

Cymbidium goeringii 種子의 in vitro에서의 發芽에 關한 基礎的 研究

尹 義 洙

日本進化生物學研究所

Studies on Germination of Seed and Growth of Rhizome in *Cymbidium goeringii* in vitro

Eui Soo Yoon

The Research Institute of Evolutionary Biology, Kamiyoga-2, Setagaya,
Tokyo.

Abstract

The study was conducted to determine the MS orthogonal media and the concentration of plant growth regulator for seed maturation and growth of rhizome from *Cymbidium goeringii*. Germination was well in dark condition, but the growth of rhizome was better under dark than under light condition in MS orthogonal. Sucrose concentration (3%) gave better results than higher ones (6%), and the use of NAA (0.1 ppm) effect significant difference of seed germination. But the growth of rhizome was best in medium containing sucrose concentration (3%) 1 ppm NAA and 1 ppm BA.

緒 言

*Cymbidium goeringii*의 種子是 難發芽性으로 알려져 있다. 단순히 種子中の 胚가 전혀 發育하지 않는 (狹義의 難發芽) 것 뿐만이 아니고, 廣義의으로도 葉이나 根을 分化하기까지의 胚의 各 發育段階에 미치

는 發育停止나 枯死의 現象도 포함하고 있다. *Cymbidium goeringii*의 發芽나 發育에 관한 연구는 Tusukamoto 등 (1963) 과 Ueda (1969a, 1969b, 1970a) 등에 의하여 發芽 및 發育에 관한 연구가 되어졌으나 아직 그 發芽法의 確立이 되어있지 않다. 따라서 本 연구에서는 *Cymbidium goeringii*

Table 1. Medium factors for seed maturation of *Cymbidium goeringii* by L₁₆ MS orthogonal media

Factors		sucrose and Vita- major salts mins			NAA	IAA	GA ₃	BA	Kinetin 2·4D	
Level	1	6 %	0.2	5	0.1ppm	0.1ppm	0.1ppm	0.1ppm	0.1ppm	0.1ppm
	2	3 %	1 ¹⁾	1	1ppm	1ppm	1ppm	1ppm	1ppm	1ppm

1) = MS standard concentration

의 種子로부터 幼菌形成에 이르기 까지의 胚의 各 發育段階에 미치는 營養要求性을 檢討함으로써 그 發芽法을 確立하는 것을 목적으로 行한 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

Cymbidium goeringii 種子中의 胚를 發育 시키기 위한 培地組成의 檢討를 위하여 自家受粉에 의하여 얻어진 種子를 이용하였다. 씨 꼬투리를 Antiformine 10 % 水溶液에서 15分間 滅菌하고, 씨꼬투리를 裂開한 다음 滅菌水를 넣은 비이커에 種子를 넣어 15分間 자력 교반기로 교반시켜 別 均시킨후 Glass filter 로 여과한후 滅菌再蒸留水로 3回 씻은 후 檢討培地에 培養하였다. 培地는 Marashige & Skoog(1962) 培地에 naphtalene acetic acid(NAA) 1ppm, Kinetin 1ppm을 첨가한 培地와 L₁₆ 直交表를 이용하여 MS 培地를 基本으로 하여 NAA, Indol-3-acetic acid

(IAA), gibberellic acid(GA₃), 6-Benzylaminopurine(6-BA), Kinetin, 2·4-dichlorophenoxyacetic acid(2·4-D)를 첨가하여 各의 培地組成을 2水準으로 설정하여 作製하였다(表1). NaOH (1/2M) 및 HCl(1/2M)로 pH를 5.8로 調整한 후, 0.8%의 寒飮을 더해 28 ml의 試驗管에 대해 10 ml씩 培地를 分柱하였다. 알루미늄 호일로 栓을 한후 1kg/cm에서 10分間 加壓멸균을 행하였다. 16種類의 培地 No.1區에서 No.16區까지 播種한후 25 °C ± 1 °C에서 連續照明下에서 배양하고 種子中의 胚發育을 관찰하였다.

또한 L₃₂ 直交表를 이용하여 M&S 培地를 基本으로하여, NAA, Kinetin, BA, GA₃, 2·4-D, ascorbic acid, aspartic acid, tryptophan을 첨가하여, 各 배지 組成을 各 2水準으로 설정하고 (表3) 배지를 作製한후 L₁₆ 直交表 No.6 培地에 과중하여 얻어진 rhizome를 置床하여, 25 °C ± 1 °C 明暗條件에서 배양하고, 各

Table 2. Contrast of Murashige & Skoog media and L₁₆ orthogonal media No.6

	Murashige and Skoog media (mg / l)	L ₁₆ Orthogonal media No.6 (mg / l)
major salts (mean)	370	74
MgSO ₄ · 7H ₂ O	440	88
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1,900	380
KNO ₃	1,650	330
NH ₄ NO ₃	170	34
KH ₂ PO ₄	27.8	5.56
FeSO ₄ · 7H ₂ O	37.3	7.46
Na EDTA	22.3	4.46
MnSO ₄ · 4H ₂ O	8.6	1.72
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.025	0.005
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	0.005
CaCl ₂ · 6H ₂ O	0.83	0.166
KI	6.2	1.24
H ₃ PO ₃	0.25	1.05
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	30,000	60,000
Sucrose		
Vitamins		
inositol	100	500
nicotinic acid	0.5	2.5
pyridoxine Hcl	0.5	2.5
thiamine Hcl	0.1	0.5
glycine	2.0	10.0
Hormone		
NAA		0.1 ppm
BA		0.1 ppm

Table 3. Effect of median factors for rhizome growth of *Cymbidium goeringii* by L₃₂ MS orthogonal media.

Design of experiment	level		Result of after 200 days				
	1	2	growth of rhizome	ramification of rhizome	differen- tiation of bud	differen- tiation of root	die of rhizome
pH	5.8	6.3(g/l)				5.8**	
sucrose	10	40					40**
major salts	1 ¹⁾	1/5					
Hormone							
NAA	0	1 (mg/l)	1 *	1 *			
2·4-D	0	1				1 *	
BA	0	1		1 *	1 *	1 *	0*
Kinetin	0	1					
GA ₃	0	1					1*
Vitamins							
inositol	1 ²⁾	5				5 *	
thiamine Hcl	1	10					1*
pyridoxine Hcl	1	10		1 *			
nicotinic acid	1	10					
glycine	1	10	1 *				
ascorbic acid	0	300 (mg/l)	0 *	0 *			
asparagine acid	0	6					
tryptophan	0	3					

1), 2) : M&S standard concentration.

*, **: significant at 5%, 1% levels, respectively.

의 배지조성에 있어서의 rhizome의 生長에 미치는 主效果를 調査하였다.

結 果

M&S 培地에 NAA 1ppm, Kinetin 1ppm을 첨가한 배지에서는 胚의 發育을 거의 確認 할 수가 없었다. L₁₆ 直交表를 이용하여 作製한 培地, No.1區에서 No.16區까지는 No.1,2,6,10區에서 각각 種子中

의 胚의 發芽가 觀察되어졌다 (Fig.1). 그 중에서도 특히 No.6 區에서의 발아가 매우 우수하였다 (Fig.2). 또한 No.10 區에서는 rhizome 期에 移行되고 부터의 成育이 良好하였다.

L₁₆ 直交表 No.6 培地の 組成은 表 2 에서 알수 있듯이 M&S 培地와 비교하여 無機鹽의 濃度는 1/5, Vitamin 濃度는 5 培, 糖濃度는 2 培였다. 發芽가 良好한 No.6 區의 培地를 播種實驗의 追試로 제공하였다. 이 追試는 明·暗區를 설정하고 光의 影響에 관하여 檢討하였다. 播種後 240 日 제의 調查에서 胚발육이 관찰되어진 것은 明區에서 全體의 21%, 暗區에서 46% 였다. 이 가운데 生存된 胚發育 種子는 明區 에서 14.0%, 暗區에서 36% 였다. 이 發芽된 胚중 胚의 發育除中 또는 rhizome 期 初期의 段階에서 枯死한것은 明區에서 44.8%, 暗區에서 27.4% 였다. 또 이 實驗中, 明區에서는 rhizome 期 初期의 段階에서 葉綠素의 形成이 보여졌다.

L₃₂ 直交表를 利用한 배지에 L₁₆ 直交表 No.6 區에서 얻어진 rhizome 를 置床한 후 200 日째에 rhizome 성장에 미치는 各 培地組成의 主效果를 調查한 結果를 表 3 에 表示하였다. 6-BA, NAA, 2·4-D 는 有效性이 GA₃ 은 阻害性이 확인되었다. 또한 Inositol 은 M & S 培地 標準量의 5 培 (500 ppm) 를 첨가한 배지에서 效果가 있었고 또한 糖은 4%의 농도 보다 1%의 농도에서 좋은 傾向이 보여졌다. 種子의 발아실험에서 는 당의 농도가 6% 일때 양호한 結果

를 보였으나 rhizome 의 生長에서는 4% 농도에서도 阻害的 傾向이 보여졌다.

또한 pH 는 뿌리의 분화에 pH 5.8 에서 pH 6.3 보다 有效를 나타냈으나 무기염류 의 농도는 M&S 배지 표준량과 1/5 의 量과는 별 差가 보이지 않았다. 이상의 結果에 의해 얻어진 培地 즉 M&S 의 표준무 기염류농도에 1%의 당, M&S Vitamin 5 배, NAA 1 ppm, BA 1 ppm 을 첨가하여 pH 5.8 로 조정한 배지를 利用하여 追試를 行하였다. rhizome 을 置床한후 明·暗조 명하에 200 일간 培養한후, rhizome 을 조사한 結果 明區에서는 rhizome 의 길이 가 70 cm, 暗區에서는 15 cm 의 伸長을 보였으며 또한 明區의 培地에서는 rhizome 의 先端에 幼芽가 形成되어지고 많은 根이 分化된 것을 관찰할 수 있었다.

考 察

鳥瀨 (1968) 는 Kundson C (KC, 1946) 培地를 利用한 *Cymbidium* 의 發芽實驗에서 1~3% 에 지나지 않는 發芽結果를 보고 하고 또한 이 배지에 KOH 浸漬處理를 한 結果 發芽率을 40% 程度까지 促進시킬수가 있었다. 또한 萩屋·藤田 (1968), Toritaka 等 (1964, 1969) 은 暗培養이 種子의 發芽에 良好하며 生育이 좋은 것으로 보고하였다. Ueda Torikata (1967, 1969ab) 는 일반적으로 Kinetin 또는 BA 가 Shoot 형성에 양호하며 auxin 類인 NAA 가 root 형성에 효과적 (Ueda, Torikata 1970b,

1972, Withner 1959) 이라고 보고하였다. 본 實驗에서도 *Cymbidium goeringii* 의 種子中의 胚를 發育시키기 위하여는 高濃度의 糖, Vitamin類가 有效함이 증명되어졌다. 또한 種子를 번잡한 前처리를 하지 않고도 배지조성의 검토만으로 40% 以上の 胚 發育을 시킬 수 있음이 확인되었다. 그러나 rhizome의 生育에 있어서는 糖의 高濃度는 沮害效果를 가져오며, 다른 보고들과 마찬가지로 NAA는 Shoot의 형성에, 2·4-D는 芽의 分化에, BA는 Shoot의 分岐와 葉의 分化 그리고 Root의 分化에 效果가 있음이 확인되었다. 또한 Vitamin類는 비교적 고농도에서 Shoot의 형성에 效果가 있음을 보여주었다. 또한 種子의 발육에는 암조건이, Shoot의 형성에는 明조건이 필요함이 확인되었다. 이러한 결과들을 고찰하여 볼때 *Cymbidium goeringii* 의 胚를 發育시키기 위하여는 Vitamin類, 糖類를 主體로한 培地에 種子를 播種하고, 暗條件下에서 培養을 행한후, 胚가 rhizome 期에 들어갔을 때에는 당농도를 낮추고 NAA, BA, 2·4-D를 첨가한 培地로의 繼代가 필요하다고 생각되어진다. 그리고 rhizome 이 어느정도 성숙한 시점에서 암 조건으로부터 명조건으로의 이행에 따라 成育을 촉진시킬수 있다고 생각되어진다. 또한 *Cymbidium goeringii* 의 發芽의 경우 반드시 번잡한 前처리를 필요로하지 않으며 배지조건, 배양조건들의 개량에 의해 비교적 용이하게 종자로부터 다량의 식물체를 얻을수 있을 것으로 판단되어진다. 따라서

앞으로 각 배지조성의 최적농도의 검토, 암 조건과 명조건의 이행시기의 검토가 필요할 것으로 생각되어진다.



Fig.1. Germination of seed after 240days culturing on Ms orthogonal medium.



Fig.2. Growth of rhizome on medium containing NAA(1ppm) and BA (1ppm)

人 用 文 獻

1. KNUDSON, C. 1946. Amer. Orchid. Soc. Bull. 15:214.

2. MURASHIGE, T and F. SKOOG. 1962.
A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *physiol Plant.* 15:473-497.
3. 萩屋薫・藤田哲子 1968. ツンランの種子発芽におよぼす光の影響, 鳥潟博高編, ラン科植物の種子形成と無菌培養, 誠文堂. 新光社, 238-299.
4. 鳥潟博高編 1968. ラン科植物の種子形成と無菌培養, 誠文堂新光社, 65~244
5. TORITAKA, H., Y. SAWA and M. SISA.
Nonsymbiotic germination and growth of the orchid seeds.
L. Studies on the medium and additive for germination of seed in *Cymbidium*. *Jour. Soc. Hort. Sci.* 34:63-70.
6. TSUKAMOTO, Y., K. KANO and T. KATSUURA. 1963.
Instant media for orchid seed germination. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 32:354-355.
7. 上田博・鳥潟博高, 1969 a *Cymbidium* の生長点培養における器官形成. II. 暗培養における生長物質の与える影響について. *園藝學會雜誌* 38:188-193.
8. _____, 1969 b, 同上 ツンランの rhizome-tip からの Shoot 形成過程についての組織学的研究. *園藝學會雜誌* 38:262-266.
9. UEDA, H. and H. TORIKATA, 1970 a
Organogenesis in meristem cultures of *Cymbidiums*. IV. Study on cytokinin activities in the extracts from protocorms. *Jour. Jap. Soc. Hort. Sci.* 39:202-206.
10. _____, 1970 b
Organogenesis in meristem cultures of *Cymbidiums*. V. Anatomical and histochemical studies on phagocytosis in the mycorrhizomes of *Cymbidium goeringii* Reichb. F. *Jour. Jap. Soc. Hort. Sci.* 39:254-260.
11. _____, 1972
Effects of light and culture medium on adventitious root formation by cymbidiums in asptic culture. *American Orchid Soc. Bull.* 41:322-327.
12. WITHNER, C. L. Ed. 1959, *The orchids scientific survey*. Ronald Press Co. New York.