

한란 및 심비디움의 기내 증식에 미치는 성장조절물질의 효과

김학윤 · 권순태*

경북대학교 농업과학기술연구소
*안동대학교 자연과학대학 원예육종학과

Effects of Plant Growth Regulators on *in vitro* Propagation of *Cymbidium kanran* and *Cymbidium hybrida*

Hak-Yoon Kim and Soom-Tae Kwon*

Institute of Agricultural Science & Technology, Kyungpook National University
*Dept. of Horticulture and breeding, Andong National University

Abstract

This study was carried out to determine the effects of plant growth regulators on organogenesis from *Cymbidium kanran* and *Cymbidium hybrida*. Optimal rhizome formation from *Cymbidium kanran* was obtained on MS medium with 10 ppm kinetin+2 ppm NAA, and optimal protocorm formation from *Cymbidium hybrida* was obtained on MS medium with 10 ppm kinetin+0.05 ppm NAA. However, in this study the optimal media for the callus induction from both explants was not identified. Optimal shoot induction from rhizome of *Cymbidium kanran* was obtained on MS medium with 10 ppm BA+2 ppm NAA and 5 ppm BA+2 ppm NAA. Optimal shoot induction from protocorm of *Cymbidium hybrida* was obtained on MS medium with 10 ppm kinetin+2 ppm NAA.

Key words : callus induction, *Cymbidium*, protocorm, rhizome, shoot induction

서 언

난(蘭)은 기후, 형태, 자생지역에 따라 여러 가지로 분류되고 있으며 쉽게는 동양란과 서양란 또는 지생란(地生蘭)과 기생란(氣生蘭)으로 구별되기도 한다. 난은 단자엽 식물 중 가장 진화된

식물로서 세계적으로 약 660~800속에 2만 5천~3만 5천 여종이나 되며 고등식물 중 가장 많은 종이 분화되어 있다¹⁾. 또한 난은 세계 전 기후지역에 골고루 분포되어 있으며 늪지, 사막, 온대, 열대지역뿐만 아니라 심지어 지하에서까지 발견되고 있다¹⁶⁾.

다양한 화색을 지니고 있는 서양란에 비하여 동양란인 한란은 화색이 우아하고 향기가 그윽하여 자생란 중에서 관상가치가 높은 난으로 인정받아 왔으며, 최근 들어 자생난류에 대한 관심도가 높아지면서 그 재배인구가 증가되고 있다.

서양란으로 알려진 열대 및 아열대 원산의 심비디움계에 관하여는 이미 오래 전부터 미국과 유럽 지역에서 재배, 번식에 관하여 많은 연구가 수행되어져 인공배지를 이용한 발아와 개체분화가 용이하게 되었다¹⁰⁾. 그러나 동양계 심비디움인 한란, 춘란, 보세란, 건란 등은 좋아하는 나라가 한국, 중국, 일본, 대만 등으로 제한되어 있어 개개인의 경험을 토대로 재배되고 있을 뿐 뚜렷하게 제시할 재배법은 거의 찾아 볼 수 없으며 또한 개개의 종자는 자연상태 하에서 발아율이 매우 낮고, 개체분화, 번식율도 좋지 않으며 순화가 어려워 그 증식법에 관한 연구가 시급히 요구되고 있는 실정이다^{13,9)}.

1922년 Knudson¹³⁾이 기내의 무균배양법으로 난 종자 발아에 성공한 이래 Murashige와 Skoog¹⁴⁾, Vacin과 Wenl¹⁵⁾, Kano¹²⁾ 등에 의해 무균배양에 있어서 무기질, pH, 성장조절물질, 천연과즙 등의 효과에 관하여 많은 연구가 행하여졌다. 우리나라의 경우도 1979년 김 등¹³⁾에 의해 한국 자생 한란의 근경배양에 관한 연구결과가 처음으로 보고된 이래, 근경의 증식 및 식물체의 분화에 관한 연구가 꾸준히 진행되어 자생 한란의 기내 생산이 어느 정도 가능하게 되었다²⁾. 그러나 아직도 번식속도가 높지 않고 증식율이 저조하여 대량생산을 위한 증식법 개발이 절실히 요구되고 있다.

최근 경제발전과 더불어 꽃 소비의 증가뿐만 아니라, 난에 대한 기호도도 높아져, 수요가 공급을 초월하게 되었다. 따라서 공급 물량의 대부분이 일본 및 대만 등지로부터 수입되고 있으며 최근 중국에서도 많은 물량이 유입되고 있는 실

정이다. 이를 감안할 때 난은 농가의 고소득 작목으로 떠오를 가능성이 있을 것으로 추측된다. 따라서 자연번식이 어려운 난과식물의 경우 조직배양 기술을 이용한 기내생산 기술이 확립되어 유품의 대량생산이 가능하다면 수입대체는 물론, 수출의 가능성도 대단히 높을 것으로 생각된다.

따라서 본 실험은 식물조직배양 기법을 통하여 한란과 심비디움의 효율적인 증식을 위한 식물 성장조절물질의 적정 처리방법을 구명하고자 수행하였다.

재료 및 방법

공시재료 및 배양조건

공시재료로 약 10개월 정도 계대배양된 서양란 계통인 심비디움(*Cymbidium hybrida*)의 protocorm과 동양란 계통인 한란(*Cymbidium kanran*)의 rhizome을 사용하였으며, 각각 연두빛이 강하고 흰 솜털이 난 것들을 1~2 개체씩 떼어 배지에 치상하였다. 배지는 Murashige & Skoog (MS)배지를 기본으로 하여 sucrose 30 g/l와 agar 6 g/l를 첨가하였고 pH는 agar를 넣기 전에 5.8 내외로 조절하였다. 배양조건은 온도가 25±0.5℃ 였으며, 광도는 2000±200 lux의 명상태 하에서 배양하였다.

식물 성장조절제 첨가

MS 기본 배지에 auxin으로서 NAA (α -naphthalene acetic acid) 0.05, 0.5, 2 ppm의 3 수준과 cytokinin으로서 BA (N6-benzyladenine) 1, 5, 10 ppm의 3 수준을 상호 혼합하여 9 처리로 하였으며, BA 대신 kinetin을 동일한 농도로 하여 NAA와 상호 혼합한 9 처리도 첨가하였다. 따라서 식물 성장조절물질의 첨가에 따른 18 처리와 대조구로 hormone free구를 두어 성장조절물질의

사용유무 차이를 관찰하였다. 총 19 처리에 심비디움의 protocorm과 한란의 rhizome을 각각 3 반복으로 하여 삼각플라스크에 치상하였다.

생육조사

심비디움의 protocorm과 한란 rhizome의 배양 일수에 따른 증식효과를 조사하기 위하여 치상 후 45일부터 150일까지 15일 간격으로 총 protocorm 및 rhizome의 증식변화를 조사하였으며, 식물 성장조절물질의 처리가 심비디움 및 한란의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 처리구당 30개의 explant를 대상으로 150일간 배양한 후 각 처리구에 대한 protocorm 및 rhizome의 수, callus의 수, shoot의 수, total fresh weight 등을 조사하였다.

결과 및 고찰

MS 기본배지를 이용하여 심비디움의 protocorm과 한란 rhizome의 생육 상태 및 적정 계대배양 시기를 예측하기 위하여 배양 일수에 따른 증식을 변화를 조사하였다(Fig. 1). 심비디움 protocorm의 경우 2배로 증식되는 기간은 약 70일, 3배는 약 130일이 소요되는 것으로 나타났으며, 한란 rhizome의 경우 2로 증식되는 기간은 95일, 3배는 약 120일이 소요되는 것으로 나타났다. 심비디움의 protocorm은 배양 75일까지 급격히 증가하다가 그 후 차츰 완만한 증가를 나타내었는데, 이는 배지내의 특정 양분만의 소모로 인하여 증식이 둔화되는 경우도 있으므로 이 시기에 배지를 갈아주는 것이 적절할 것으로 사료된다. 또한 한란의 경우는 배양 후 150일 까지 계속 증가하는 경향을 보여 심비디움에 비해 계대배양의 기간이 길어도 무관할 것으로 사료된다.

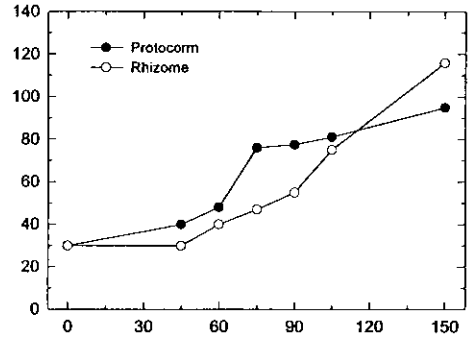


Fig. 1. Changes in the numbers of protocorms from *Cymbidium hybrida* and rhizomes from *Cymbidium kanran* for 150 days *in vitro*.

식물 조직배양에서 성장과 분화 및 계대배양을 위한 배지로는 Murashige and Skoog (MS) 배지나 Knudson C 배지가 많이 이용되고 있으며, callus 유도나 성장촉진을 위하여 기본배지에 각종 성장조절물질이 첨가되고 있다^{4,6,7,8}. 이러한 성장조절물질중 비교적 활성이 높은 auxin계인 2,4-D, picloram을 사용할 경우에는 cytokinin을 제외하며, 활성이 비교적 낮은 IAA, IBA, NAA의 경우에는 cytokinin과 병용하는 것이 일반적이다. 또한 cytokinin을 사용할 경우에도 zeatin, Zip 등의 활성이 높고 고가인 것보다 kinetin, BA를 auxin과 혼용하는 것이 상호간의 상승작용이 있다고 보고된 바 있다⁹. 본 실험에서도 MS 기본배지에 auxin계의 NAA와 cytokinin계의 BA, kinetin을 혼합 첨가하여 한란 및 심비디움의 증식에 미치는 영향을 조사하였다.

본 실험에서 식물 성장조절물질의 첨가가 심비디움 및 한란의 protocorm과 rhizome 형성에 미치는 영향을 Fig. 2에 나타내었다. 심비디움의 protocorm 증식에는 hormone free 배지 및 kinetin 10 ppm + NAA 0.05 ppm 첨가 배지에서 가장 양호한 것으로 나타났으며, 한란의 rhizome 형성에는 hormone free 배지 및 kinetin 첨가 배지에서

효과가 있는 것으로 나타났다. 그러나 BA 10 ppm에서는 심비디움의 protocorm 및 한란의 rhizome이 변색되어 죽거나 생육이 부진한 것으로 나타났다. 따라서 심비디움의 protocorm 및 한란의 rhizome 형성에는 hormone free의 기본배지에서 가장 효과적인 것으로 나타나 성장조절물질 처리에 의한 효과가 나타나지 않았다. 만약 기본 배지의 조성농도가 1/2, 1/3 또는 다른 농도였다면 성장조절물질의 효과가 좀더 두드러졌으리라 사려된다.

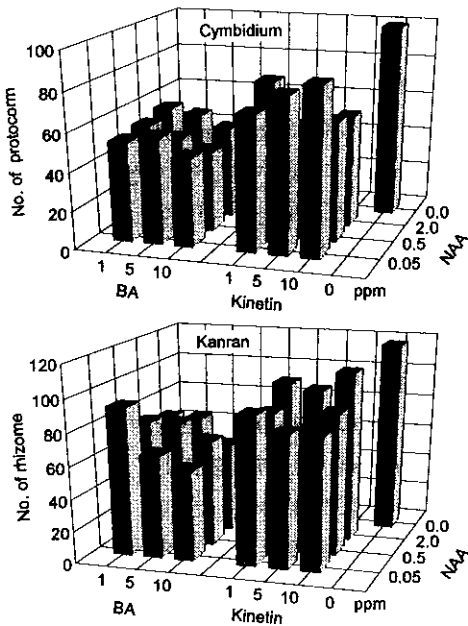


Fig. 2. Effects of different levels of plant growth regulators on the formation of protocorms from *Cymbidium hybrida* and rhizomes from *Cymbidium kanran*.

식물 성장조절물질 처리가 심비디움의 protocorm 및 한란의 rhizome에서의 callus 유도에 미치는 영향을 Fig. 3에 나타내었다. 심비디움 및 한란 모두 callus 유도에 미치는 식물 성장조절물질의 적정 농도를 찾을 수 없었다. Fig. 3에서 callus 유도의 최고 수치는 30 미만인데 이는 본 실험

에서 사용된 explant가 30개인 것을 생각하면 평균 1개의 callus도 유도되지 않았음을 알 수 있었다. 특히 BA 첨가에서 callus 유도가 현저히 억제되었으며, hormone free 처리구에 비하여 kinetin 첨가구에서도 억제되는 경향을 나타내었다. 이는 본 실험에서 분명한 원인을 알 수는 없지만 계대배양을 한지 약 10개월이나 경과한 식물체를 다시 배양한 것이므로 원개체가 노화되어 callus 유도가 어려워졌을 가능성이 있을 것으로 사료되며 또한 식물체 내부 호르몬의 영향으로 2차 대사산물이 축적되어 callus의 이상 생장이 이루어졌을 가능성이 있는 것으로 사료된다.

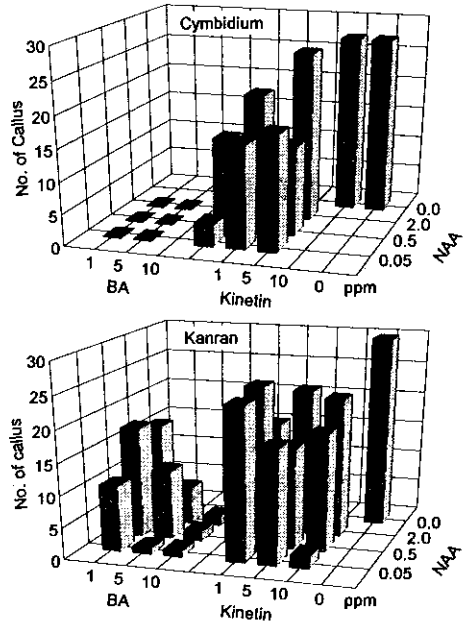


Fig. 3. Effects of different levels of plant growth regulators on the callus induction from protocorms of *Cymbidium hybrida* and rhizomes of *Cymbidium kanran*.

심비디움의 protocorm과 한란의 rhizome으로부터 shoot 분화에 미치는 성장조절물질의 효과를 Fig. 4에 나타내었다. 전체적으로 볼 때 심비디움

및 한란 모두 BA가 kinetin보다 shoot 분화에 효과적인 경향이 있는 것으로 나타났으며, 심비디움의 경우 protocorm으로부터의 shoot 분화는 kinetin 1 ppm + NAA 2 ppm 처리와 kinetin 10 ppm + NAA 0.5 ppm 처리에서 효과적인 것으로 나타났다. 또한 한란의 rhizome으로부터의 shoot 분화는 BA 5 ppm + NAA 2 ppm 처리와 BA 10 ppm + NAA 2 ppm 처리가 무처리에 비하여 가장 효율적인 것으로 나타났다. 이 결과는 이⁴⁾의 실험에서 한란의 rhizome으로부터의 shoot 발생율은 BA 10 ppm을 첨가한 배지에서 가장 높고, NAA 0.1~1 ppm을 혼합 첨가하였을 때 역시 양호하였다는 보고와 유사한 경향을 나타내었다.

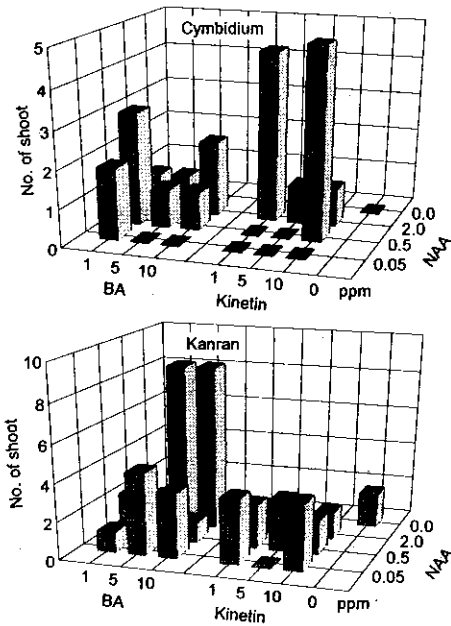


Fig. 4. Effects of different levels of plant growth regulators on the shoot induction from protocorms of *Cymbidium hybrida* and rhizomes of *Cymbidium kanran*.

배양 150일 후 각 처리별 심비디움의

protocorm, callus, shoot와 한란의 rhizome, callus, shoot의 기내증식 총 생체중을 미치는 성장조절 물질의 효과를 Fig. 5에 나타내었다. 각 처리구 내의 protocorm, rhizome의 수나 양에 비해 callus, shoot가 매우 적은 것으로 나타났다. 심비디움 및 한란 모두 hormone free 처리구에서 가장 높은 생체중을 나타내었으며, BA 처리구에서 보다 kinetin 처리구에서 다소 높은 생체중을 나타내었다. 특히 심비디움에서의 기내증식 총 생체중은 kinetin 10 ppm + NAA 0.05 ppm 처리구, kinetin 5 ppm + NAA 0.05 ppm 처리구, kinetin 1 ppm + NAA 2 ppm 처리구 순으로 나타났다. 한란의 경우는 kinetin 1 ppm + NAA 0.5 ppm 처리구, kinetin 10 ppm + NAA 2 ppm 처리구, kinetin 5 ppm + NAA 0.05 ppm 처리구에서 양호한 것으로 나타났다.

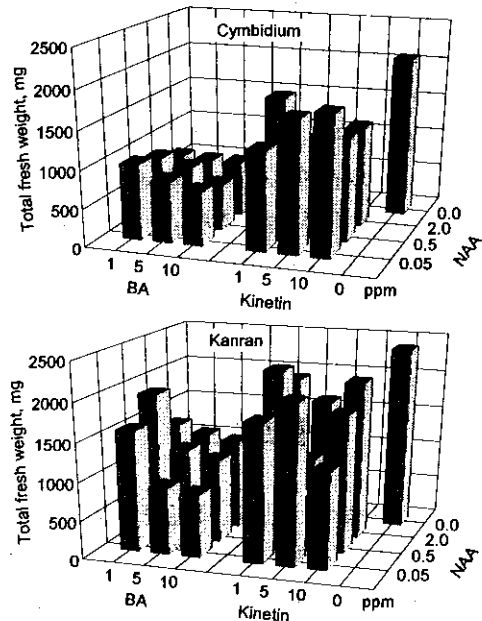


Fig. 5. Effects of different levels of plant growth regulators on total fresh weight of *Cymbidium hybrida* and *Cymbidium kanran*.

본 실험에서 callus 형성에 미치는 성장조절물질의 적정 농도는 구명하지 못하였으나 성장조절물질 처리에 의해 shoot 분화율을 높일 수 있는 것으로 나타났다. 앞으로 다양한 종류의 성장조절물질과 배지를 이용하고 또 처리 농도범위를 확대하여 기내증식에 알맞는 적정농도를 구명하는 연구가 계속되어야 할 것으로 사료된다.

적 요

본 실험은 식물조직배양 기법을 통하여 한란과 심비디움의 효율적인 증식을 위한 식물 성장조절물질의 적정 처리방법을 구명하고자 수행하였다. 한란의 rhizome 형성은 무처리 및 10 ppm kinetin + 2 ppm NAA, 심비디움의 protocorm 형성은 무처리 및 10 ppm kinetin + 0.05 ppm NAA에서 아주 양호하였다. Callus 유도 및 적정 식물 성장조절물질의 농도는 구명하지 못했다. 한란 rhizome으로부터의 shoot 분화에는 10 ppm BA + 2 ppm NAA, 5 ppm BA + 2 ppm NAA, 심비디움 protocorm으로부터의 shoot 분화는 10 ppm Kinetin + 0.05 ppm NAA, 1 ppm Kinetin + 2 ppm NAA에서 비교적 효과적인 것으로 나타났다.

참고문헌

1. 김일중, 이종석, 염도의, 노승문. 1979. 자생난과 식물의 개발과 화훼 원예화에 따른 번식법 확립에 관한 연구. I. 야생난과 개발과 번식. 한국원예학회지 20(1): 94-105.
2. 백기엽, 심걸보, 김정주. 1990. 동양난의 개발과 미세번식 체계확립. II. 천연산물 및 BAP 처리 일수가 동양난 rhizome의 기관형성에 미치는 영향. 한국원예학회지 31(1): 74-80.
3. 이정식, 심명구, 이종석, 김영진. 1986. 한란 (*Cymbidium kanran*) 무균배양에 있어서 rhizome 증식과 기관형성에 관한 연구. 한국원예학회지 27(2): 174-180.
4. 이종석. 1990. 한란 조직배양묘의 계대배양을 위한 효과적인 배지의 개발. 한국원예학회지 31(3): 186-192.
5. 정재동. 1985. 식물조직배양을 이용한 원예작물의 급속증식. 한국원예학회지 26(4): 410-428.
6. 정재동, 전재기, 김성수. 1984. 나도풍란 (*Aerides japonicum*) 종자의 무균 배양. I. 종자의 발아와 유묘의 생장에 적합한 배지 및 배양조건의 구명. 한국원예학회지 25(4): 305-312.
7. 정재동, 전재기, 김성수. 1985. 나도풍란 (*Aerides japonicum*) 종자의 무균 배양. II. Auxin과 kinetin, 당, 한천 농도 및 pH가 유묘의 생장에 미치는 영향. 한국원예학회지 26(4): 368-374.
8. 정재동, 전재기, 김성수, 이종석. 1985. 자생한란(*Cymbidium kanran*)의 rhizome 성장과 기관분화. 한국원예학회지 26(3): 281-288.
9. 정재동, 전재기, 최수옥. 1985. 건란 (*Cymbidium ensifolium*) 종자의 무균 배양. II. 배지내 몇 종의 첨가물 및 pH, 명 또는 암 배양기관이 rhizome의 성장과 기관분화에 미치는 영향. 한국원예학회지 26(2): 186-192.
10. Carlson, P.S.. 1975. Crop improvement through techniques of plant cell and tissue culture. Bioscience 25: 747-749.
11. Jeyanayaghy, S., and A.N. Rao. 1966. Flower and seed development of *Bromheadia finlaysoniana*. Bull. Torrey. Botan. Club 93: 97-103.
12. Kano, K.. 1965. Studies on the media for

- orchid seed germination. Mem. Agri. Kagawa Univ. 20: 1-70.
13. Kundson, L.. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. Bot. Gaz. 73: 1-25.
 14. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
 15. Vacin L. and F. Went. 1949. Some pH change in nutrient solution. Bot. Gaz. 110: 605-613.
 16. Withner, C.R.. 1974. The orchid. A scientific studies. Wiley International Publication.