

자생란 3종의 기내 종자발아에 미치는 배지구성물질의 영향

이철희*

충북대학교 원예과학과 and 생물건강산업개발연구센터

Effect of Medium Components on Asymbiotic Germination of 3 Korean Native Orchid Species

Cheol Hee Lee*

Dept. of Horticultural Science and Research Center for Bioresource and Health,
Chungbuk National University Cheongju, 361-763, Korea

Abstract - This study was carried out to investigate the factors affecting seed germination of Korean native orchids, such as *Habenaria radiata*, *Bletilla striata* and *Cypripedium macranthum*. In general, seeds of *H. radiata* was effectively germinated on solid medium and the highest germination (29.6%) was achieved on Hyponex solid medium. But shoot growth was better in MS liquid medium containing 100mL · L⁻¹ coconut water (MSC medium). Seed germination of *B. striata* was effectively induced on MS solid medium. However, no seed germination was observed in all liquid medium tested. Seed germination experiments of *C. macranthum* were performed using 6 kinds of media and seeds harvested 90 days after cross- and self-pollination. Cross-pollinated seeds were germinated on all the media with the best germination ratio of 4.45% on MSC medium. But no germination was observed from self-pollinated seeds.

Key words - Korean native orchid, *Habenaria radiata*, *Bletilla striata*, *Cypripedium macranthum*

서 언

난과식물은 단자엽 식물들 중 가장 진화된 식물군으로 세계적으로 약 150여속, 40,000여종이 있어 현재 지구상에 존재하는 60만종의 식물들 중 약 6%를 차지함으로써 고등식물 가운데 가장 많은 종이 분화되어 있는 것으로 알려져 있다(이와 김, 1994). 난과식물은 광선, 온도, 수분, 양분, 매개충 등의 주변조건에 따라 분포범위가 다양하다. 전 세계적으로 자생란의 분포 지역을 살펴보면 동남아에서 인도, 호주에 인접한 열대 아시아, 아프리카 및 마다가스카, 멕시코에서 브라질에 이르는 중남미로 대별할 수 있다. 특히 온대지역에 해당되는 우리나라에서는 전반적으로 같은 종의 분포 범위가 넓은 경향을 보이나, 특정한 환경조건에서만 서식하는 종들도 있다.

우리나라에 자생하는 난과식물은 대부분이 온대산 자생란으로 약 40여속 90여종이 자생하는 것으로 알려져 있다. 지역별로 보면 대부분이 중부이남의 온난한 도서지방과 중부이북의 추운지방에 거의 집중되어 있고, 특히 제주도에는 38속 72종이 자생하고 있어 제주도는 한국 자생란의 보고라 할 수 있다(이와 김, 1994).

본 연구에서는 우리나라에 자생하는 난과 식물들 중 비교적 관상 가치가 높아 원예화가 가능하리라 생각되는 해오라비란(*Habenaria radiata*), 자란(*Bletilla striata*), 복주머니란(*Cypripedium macranthum*) 등 3종을 실험재료로 사용하였다. 해오라비란은 경기, 강원지역과 금강산 등지의 양지바른 습지에 자생하는 한대성 낙엽 초본이다. 꽃은 순백의 해오라비 모양으로 7~8월에 개화하는데 분화용으로 적합하여 상당한 인기를 끌고 있다. 자란은 남부지방과 남부 다도해 섬지방 및 목포의 해변 암석지에 자생하는 다년생 초본으로 5~6월에 홍자색의 아름다운 꽃을 피워 관상용으로 많이 재배되고 있다. 복주머니란은 산 아래에서는 그늘에서 자라지만 산 위로 가면 서 양지쪽 풀밭에서 자라며, 5~6월에 주머니 모양의 순판을 가진 아주 매력적인 연한 홍자색의 꽃을 피운다. 우리나라에 자생하는 난과식물 가운데 가장 아름다운 꽃 중의 하나로 다른 야생란에 비해 그 모양이 독특하여 관상 가치가 높다. 이와 같이 자생 난과식물은 원예종으로 가치가 뛰어나지만 번식능률이 낮아 급증하는 수요를 충족시키기 위해서는 증식방법의 개발이 시급하다.

Chung *et al.*(1998)은 해오라비란의 무균발아는 hyponex 3g

*교신저자(E-mail) : leech@chungbuk.ac.kr

L⁻¹와 peptone 1gL⁻¹가 첨가된 배지에서, 기내 지구형성은 hyponex 1gL⁻¹와 peptone 2gL⁻¹가 첨가된 배지에서 각각 가장 양호한 것으로 보고하였다. Ichihashi(1979)는 자란의 종자가 Knudson C 배지를 제외한 모든 배지에서 안정적으로 발아한다고 보고하였다. 그러나 Park(1998)은 MS배지에서 가장 높은 발아율을 가지는 것으로 보고하였다. Nagashima(1993)는 *Cyripedium japonicum*의 발아실험에서 수분 후 70일 된 종자를 Hyponex배지에서 배양한 결과 227일 경과 후 0.8%의 발아율을 보인다고 하였다. Tomita(1997)는 *Cyripedium macranthos*와 *C. japonicum*의 수분 후 100~110일된 종자를 이용한 발아실험에서 코코넛워터를 첨가한 배지에서 60% 이상의 발아율을 나타낸 것으로 보고하였다. 이와 같이 복주머니꽃속 식물들의 종자발아에 관한 연구는 계속적으로 이루어지고 있다. 그러나 *C. macranthum*은 복주머니꽃속 식물들 중에서도 종자발아가 매우 어려운 종으로 식물체로의 분화까지 밝혀낸 연구결과가 없는 실정이다.

우리나라에 자생하는 난과식물은 자생지의 무차별한 채집에 의해 멸종위기에 처해 있어 종의 보존이 절실한 시점에 있다. 이와 같은 관점에서 본 실험은 우리나라에 자생하는 해오라비란, 자란 및 복주머니란의 종자발아에 영향을 미치는 요인을 구명하여 대량번식체계를 확립하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

해오라비란은 수분 후 70일, 자란과 복주머니란은 수분 후 90일 된 씨꼬투리를 채취하여 흐르는 수돗물에 깨끗하게 수세한 후 2% sodium hypochlorite에서 3분간 표면살균한 다음 살균수로 5회 세척하여 사용하였다. 표면살균 된 씨꼬투리를 열개하여 멸균수가 들어있는 원심분리용 튜브에 종자를 털어 넣고 잘 섞은 다음 1시간 동안 vortex 처리하고 회전식 진탕 배양기(100rpm)에서 24시간 진탕하여 흡수시켰다. 충분히 흡수된 종자는 2회 세척하였는데, 세척은 멸균수를 부어 골고루 흔들어준 후 5분간 두어 종자를 가라앉힌 다음 멸균수만을 제거하는 방법을 사용하였다.

종자발아에 미치는 배지의 영향을 알아보기 위하여 해오라비란과 자란은 고체와 액체상태의 MS배지, MS배지에 코코넛워터 100mL⁻¹를 첨가한 MSC배지, hyponex(N-P-K=6.5-4.5 -19.0) 3gL⁻¹에 peptone 2gL⁻¹를 첨가한 Hyponex배지 등 6종의 배지를 각각 직경 9cm의 살균된 페트리 접시에 30mL씩 분주하였다. 각 배지는 공히 sucrose 3%, agar 0.8%(액체배지 제외)를 넣고 pH는 5.5로 조절하여 사용하였다. 해오라비란과 자란은 멸균수를 제거한 다음 1개의 씨꼬투리에서 수확한 종자당 6mL의 액체배지를 첨가한 후 잘섞어 30mL의 배지가 들어있는 9cm 페트리 접시당 2mL씩 3번복으로 접종하였다. 고체배지에 파종한 종자는 항온기에서 배양하였으며, 액체배지에 파종한 종자는 회전식 진탕 배양기(90rpm)에서 진탕 배양하였다.

복주머니란은 종자발아에 적합한 배지 및 수분방법을 구명하기 위하여 MS, 1/2MS배지와 Hyponex배지[hyponex(N-P-K=6.5-4.5-19.0) 3gL⁻¹ + peptone 2gL⁻¹] 등 3종류의 배지를 사용하였다. 또한 각각의 배지에 코코넛워터 100mL⁻¹를 첨가한 배지(이후 MSC, 1/2MSC, HC 배지로 약칭함)를 사용하였다. 총 6종류의 배지에 각각 타기수분 및 자기수분한 종자들을 파종하였다. 복주머니란 종자의 파종방법은 원형질체의 배양에 많이 사용되는 embedding-in-agarose culture법과 agarose bead culture 법을 혼용한 변형된 비드 배양법(modified agarose bead culture; Lee, 1989)을 이용하였다. 변형된 비드 배양법은 씨꼬투리 1개 분량의 종자가 들어있는 MS액체배지(4mL)와 agarose 1.6%가 첨가된 MS고체배지(4mL)를 섞어 9cm의 페트리 접시에 접종하였다. 30분 후 분주한 배지가 굳으면 배지를 15조각으로 잘라 페트리 접시당 5조각씩 나누어 넣은 후 10mL의 액체배지를 첨가하였다. 각 배지의 sucrose 농도는 1%, pH는 5.5로 고정하였다.

배양조건은 공히 온도 25±1°C, 광도 40μ mol·m⁻²·s⁻¹, 일장 16시간으로 하였다. 해오라비란과 자란은 파종 25일 후에, 복주머니란은 파종 후 120일 후에 종자의 발아율을 조사하였다.

결과 및 고찰

해오라비란

해오라비란의 종자발아에 미치는 배지의 영향을 알아보기 위하여 수분한 후 70일 된 종자를 액체와 고체의 MS, MSC(MS배지 + 코코넛워터 100mL⁻¹) 및 Hyponex배지에 파종하여 25일간 배양한 후 발아율을 조사한 결과는 Fig. 1~3과 같다. 해오라비란 종자의 발아과정을 단계별로 살펴보면, 파종 5일 후에 원괴체(protocorm)가 형성되었고 10일 후 뿌리털이 출현했으며, 배양 38일 후에는 잎이 길게 자라 갈라지기 시작하였다(Fig. 1).

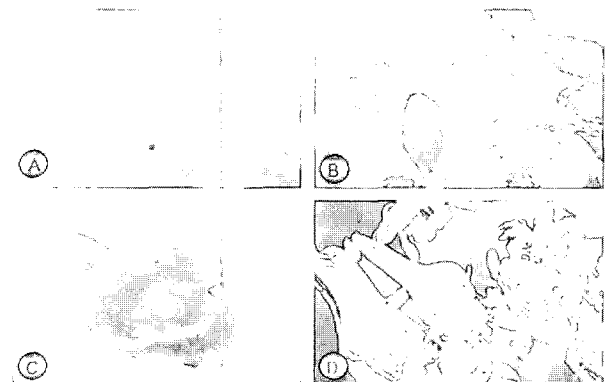


Fig. 1. Process of seed germination in *Habenaria radiata*. A. Seeds obtained from 40 days after pollination. B. Protocorm formation (10 days). C. Root hair formation (13 days). D. Elongation of protocorms (38 days).

종자의 발아는 배지의 종류에 관계없이 액체배지에 비해 고체배지에서 양호하였다. 총 6종류의 배지 중 hyponex 3g^L⁻¹와 peptone 2g^L⁻¹을 첨가한 hyponex 고체배지에서 29.6%의 가장 높은 발아율을 보였다(Fig. 2, 3). Chung *et al.*(1998)도 수분 후 60일 경과한 종자를 hyponex와 peptone의 조성을 달리한 배지에 배양한 결과 본 실험과 동일하게 hyponex 3g^L⁻¹와 peptone 2g^L⁻¹을 첨가한 고체배지에서 73.3%의 가장 높은 발아율을 얻었다고 보고하였다. 그러므로 해오라비란 종자의 발아에는 hyponex 3g^L⁻¹와 peptone 2g^L⁻¹을 첨가한 Hyponex배지가 적합한 것으로 생각된다.

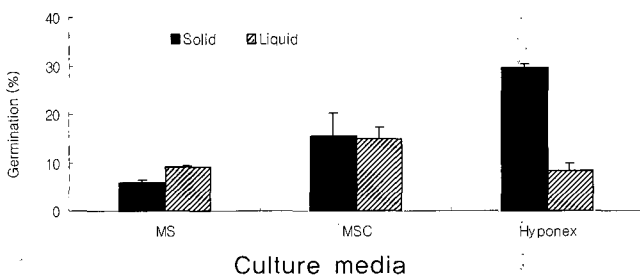


Fig. 2. Effect of media composition on seed germination of *Habeneria radiata* after 25 days of culture.

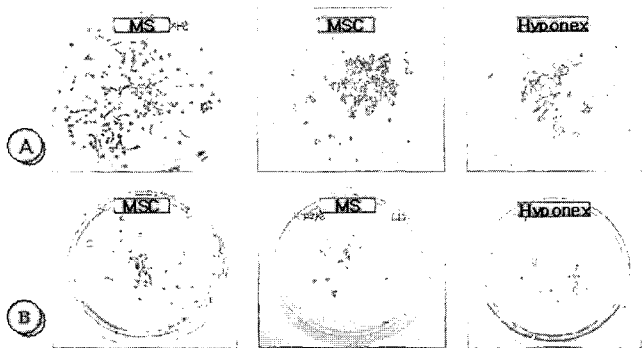


Fig. 3. Seed germination after 38 days of culture. A. *Bletilla striata* on solid medium. B. *Habeneria radiata* on liquid medium.

또한 Chung *et al.*(1998)은 발아 후 신구의 형성과 구의 비대는 hyponex 1g^L⁻¹와 peptone 2g^L⁻¹를 혼용한 배지에서 적합하다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 MSC액체배지에서 신구의 형성과 신초의 생육이 양호하여 발아 후 신구의 생육에 관한 구체적인 연구가 필요하리라 생각된다.

본 실험에서는 수분 후 70일된 종자를 파종하여 최고 29.6%의 종자 발아율을 얻었는데, 이는 Chung *et al.*(1998)이 수분 후 60일 종자에서 73.3%의 발아율을, 인(1998)이 수분 후 17~30일 경과한 종자에서 80%의 발아율을 얻었다는 보고에 비해 매우 낮은

발아율이다. 이와 같은 발아율의 차이는 종자의 연령 때문인 것으로 생각된다. 그러므로 해오라비란은 일반적인 난과 식물의 발아 습성과 같이 미숙 종자일 때 발아가 양호하여 수분 후 60일 이전에 파종하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

자 란

수분 후 90일 된 자란의 원숙종자를 고체와 액체 상태의 MS, MSC, Hyponex배지에 파종하여 25일간 배양한 다음 종자 발아율을 조사한 결과는 Fig. 3~5과 같다. 자란의 종자를 MS고체배지에 파종한 다음 종자발아과정을 보면, 파종 5일 후에는 원과체가 형성되고, 15일 후에는 뿌리털이 출현했으며, 배양 38일째에는 이미 완전한 유묘의 형태를 이루었다(Fig. 4).

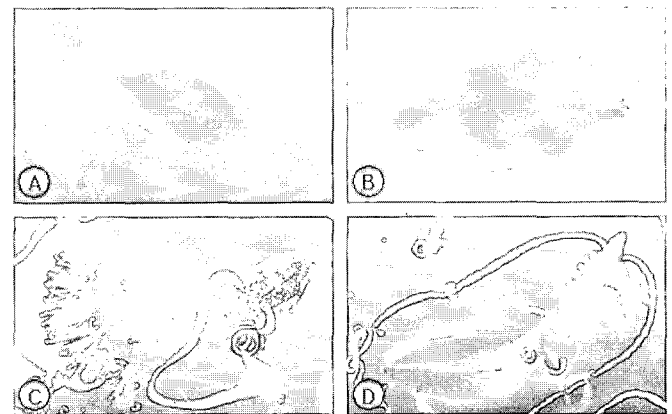


Fig. 4. Process of seed germination of *Bletilla striata* on MS solid medium.

A. Seeds obtained from 90 days after pollination. B. Protocorm formation (10 days). C. Root hair formation (25 days). D. Formation of leaf and root (38 days).

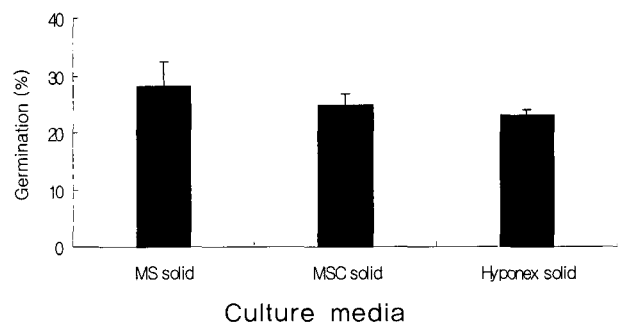


Fig. 5. Effect of media composition on seed germination of *Bletilla striata* after 25 days of culture.

고체배지에 파종한 경우에는 MS배지에서 28.2%로 가장 높은 종자 발아율을 보였고, MSC배지와 Hyponex배지에서도 23% 이상의 종자가 발아하였다(Fig. 3, 5). 그러나 액체배지에서는 3종류의 배지 모두에서 발아가 전혀 관찰되지 않았다.

Ichihashi(1979)는 자란은 Knudson C배지를 제외한 모든 배지에서 안정적인 종자발아와 생장을 보였고, Park(1998)은 수분 후 80일된 종자를 MS배지에 배양한 경우 약 75% 정도 발아한 것으로 보고하였다. 이는 본 연구의 MS배지에서 발아가 가장 양호하였던 것과 유사한 경향을 보였으나, 발아율에서는 많은 차이를 나타냈다.

Lim *et al.*(1989)은 수분 후 일수에 따른 자란 종자의 발아연구에서 Hyponex 혼용배지에 파종했을 때 수분 후 100일 된 종자는 약 20%, 150일 된 종자에서는 80%의 발아율을 보였다고 하였다. 본 실험에서는 수분 후 90일 된 종자를 파종하여 최고 28.2%의 발아율을 보였다. 이상의 두 실험의 결과로 미루어 자란은 수분 후 약 150일이 경과한 다음 파종하는 것이 발아율을 높일 수 있는 좋은 방법으로 생각된다. 종자발아 과정에서는 자란은 원피체로 발달되는 것보다 식물체로 분화되는 경향을 보였다.

이상의 결과를 종합해 보면, 자란의 발아율을 높이기 위해서는 배의 상태가 가장 양호한 시기를 골라 MS고체배지에 배양하는 것이 좋으리라 생각된다.

복주머니란

복주머니란의 수분방법 및 배지의 종류가 종자발아에 미치는 영향을 구명하기 위하여 자가수분 및 타기수분한 후 90일 된 종자를 이용하여 6 종류의 배지에 파종하여 배양한 결과는 Fig. 6~7과 같다.

타기수분한 종자를 코코넛워터를 첨가하지 않은 3종류의 배지에 파종하여 배양한 결과 MS배지(0.8%)에서 가장 양호한 발아율을 보였다(Fig 6, 7). 다른 2종류의 배지에서는 발아율이 매우 저조하였다. Nagashima(1993)는 *Cypripedium japonicum*의 수분한 후 70일 경과된 종자를 Hyponex배지에 파종했을 때 0.8%의 가장 좋은 발아율을 보였으며, MS배지에서는 발아되지 않았다고 하여 본 실험의 결과와는 다른 결과를 보였다. 이는같은 속의 식물들 중에서도 종에 따라 선호하는 배지의 종류가 다르기 때문이라고 생각된다.

코코넛워터를 첨가한 경우에는 전반적으로 발아율이 대폭 증가하는 경향을 보였다(Fig. 7). 특히 MSC배지에서 4.45%로 가장 높은 발아율을 보였으며, 1/2MSC배지에서도 코코넛워터를 첨가하지 않은 배지에 비해 발아율이 상당히 증가한 것을 볼 수 있었다. 그러나 Hyponex배지에서는 코코넛워터의 첨가여부에 관계없이 발아율이 저조하였다.

Tomita(1997)는 *Cypripedium macranthus* var. *speciosum*와 *C. macranthus* var. *taiwanianum*의 수분 후 100~110일 된 종자를 이용한 발아실험에서 코코넛워터를 첨가한 1/2N배지에서 양호 발아율을 나타낸 것으로 보고하였다. 이는 코코넛워터를 첨

가한 각종 배지에서 발아가 양호한 본 실험의 결과와 유사한 것으로서 코코넛워터가 복주머니란의 종자발아에 효과적인 것으로 생각된다.

한편 자가수분한 종자는 배지의 종류에 관계없이 전혀 발아가 관찰되지 않았다. Hoshi *et al.*(1994)은 자가수분 후 100일 된 종자를 MS배지에 파종하여 180일간 배양한 결과 *Cypripedium japonicum*의 경우 65.4%, *C. debile*는 9.2%, *C. henryi*에서는 0.5% 발아한 것으로 보고하여 종간에 많은 발아율의 차이를 보였다. 이상의 결과를 종합하여 보면 복주머니꽃속 식물들은 종에 따라 각기 다른 수분방식을 취하며, 우리나라에 자생하는 *C. macranthus*은 극도의 타기수분을 요하는 작물이라는 것을 알 수 있었다.

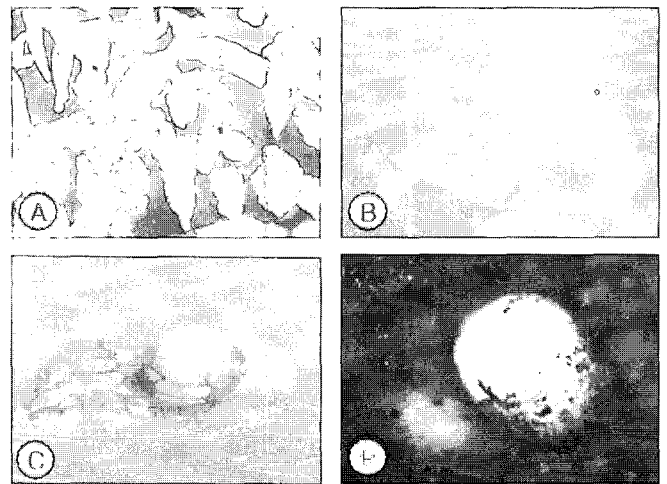


Fig. 6. Process of seed germination in *Cypripedium macranthum*.. A. Seeds obtained from 90 days after pollination. B. Sawed seeds. C. Stage 1: Embryo swollen, testa splitting. D. Stage 2: Protocorm stage, embryo as long or longer than the testa.

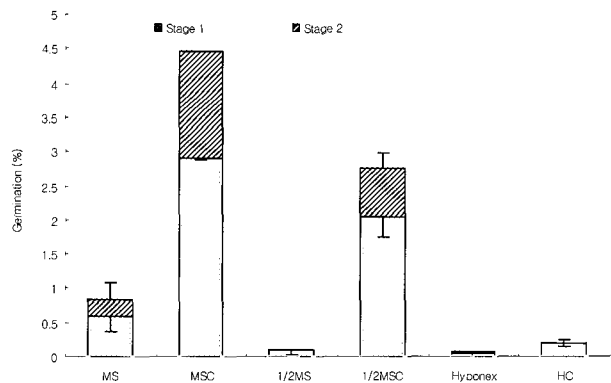


Fig. 7. Effect of media composition on germination of *C. macranthum* after 120 days of culture. Stage 1: Embryo swollen, testa splitting. Stage 2: Protocorm stage, embryo as long or longer than the testa.

적 요

우리나라에 자생하는 해오라비란(*Habenaria radiata*), 자란(*Bletilla striata*), 복주머니란(*Cypripedium macranthum*)을 실험재료로 하여 종자발아에 영향을 미치는 요인에 대해 연구하였다. 해오라비란의 종자발아는 전반적으로 고체배지에서 좋았으며, Hyponex 고체배지에서 29.6%로 가장 높은 발아율을 보였다. 그러나 발아 후 생육은 MS배지에 코코넛워터 100mL⁻¹을 첨가한 MSC 액체배지에서 가장 양호하였다. 자란의 종자는 MS 고체배지에서 28.2%로 가장 높은 발아율을 보였다. 반면, 액체배지에서는 배지의 종류에 관계없이 전혀 발아되지 않았다. 복주머니란의 자가 및 타가수분 후 90일 된 종자를 6종류의 배지에 배양한 결과 타가수분한 종자는 배지의 종류에 관계없이 발아가 되었으며, 특히 MSC배지에서 가장 양호한 4.45%의 발아율을 보였다. 그러나 자가수분 된 종자는 모든 종류의 배지에서 전혀 발아가 관찰되지 않았다.

사 사

본 연구는 산업자원부한국산업기술평가원지원의 지역협력연구센터인 충북대학교 생물건강산업개발연구센터의 지원에 의한 것입니다.

인용문헌

- Chung, M.Y., J.D. Chung and S.O. Jee. 1998. Effect of culture media on asymbiotic seed germination and those seedling growth of *Calanthe discolor* and *Habenaria radiata*. Kor. Plant Tiss. Cult. 25: 189-194.
- Hoshi, Y., K. Kondo and S. Hamatani. 1994. *In vitro* seed germination of four asiatic taxa of *Cypripedium* and notes on the nodal micropropagation of American *Cypripedium montanum*. Lindleyana 9: 93-97.
- Ichichashi, S. 1979. Studies on the media for orchid seed germination. J. Jap. Soc. Hort. Sci. 48: 345-352.
- 인민식. 1998. 동양란 대량증식 기술. 충남농업기술연구원.
- Lee, C.H. 1989. Somatic and gametosomatic hybridization in the family solanaceae. Ph.D Thesis. Nottingham Univ., U.K.
- 이철희, 김태중. 1994. 자생란의 종류 및 분포에 대한 문헌적 고찰과 생리, 생태. (난. 산업현황, 발전방향·이용) pp. 211-263. 난연구회.
- Lim, K.B., J.D. Chung and C.K. Chun. 1989. Asymbiotic germination of seed of *Bletilla striata*. III. Effect of media and environmental conditions on growth of seedling and pseudobulbs at different seed ages. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 30: 336-342.
- Nagashima, T. 1993. Studies on relationship between embryogenesis and germination in orchidaceae. J. Japan Soc. Hort. Sci. 62: 581-594.
- Park, K.R. 1998. Factors affecting asymbiotic seed germination *In vitro* and seedling of Korean native terrestrial orchids. Ph.D. Thesis, Graduate school of Chungbuk Natl. Univ.
- Tomita, M. 1997. Effects of culture media and cold treatment on germination in asymbiotic culture of *Cypripedium macranthos* and *Cypripedium japonicum*. Lindleyana 12: 208-213.

(접수일 2006.3.10 ; 수락일 2006.4.16)