한국생물공학회지 제5권 제1호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 5. No. 1. 43-48(1990)

배배양 및 조직배양을 이용한 약난초 *(Cremastra appendiculata)* 의 증식과 잡종식물의 유도에 관한 연구

*이 정 석 · 황 백 · 김 영 준
*전남대학교 농과대학 임학과
전남대학교 자연과학대학 생물학과

Studies on the Multiplication and Induction of Hybrid Plant in *Cremastra appendiculata* Use the Embryo and Tissue Culture

*Lee Jhung-Seok · Hwang Baik · Kim Young-Jun
**Department of Forestry, Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea*

ABSTRACT

It was determined optimal Culture conditions and suitable growth regulators for seed germination, growth of callus, and protoplasts derived from cultured and mesophyll cells in *Cremastra appendiculata*.

Induction of fusion between protoplasts of cultured and mesophyll cells was examined. The best conditions of seed germination and growth of callus were achieved on Hyponex medium contained plant growth regulators(2mg / l 2,4-D, lmg / l Kinetin). Viability and regeneration of cell wall in protoplasts was determined with fluorescence microscope.

Also, fused protoplasts were achieved by using PEG solution between protoplasts of cultured and mesophyll cells.

서 론

난 종자에의한 다량증식방법은 Knudson(1922)에 의하여 sucrose가 함유된 간단한 배지에서 종자가 발아됨(1)을 본 이후부터 발달하기 시작하여 일부 부분적인 성공을 거둔 바 있고(2,3), *Cymbidium*에서 분열조직 배양기술을 개발하여 생장점으로부터 다량증식을 유도한 이래(4), 영리적인면에서의 응용이 이루어졌으며(5), 배 배양 (6,7,8,9,10) 및 클론증식(11,12)등에 관하여 양란에서는 많은 연구가 진행되어 왔다.

한편 한국 자생란에 있어서는 자란을 재료로하여 기본배지, 명암처리 및 생장조절제가 발아와 유모생육에 미치는 영향을 보았고(13,14), Lee등(1988)이 green pod에서 미숙종자를 채취하여 개체로의 증식, 캘러스 유도 및 분화, 엽육조직과 캘러스 등으로부터 원형질체 분리및 융합 등에 대하여 시도한 바 있다(15). 그러나 약난초에 관한 실험은 아직 보고가 없는 실정이다.

약난초는 내장산 이남에서만 자생하는 상록성 난으로 관상용 뿐 아니라 점질이 높은 구경은 약용(점활제)으로의 이용가치가 높은 자원식물중의 하나이다. 그러나 무분별한 남획과 한정된 분포로 인하여 멸종의 위기에 처해있어 다량증식의 필요성이 점증되고 있는 고유한 자원식물이라는 측면에서도 시급하게 해결하여야 할 문제중의 하나로 되어있다.

본 연구에서는 이와같은 약난초의 다량증식을 위하여 종자를 이용한 배배양의 가능성 및 식물체로의 분화유도, 또한 저장근의 생장점을 이용하여 캘러스의 유도 및 증식과 이들로부터의 재분화에 요구되는 제반조건을 조사하고 엽육조직과 배양세포로부터 원형질체를 분리하여 원형질체의 배양 및 융합 등을 시도하여 그 최적조건을 규명하고 잡종식물을 구하는데 도움이 될 수 있는 기초자료를 조사하였다.

재료 및 방법

종자의 배양

Green pod를 채취하여 표면을 에탄올로 화염멸균한 후 7% calcium hypochlorite 용액에 20분 침적 멸균한 다음 난 배지 [0.3% Hyponex(N:7, P:6, K:19), 0.2% Peptone, 3.5% Sucrose, 0.8% Agar, pH 4.5-5.5]에 접종, 광하의 배양기(27±1℃)에서 배양하였다.

캘러스 유도

저장근의 생장점을 무균적으로 채취하여 식물생장조절제(2mg/l 2,4-D, 1mg/l Kinetin)가 첨가된 Hyponex 배지에서 캘러스를 유도하였고 이 캘러스로부터 재분화의 조건을 조사하였다.

원형질체 분리, 배양 및 생존력 검사

액체 진탕배양한 캘러스 및 엽육조직을 Table 1과 같은 조성의 효소용액에 각각 5시간, 2시간 처리하여 원형질체를 분리하였다.

원형질체는 50㎛ stainless sieve로 여과하여 20%의 sucrose가 첨가된 CPW로 원심분리한 다음 KM배지로 세척하여 시료로 사용하였다. 원형질체의 생존력은 FDA로 5분 염색하여 형광현미경으로 조사 하였고 세포벽의 재생과정은 Calcofluor white ST로 확인하였다.

원형질체 융합

기보(15)의 방법에 의하여 실시하고 도립현미경으로 확인하였다.

결과 및 고찰

Green pod 채취 및 종자 배양

Fig. 1은 양난의 종자로 그 크기가 매우 작으며 Hyponex 배지에 배양하였을 때도 발아율이 높지 않아 자란에서의 85%와 비교가 되었다(15). 종자의 크기도 자란과 비교하여 작았으며 개체로의 발달도 거의 나타나지 않았다. 이는 green pod의 채취 시기 뿐 아니라 발아에 적합한 환경(배지조성 및 광도 등)을 만들어 주는 것이 발아율을 높여 주는데 중요한 요인이 됨을 나타내는 것으로 Hyponex배지의 조성, Peptone 등의 첨가 및 양, 배지의 pH, 탄소원의 양 등을 적절하게 잘 조정하여야 되리라 생각된다.

본 실험에서는 기보(15)의 방법에 준하여 배지 등을 사용하였지만 좋은 결과를 얻지 못하였기 때문에 최적

Fig. 1. Seeds of ***Cremastra appendiculata*** on Hyponex medium excised from 5 months old green pods.

배지를 구하는 실험과 조직배양을 이용하여 다량증식을 유도하는 실험을 계속하여 병행하고 있다.

한편 대부분의 난과 식물은 자엽이나 배유를 가지지 않는 미분화된 종자를 형성하며 이와같은 난종자의 수명은 식물의 종류에 따라 차이가 많지만 건조기 등에서 장기간 보관할 수 있어 종자를 이용한 다량증식에 용이하게 이용할 수 있는 장점을 가지고 있다. 이때 성숙, 건조된 종자의 살균과 종피에 있는 suberin의 제거로 삼투효과를 높이기 위하여 Tween 80 등으로 전처리하여 발아율을 높일 수 있고 Chung 등(14)은 자란에서는 3%의 과산화수소수로 멸균하는 것이 발아에 좋고 유묘생장에는 1ppm의 IAA를 Kyoto용액에 첨가하는 것이 좋다고 하였다.

본인 등(15)도 자란의 green pod에서 채취한 미성숙종자의 배양에서 높은 발아율과 캘러스의 유도 및 분화를 보고한 바 있는데 약란에서는 이와같은 실험이 전혀 시도된 바 없는 실정이다.

캘러스 유도

Fig. 2는 seedling으로부터 유도된 캘러스로 흰부분(→)이 protocorm like body(PLB)(somatic embryo)을 나타내고 있다. 한편 저장근을 무균적으로 채취하여 hormone (2,4-D, Kinetin)이 첨가된 Hyponex배지에서 캘러스를 유도하였다. 위에서 얻은 PLB는 곧 shooting되어 완전한 개체로의 성장이 가능하게 된다.

일반적으로 난에서는 캘러스의 유도가 잘되지 않으나 PLB의 유도를 시도한 몇가지 실험이 있어 *Dendrobium*에서 BAP(5mg/l)가 첨가된 RM배지에서 캘러스 형성 후 protocorm이 형성된 다음 분화됨을 보았고(11), Lin (6)은 *Phalaenopsis*와 *Doritaenopsis*의 꽃대 절간을 1mg/l

Table 1. Composition of enzyme solution for isolation of protoplasts from mesophyll and callus tissues

Composition	Mesophyll (%)	callus (%)
Cellulase R S	—	1.5
Cellulase R — 10	0.5	—
Macerozyme R — 10	0.2	1.0
Pectolyase Y — 23	0.05	0.05
Driselase	0.2	0.5
Sorbitol	0.5M	—
Mannitol	—	0.5M
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1 mM	
CPW $Mgcl_2 \cdot 2H_2O$	1 mM	
MES	1 mM	
BSA	0.2%	
pH	5.2	5.2

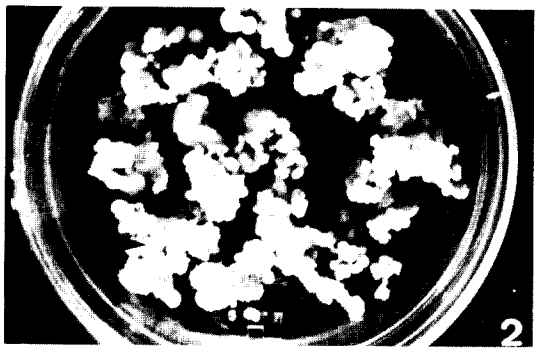

Fig. 2. Callus induced from seedlings. PLB ariesed from ths callus and regeneration to whole plant.

의 BAP가 첨가된 VW배지에서 protocorm형성율이 73.4%, 5mg/l의 BAP처리시에는 노랗고 흰 캘러스가 53% 유기됨을 보았으며, Kerbauy(16)는 *Oncidium varicosum* 을 5mg/l의 NAA가 첨가된 Knudson배지에 배양할때 캘러스 유도율이 좋았다고 하였다.

또한 본인 등(15)도 자란의 green pod에서 채취한 미성숙배를 배양하여 이로부터 캘러스를 유도하였는데 이때 Hyponex기본배지에 2,4 D(2mg/l)와 Kinetin(1mg/l)을 첨가했을 때 캘러스 및 protocorm의 형성율이 높은 것을 확인하였다.

원형질체 분리, 배양 및 융합

Fig. 3및 4는 각각 캘러스와 엽육조직으로부터 얻은 원형질체로 Table 1에서와 같은 효소 및 삼투압 조절제

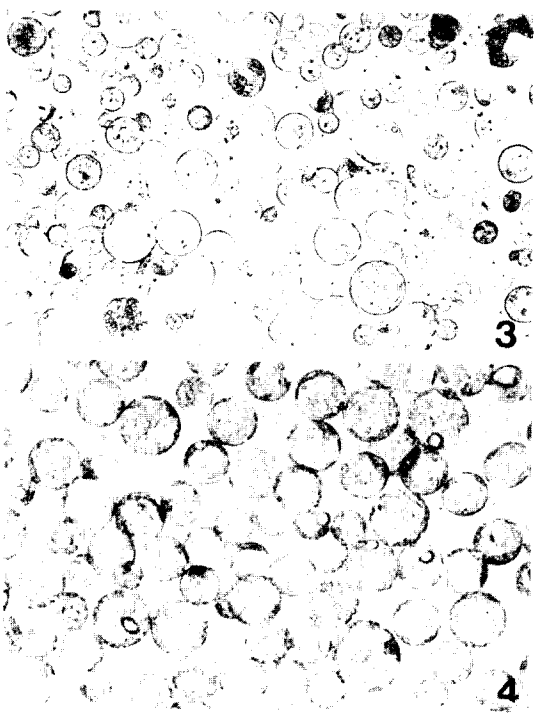

Fig. 3-4. Freshly isolated protoplasts from callus and mesophyll tissue. Mesophyll tissue derived protoplasts were easly distinguished by present of chloroplasts.

로 이루어진 효소용액을 사용하여 분리시켰다. 캘러스 및 엽육조직으로부터의 원형질체분리는 다른 종에서와

같이 엽육조직에서는 효소처리 30분 정도에서 분리가 되어 1시간 정도면 많은 양의 원형질체를 얻을 수 있었으나 캘러스로부터는 5~6시간 이후에 많은 양의 원형질체가 분리되었다. 난에서의 원형질체분리는 본인 등(15)이 자란을 이용하여 시도한 것을 제외하고는 그 보고가 거의 없는 형편이다.

Fig. 5는 위에서 얻은 원형질체를 KM 및 Hyponex 배지에 배양하여 세포벽의 재생을 Calcofluor white ST로 염색한 다음 형광현미경으로 cellulose의 합성유무를 조사한 것으로 형광을 띈 세포벽의 cellulose(→)를 확인할 수 있었다. 이는 Fig. 6에서 동일한 원형질체를 광학현미경으로 관찰하였을 때 나타나는 원형질체(→)등이 형광현미경하에서는 나타나지 않아 원형질체 배양에 의한 세포분열, 세포벽 재생 등의 확인이 가능하였다.

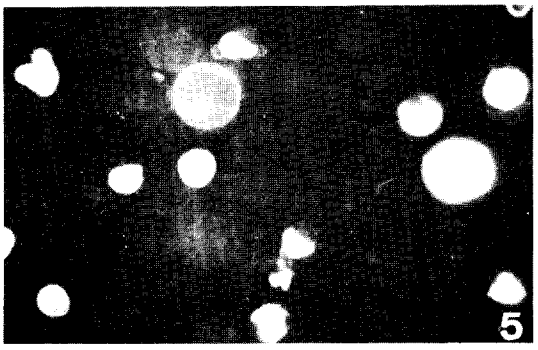

Fig. 5. Callus tissue derived protoplasts in the presence of Calcofluor white and illuminated UV light. Cell wall debris and cellulose contained debris have brilliant fluorescence(arrow).

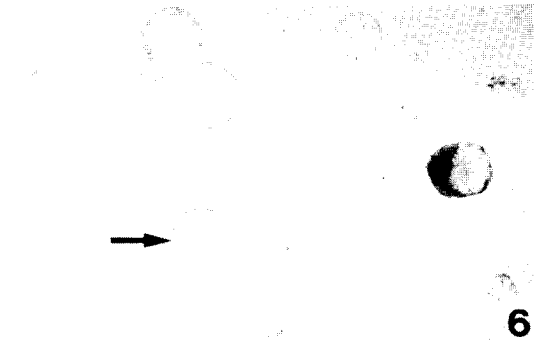

Fig. 6. Same field as Fig. 5 but not illuminated with light.

Fig. 7 및 8은 PEG를 이용하여 두 종류의 원형질체의 융합을 시도한 과정으로 융합율은 그리 높지 않았지만 Fig. 8에서와 같이 융합된 원형질체는 현미경하에서 쉽게 구분이 되었다. 본 실험에서도 기보(15)의 실험에서와 같이 원형질체 배양에는 삼투압 조절제, 무기염의 조성 등이 문제가 되며 이러한 문제가 우선적으로 해결되어야 할 일이라 생각된다.

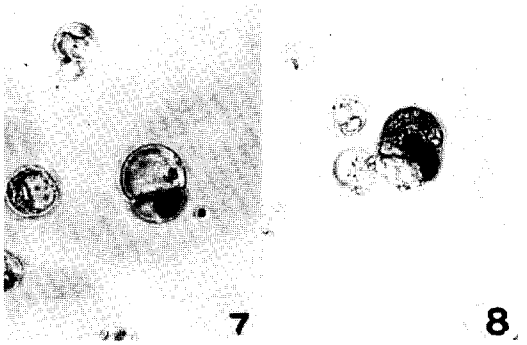

Fig. 7-8. Adherence, fusion and fusion product of two protoplasts.

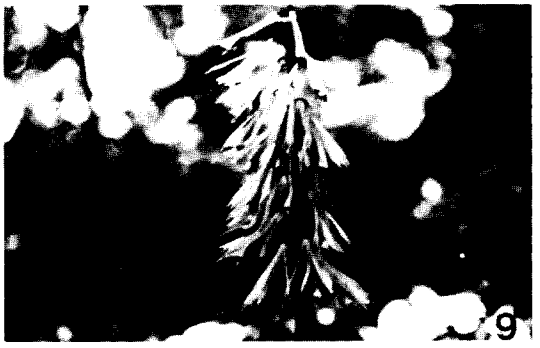

Fig. 9. Flowers of ***Cremastrs appendiculata*** in native grown filed.

요 약

약난초는 내장산 이남에서만 자생하는 상록성 난으로 관상용 뿐 아니라 점질이 높은 구경은 약용(점활제)으로써 이용 가치가 높은 중요한 자원식물중의 하나이다. 본 연구에서는 이와같은 약난초의 다량증식을 위하여 몇 가지 실험을 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

Green pod를 이용하여 미숙종자를 개체로 유도시키는 것은 그 유도율이 낮았고 생장점을 이용, 캘러스를 유도하여 PLB를 형성시켜 개체로 유도하는 것이 용이하였다

. 그러나 미숙종자의 이용보다 배지조건 등의 개량으로 가능하리라 사료된다. 캘러스의 형성은 Hyponex 배지에 2,4-D(2mg/l)와 Kinetin(1mg/l)을 첨가하였을 때 높았다.

한편 입육조직 및 배양세포로부터 분리시킨 원형질체는 70%이상의 생존력을 나타내었고 형광현미경 관찰을 통하여 세포벽의 재생을 확인하였다.

이와같은 실험 결과는 자생란의 다량증식 뿐 아니라 잡종난 식물체를 유도하는 제반 실험에 응용될 수 있는 기초 자료가 될 수 있으리라 사료된다.

감 사

본 연구는 1988년도 문교부 유전공학연구비로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사 드립니다.

Abbreviations

2,4-D 2,4 -dichlorophenoxyacetic acid
BAP 6 benzylamino purine
CPW Cell and protoplasts washing solution (20% sucrose)
FDA Fluorescein diacetate
IAA Indoleacetic acid
KM Kao and Michayluk (1974)
NAA Naphthalene acetic acid
PLB Protocorm like body
RM Reinert and Mohr (1967)

참 고 문 헌

1. Knudson, L.(1922), *Bot. Gaz.* **73**:1-25.
2. Arditti, J, Clements, M.A., Fast, G., Hadley, G., Nishimura, G., and Ernst, R. (1982), *Orchid Biology: Reviews and Perspectives* Ⅱ (J. Arditti, ed.), pp. 243-370. Cornell Univ. Press, Ithaca, N.Y.
3. Clements, N.(1982), *Orchid Biology. Reviews and Perspectives* Ⅱ (J. Arditti, ed.), pp. 295-303. Comstock Publishing Associates, Ithaca. ISBN 0 8014 1276 5.
4. Morel, G.(1960), *Am. Orchid Soc. Bull.* **29**:495 497.
5. Rao, A.N.(1977), *Applied and Fundamental Aspects of Plants Cell, Tissue and Organ Culture* (J. Reinert and Y.P.S. Bajaj, eds.), pp. 44-69. Springer Verlag, Berlin.
6. Lin, C.C.(1986), *Lindleyana.* **1**(3):158-163.
7. Van Waes, J.M.and P.C.Debergh.(1986 a). *Physiol. plant.* **66**:435-442.
8. Van Waes, J.M. and P.C.Debergh.(1986 b). *Physiol. Plant.* **67**:253-261.
9. Miyoshi, K. and Mii, M.(1988). *Scientia Hortic.* **35**:127-130.
10. Pierik, R.L.M., P.A. Sperinkels., B. Van Der Harst and Q.G.Van Der Meys.(1988), *Scientia. Hortic.* **34**: 139-153.
11. Kukulczanka, K.and U. Wojcechowaka. (1983), *Acta. Hort. Cult.* **131**:105-110.
12. Sagawa, Y. and Kunisaki, J.T.(1982), *Plant Tissue Culture* (A. Fujiwara, ed), pp. 683-684. Maruzen, Tokyo.
13. Chung, J.D. and J.H.Suh.(1982), *Korean J. Plant Tissue Cult.* **9**(1): 27-33.
14. Chung, J.D., C.K. Chun and J.H. Suh.(1983), *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **24**(3):243-248.
15. Lee,J.S.,Hwang,B.and Kim Y.J.(1988), *Korean J.Plant Tissue Culture* **15**(3):181-186.
16. Kerbauy,G.B(1984). *Plant cell Reports.* **3**:27-29.

(Received January 30, 1990)