbidium nipponicum*)은 부생식물로 잎이 없고, 지하근경에서 꽃대가 출현하여 흰색 바탕에 홍자색의 꽃이 핀다. 산림내의 부숙된 식물체에 기생하여 자라는 부엽성 부생종으로 지하경은 길이 15 cm 정도로 길며 백색이고 육질이 드문드문 분지하고 가는 털과 삼각상의 인편이 있으며 그 끝에서 꽃눈이 발생된다. 줄기는 높이 10~30 cm로 직립하고 다소 작은 털이 있으며 기부가 짧은 초로 된다. 포는 길이 0.5~1 cm로 막질로 넓은 피침형이며 끝이 날카롭다. 꽃은 7월 상순~8

월 중순에 줄기 끝에 2~6개가 총상화서로 달리며 (Avadhani 등, 1994), 환경부에서는 특정 야생 식물 제 49호로 지정, 보호하고 있다(제주도, 1999).

제주도(해발 400 m 이하), 남해안 도서(진도·남해도·미륵도·거제도) 및 남부지방(전남, 전북 고창, 경남 양산·울산, 경북 포항) 등지에 소수가 자생한다. 또한 세계적으로는 일본, 인도차이나 반도, 인도, 뉴기니까지 광범위하게 분포하는 남방계 식물이다(김 과 이, 1997).

일반적으로 난과식물은 단자엽 식물 중에서 가장 진화한 식물군으로 분류되는데 증거로는 거의 모든 종류가 타가수분을 함으로써 종의 분화와 진화가 다양하게 발전된 것으로 알려져 있다(한, 1992). 특히 *Cymbidium* 속 난은 열대로부터 온대 지방까지 광범위한 분포지역을 점하고 있는바 난과 식물군 중에서도 가장 진화한 속에 해당된다.

따라서 무분별 도체에 의하여 멸종위기에 있는 무엽란을 대상으로 기내 종자 발아로부터 개체증식 및 개화 단계까지의 성숙 근경 생산에 대한 일련의 시험을 단계별로 수행하였다.

재료 및 방법

무균발아 실험은 자연에서 자가수정 후 형성된 성숙한 꼬투리를 채취하여 사용하였다. 종자는 NaOH 10%에 소독을 한 후 O₂의 특수성을 감안해서 종피의 Lipid(기름성분)를 제거하기 위해 KOH 0.1N에 1시간 침지하여 상피처리를 하였다. 배지는 MS, Kyoto, Knudson C(이하 KC) 배지에 설탕 30g/l 첨가를 기본으로 pepton의 첨가 여부와 액체 고체배지로 나누어 시행하였는데 배지의 조성은 다음과 같다.

- 1) MS + sucrose 30g/l + agar 7g/l
- 2) MS + sucrose 30g/l
- 3) MS + sucrose 30g/l + pepton 3g/l + agar 7g/l
- 4) MS + sucrose 30g/l + pepton 3g/l
- 5) Kyoto + sucrose 30g/l + agar 7g/l
- 6) Kyoto + sucrose 30g/l
- 7) Kyoto + sucrose 30g/l + pepton 3g/l + agar 7g/l

- 8) Kyoto + sucrose 30g/l + pepton 3g/l
- 9) KC + sucrose 30g/l + agar 7g/l
- 10) KC + sucrose 30g/l
- 11) KC + sucrose 30g/l + pepton + agar 7g/l
- 12) KC + sucrose 30g/l + pepton

이상의 배지를 조제 후 pH 5.5~5.8로 보정하여 가압멸균기를 이용하여 121℃에서 20분간 멸균하였다. 배양환경은 주간은 16시간, 24±2℃, 광은 형광등을 이용하여 3,000 lux의 조건이었고 야간은 8시간, 18±2℃의 조건이었다. 배양용기는 60 mL의 test tube를 이용하여 20반복으로 하였고 파종 5개월 후에 발아수를 조사였다.

근경배양 실험의 배지는 MS, Kyoto, KC, Peters 3g/l를 기본으로 활성탄의 유무로 나누어 실시하였는데 이때 Peters의 사용은 Kyoto 배지에 들어가는 Hyponex에 비해 가격이 1/3정도로 저렴하여 경제적인 측면을 고려하여 실행하였고 배지의 조성은 다음과 같다.

- 1) MS + sucrose 30g/l + agar 7g/l + Activated charcoal 2g/l
- 2) MS + sucrose 30g/l + agar 7g/l
- 3) Kyoto + sucrose 30g/l + agar 7g/l + Activated charcoal 2g/l
- 4) Kyoto + sucrose 30g/l + agar 7g/l
- 5) Knudson + sucrose 30g/l + agar 7g/l + Activated charcoal 2g/l
- 6) Knudson + sucrose 30g/l + agar 7g/l
- 7) Peters 3g/l + sucrose 30g/l + agar 7g/l + Activated charcoal 2g/l
- 8) Peters 3g/l + sucrose 30g/l + agar 7g/l

이상의 배지를 조제 후 pH 5.5~5.8로 보정하여 가압멸균기를 이용하여 121℃에서 20분간 멸균하였다. 배양환경은 무균발아 시험과 동일하였고, 배양용기는 600 mL의 용기를 이용하여 20반복으로 하였다.

근경의 암배양 실험은 근경배양에서 가장 성적이 좋았던 Kyoto + Sucrose 30g/l + agar 7g/l + Activated charcoal 2g/l 배지를 이용하여 빛이 전혀 투과하지 않는 박스에 넣어 배양을 하였다. 배양온도는 명배양과 동일한 16시간 24±2℃, 8시간

18±2°C의 조건이었고 20반복으로 처리하였다.

기내에서 형성된 종자의 발아력 검정을 위한 실험은 종자의 염색을 통한 검정법과 종자의 파종에 의한 검정법 두 방법을 이용하였다.

종자의 염색을 통한 검정은 TTC검정법을 이용하였다.(Singh, 1981). Triphenyl tetrazolium chloride(TTC, C₁₉H₁₅ClN₄) 1% 수용액에 넣고, 30°C의 암조건에서 18~24시간 보관하여 관찰하였다. Triphenyl tetrazolium chloride 수용액의 pH는 6.5로 보정 후, 갈색병에 넣어 냉장고에 보관하여 사용하였다.

종자의 파종에 의한 검정에서는 종자의 무균발아에서 성적이 좋았던 KC + sucrose 30g/l + agar 7g/l 배지에 종자를 파종하여 발아력을 검정하였다.

결과 및 고찰

자연에서 자가수정 후 형성된 무엽란 종자 발아실험의 결과는 Fig. 1와 같다. 무엽란의 발아 실험에서는 KC배지가 성적이 가장 좋았고 MS배지에서 가장 낮았다. Peptone을 첨가한 배지에서는 오히려 성적이 낮았고, 액체배지가 고체배지보다 성적이 좋았다.

이와 같이 무배유 종자로서 종을 유지하고 있는 난과식물은 종자발아양상이 각각 다르게 나타나는데, 연구대상 식물에 대한 각각의 발아 요건들을 확립하는 것은 후속되는 배양의 목적을 충족시킬 수 있는 필수단계라 할 수 있다. 본 시험의 결과에서 보듯이 무엽란은 Knudson C배지가 다른 배지에서 보다 가장 좋은 발아를 보인 것은 공시한 3종의 종자발아용 배지를 비교한 볼 때 Hyponex는 원예용 복비로 시판되고 있는 제품이므로 일단 N:P:K의 수준이 10:13.2:16.6 mg/l로 환산될 수 있고 KC배지와 MS배지를 비교해 볼 때 (George et. al. 1987), 8.41:5.51:1.83과 7.0:0.82:1.93으로 나타나며 배지에 함유된 총 이온수는 33.39 mg/l와 16.79 mg/l로 구성된다. 이러한 배지의 조성으로 볼 때 KC배지에서 발아가 가장 양호했던 결과를 N:P:K 수준의 변화보다는 배지에 함유된 총이온수가 발아에 촉진적 결과를 나타낸 것이 아닌가 사료된다.

또한 종자발아가 어려운 동양란계 심비디움속

의 발아 촉진법으로 우선 소와 이(1985)의 한국춘란 종자발아 시험에서 밝힌 바와 같이 종자를 상피처리하여 투수촉진 및 휴면물질제거에 Ca⁺⁺ 이온이 효과적이었다는 결과를 감안할 때 우선 KC배지가 MS배지보다 함유하고 있는 배지의 총이온수의 우위성에 기인된다고 볼 수 있으며 Ca⁺⁺ 이온의 양도 KC배지가 8.46 meq/l 인데 반하여 MS배지는 1.21 meq/l 이므로 KC배지가 7배 정도 Ca⁺⁺ 이온의 수가 많으므로 발아촉진효과를 얻었음을 미루어 알 수 있다. 따라서 앞으로 배지의 이온 총함유량과 Ca⁺⁺ 이온의 수적 변화에 따른 난과식물의 종자발아 촉진 효과에 대한 정밀적 검토가 요망된다 하겠다.

한편, 배지의 물리성 즉 고체, 액체 배양에 따른 발아력 차이는 역시 무엽란도 온대원산이므로 춘란, 한란과 같이 휴면물질을 함유하고 있음을 시사한다 하겠다. 또한 발아의 최소요건 즉 종피를 투과하여 배와 배유에 접촉되어야만 하는 부분의 공급에 있어 액체배지 자체가 갖는 구조적 장점 때문에 고체배지보다 월등한 성적을 얻은 것으로 사료된다.

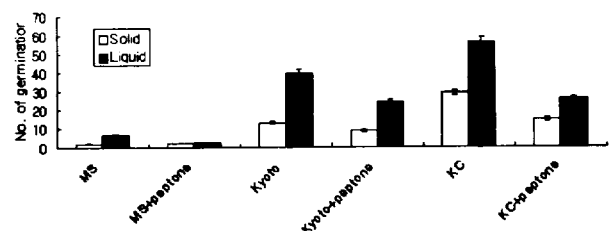


Fig. 1. Comparison of various seed germination medium for the Cymbium nipponicum. See material and methods.

무엽란의 근경배양 실험에서는 근경의 생장은 Peters 3g/l와 kyoto배지에 activated charcoal을 첨가한 배지에서 양호하였다(Table 1., Fig. 2.). 반면, 종자발아실험에서 성적이 좋았던 KC배지에서는 근경의 생육이 매우 저조했다. 모든 처리에서 다른 온대산 *Cybidium*속의 근경과 달리 근경이 신장 성장하기 보다는 분지를 많이 발생하는 경향을 보였다. 본 시험의 결과로 제시된 활성탄 첨가 효과는 일반적으로 알려진 사실로서 동양란계 즉 온대 원산 *Cymbidium* 난들의 경우 근경생육에 효과적인 결과와 유사한 경

향을 나타내고 있다. 따라서 부생란으로 무엽란 자체가 영양분 즉 유기물을 합성할 수는 없지만 동양란계 심비디움의 특성인 종자의 휴면(Arditti, 1967) 등이 문제시되며 근경생육 또한 활성탄 첨가 효과가 인정되는 바 무엽란 자체는 분류학상 심비디움속에 포함되는 것 또한 증명 될 수 있는 근거를 제시할 수 있겠다.

Table 1. Effect of activated charcoal(A·C) with various culture media on the *Cymbidium nipponicum* rhizomes as grown 4 months.

Treatment ¹⁾	Growth degree	
	without A·C	with A·C
KC	+	+
MS	+	+
Peters 3g/l (10:30:20)	++	+++
Kyoto (6.5:6:19)	++	+++

¹⁾ Seed material and methods.



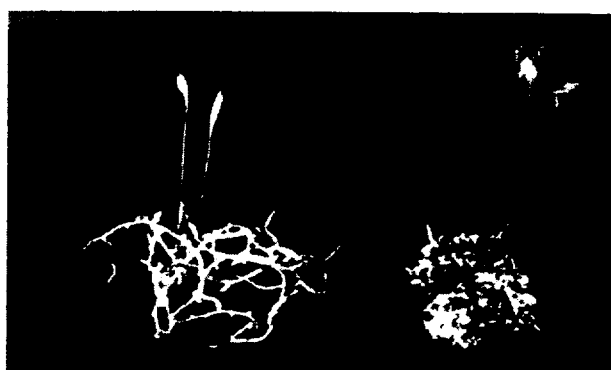
Fig. 2. Photo showing rhizome growth status of the *Cymbidium nipponicum* as affected by culture media.

난과 식물에는 동일한 종·속이라 하더라도 각각의 발아와 묘의 생육을 주관하는 요인들이 다르기 때문에 개개의 대상식물에 따른 연구가 필요하다. 난류 배양시 온대산 *Cymbidium*류는 열대산 *Cymbidium*류와 달리 종자의 발아율이 지극히 저조하고 rhizome화하여 신아나 뿌리의 분화

가 잘 이루어지지 않으며, 생장점 배양을 하더라도 근경으로 분화되고 생장속도도 매우 느리다. 온대산 *Cymbidium*류를 대량번식 하고자 할 때는 근경을 급속히 증식해야 된다(Ueda 와 Torikata, 1969). 근경의 급속한 증식을 위한 배양용 배지의 종류로서는 White배지(White, 1963), MS배지(Murashige와 Skoog, 1962) 및 Kyoto 배지(Kano, 1965)가 일반적으로 사용된다.

Table 2. Effect of light and dark condition on rhizome growth and flowering in culture of the *Cymbidium nipponicum*.

Treatment	Rhizome weight (g)	No. of flower buds	No. of opened flowers	Flower stem length (cm)	Flower stem thickness (mm)
Dark	11.9	11	8	8.5	3.4
Light	6.1	25	5	2.3	2.0



Dark Light

Fig. 3. Photo showing rhizome growth and flowering response to light and dark condition in rhizome culture of the *Cymbidium nipponicum*.

근경의 암배양 실험에서는 근경의 형태가 명배양 실험에서와는 달리 다른 온대산 *Cymbidium*속과 같은 형태로 자랐다(Fig. 3.). 암배양 실험에서는 명배양보다 화뢰의 발생 수는 적었으나 근경의 무게, 개화수, 화경의 길이, 화경의 두께에서 모두 성적이 월등히 좋았다(Table 2.). 명배양에서는 무엽란이 빛에 민감하게 감응하여 화뢰가 발생하는 수가 많았으나 근경이 총생의 형태로 자라 충분한 생장이 못 이루어져 개화수가 작았고

개화된 꽃은 기형의 형태로 나타났다고 사료된다.

이러한 결과 역시 앞선 시험 즉 배지에 활성탄 첨가 시험 결과를 볼 때 무처리보다 월등한 근경 생육 반응을 보인 결과를 우선 꼽을 수 있다. 또한 자연 상태에서의 무엽란 개화 습성을 고려할 때 부엽에서 발아된 근경은 어느 정도의 생육을 거쳐 개화기에 꽃대만을 지상으로 노출시켜 개화하므로 근경생육이나, 종자발아에 광선이 필요가 없음을 알수 있었고 본 시험의 결과 또한 이러한 습성을 반영한다. 그러나 명배양의 경우에는 근경의 생육이 저해되고 짧고 가는 근경의 선단부마다 꽃눈이 착생되는 것으로 보아 광선의 자극이 무엽란의 개화를 유도하고 있음을 시사한다고 볼 수 있다.

적 요

본 연구는 무엽란의 기내 종자과종으로부터 유묘의 개화까지 대량번식체계를 확립하기 위하여 수행되었다.

일반적으로 무엽란의 종자의 발아용 배지로는 KC 액체배지가 가장 성적이 좋았으며, 근경 배양 배지로는 Peters 3g/l 배지와 Kyoto 배지에 활성탄을 첨가한 배지가 가장 성적이 좋았다.

암배양이 명배양보다 근경의 생육과 개화수, 화경에서 성적이 좋았으나 명배양에서 화아발생수가 많았다.

기내배양에서 자연적으로 자가수정되어 얻어진 종자는 TTC검정법과 무균발아법을 통하여 확인한 결과 발아력이 정상적임이 밝혀졌다.

사 사

본 연구는 제주대학교 생명대부설연구실습센터와 아열대농업생명과학연구소의 지원을 받고, 시설을 이용하여 수행한 연구임.

참 고 문 헌

1. Arditti, J. 1992. Fundamentals of orchid biology. pp 485-529. John Wiley & Sons

New York, USA.

2. Avadhani, P. N., H. Nair, J. Arditti and C. S. Hew. 1994. Physiology of orchid flowers. pp.198-238. In: Arditti, J. (ed.). Orchid biology: Reviews and perspectives, VI. John Wiley & Sons, New York.
3. Bailey, L. H. and E.Z. Bailey. 1976. Hortus third. pp. 353-354, 795-796. McMillan Publishing Co., New York.
4. 제주도·제주발전연구원. 1999. 제주도에 자생하는 멸종위기, 보호야생식물, 제주자연환경보고서(2). 나우인쇄출판사, 서울.
5. George, E. E., D. J. M. Puttock and George, H. J. 1987. Plant culture media. pp. 323-326, Exergetics Limited, UK.
6. 한창열. 1982. 식물조직배양학. pp. 68-104. 일조각, 서울
7. Kano, K. 1965. Studies on the media for orchid seed germination. Mem. Fac. Agri. Kagawa Univ. 20:1-70.
8. 김수남, 이경서. 1997. 한국의 난초. pp. 146-421. 교학사, 서울.
9. 이종석. 1984. 한국야생란의 종류와 지리적 분포에 관한 연구. 제주대학교 논문집 19:31-54.
10. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plantarum. 15:473-479.
11. Singh, F. 1981. Differential staining of orchid seeds for viability testing. Amer. Orchid Soc. Bull. 50:416-418
12. 소인섭, 이종석, 1985. 조직배양 기술을 이용한 춘란의 무균발아와 대량번식에 관한 연구. 한국원예학회지 26(4):375-380.
13. Ueda, H. and H. Torikata. 1969. Organogenesis in meristem culture of *Cymbidium* II. Effects of growth substances on the organogenesis in dark culture. J. Japan Soc. Hort. Sci. 38(2): 188-193.
14. White, P. R. 1963. The cultivation of animal and plant cells. pp. 37-53. Ronald Press Co. New York.

