

철피석곡의 기내 Protocorm Like Bodys(PLBs) 재증식 및 신초형성에 미치는 생장조절제 및 탄소원의 영향

장지우 · 김창길 · Trinh Ngoc Ai · 이도진 · 정미영

Effect of plant growth regulators and carbon sources on proliferation and shoot formation of PLBs in *Dendrobium candidum*

Jee-woo Jang · Chang Kil Kim · Trinh Ngoc Ai · Do-Jin Lee · Mi Young Chung

Received: 5 November 2018 / Revised: 10 December 2018 / Accepted: 10 December 2018

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract *Dendrobium candidum* Wallich ex Lindley is a traditional Chinese medicine plant and has been widely used for medicinal and ornamental purposes. In this study, several different factors affecting micro propagation of protocorm-like bodies (PLBs) such as basal media, plant growth regulators, and carbon sources. The proliferation PLB derived from seeds was the best in H₃P₄ basal medium containing 0.1 mg · L⁻¹ NAA and 0.1 mg · L⁻¹ Kinetin. PLB growth was the best when 10 g · L⁻¹ sucrose was added to the carbon atoms in the medium. The rate of shoot formation from the propagated PLB was the highest in 1/4 MS or H₁P₂ medium containing 10 g · L⁻¹ sucrose, and the shoot length was longer than the others.

Keywords Micro-propagation, H₃P₄ basal medium, Chinese medicine plant

서 언

약 1,200 종의 난과 식물 중 두 번째로 종류가 많은 *Dendrobium* 속(석곡)은, 큰 나무의 수간이나 바위에 착생하여 자라는 상록성의 다년생 착생란으로 석란(石蘭)이라고도 불리고 줄기에 대나무처럼 마디가 있어서 죽란(竹欄)이라고도 불린다(Jones et al. 1998). 그 중 철피석곡은 남아시아와 동남아시아에서 관상용으로서의 가치뿐만 아니라 중국의 전통 고급 약재로써 인후부와 호흡기 및 안질환 등에 사용되어 온 유명한 석곡 속 식물인데(Zhao et al. 2008; Shiau et al. 2005), 철피석곡의 주요생리물질은 cumarin, alkaloids, polysaccharides, phenolic compound, flavonoids 등으로 밝혀져 있다(Li et al. 2008; Li 2009; Li et al. 2010; Zhu et al. 2010). 특히 수용성의 polysaccharides를 다수 포함하고 있어 강한 항암 효과를 가진 면역강화제로 보고하였다(Liu et al. 2005). 최근에는 약재로써의 가치뿐만 아니라 항암효과를 가진 의학 치료용 소재(Zhao et al. 2014) 및 추출물을 이용하여 화장품 성분으로서의 연구(Park et al. 2014) 등이 진행되고 있다.

최근 들어 약용 또는 관상용으로서 증가하는 수요에 대응하기 위하여 조직배양을 이용한 대량증식에 관한 연구가 시도되었는데(Su et al. 2006; Sun et al. 2006; Zhao et al. 2007), 이와 관련된 주요 연구내용을 보면 철피석곡의 성숙종자(He et al. 1982), 미성숙 종자(Ye et al. 1988), 줄기(Chen and Cun 2002), 생장점(Zhang and Fang 2004), 기내신초의 마디(Shiau et al. 2005)를 이용하여 조직배양 기술의 체계 확립에 관한 여러 보고가 있다. 특히 철피석곡의 PLB (Protocorm-like body)를 이용한 대량증식을 위해 몇몇 연구가 이루어졌는데, 그 예로 callus 배양을 통한 PLB형성과 식물 재분화에 관한 연구를 실시하였으며(Zhao et al. 2008), 철피석곡의 기내배양에서

[†]These authors contributed equally to this work.

J.-w. Jang[†] · D.-J. Lee · M. Y. Chung (✉)
순천대학교 농업교육과
(Department of Agricultural Education, Suncheon National University, Suncheon 57922, Korea)
e-mail: queen@sunchon.ac.kr

C. K. Kim[†]
경북대학교 원예과학과
(Department of Horticultural Science, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea)

Trinh Ngoc Ai
짜비양대학교 농업학부
(School of Agriculture and Aquaculture, Tra Vinh University, Trà Vinh, Vietnam)

Hyponex 농도별 PLB와 multiple shoot의 성장 및 polysaccharides의 축적 정도를 연구하였다(Cui et al. 2011). 또한 Cui et al. (2012)은 철피석곡 PLB의 성장 및 생리활성물질 생산에 영향을 미치는 생물반응기 내 물리적 환경조건에 관한 연구를 수행하였으며, Park et al.(2014)은 철피석곡의 PLB 및 다신초 추출물의 생리활성에 관한 비교 연구를 수행하여 철피석곡의 화장품 성분으로써의 응용가치를 평가하였다. 이외에서 철피석곡의 성분분석에 관한 연구(Li et al. 2010), 바이오리액터를 이용한 철피석곡의 PLB 배양에 관한 연구(Cui 2014) 등 다양한 연구가 이루어졌다.

지금까지 철피석곡은 주로 생리활성물질 및 성분분석에 관한 연구가 주로 이루어져 관상 가치뿐만 아니라 약용 및 의학치료소재, 화장품 원료로의 이용가치가 높아 앞으로 수요가 증가할 것으로 여겨진다. 이러한 수요에 대응하여 대량증식에 관한 몇몇 연구가 이루어졌으나 기내대량증식을 위한 구체적인 배양조건에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구를 통해 PLB 대량증식에 필요한 여러 가지 기초배양조건을 규명하여 기내 대량 증식 방법에 대한 기초자료를 제공함으로써 관상가치, 약용 및 추출물 활용가치, 소재활용의 수요를 충족시키고 아울러 멸종위기에 처해 있는 생물자원인 철피석곡을 보호에 기여할 것으로 생각된다. 약용 및 관상용으로 이용되는 철피석곡의 기내 대량증식을 위해 PLB 증식과정에서 기본배지의 종류, NAA와 BA, kinetin, thidiazuron (TDZ) 등 식물생장조절물질의 단용 또는 혼용 첨가, 탄소원의 종류 및 농도에 따른 PLB 증식 정도를 규명하고자 본 연구를 수행하였다. 아울러 대량 증식된 PLB로부터 shoot형성에 적합한 배지의 종류 및 농도와 당 농도를 규명함으로써 철피석곡의 기내 대량 증식을 위한 PLB 증식조건을 최적화하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

철피석곡의 종자를 MS (Murashige and Skoog 1962)배지에 기내파종하여 식물체를 얻은 후 MS배지에 BA 1.0 mg/L를 첨가한 배지에 유식물체를 배양하여 PLB를 유도하였다. 형성된 PLB는 H3P4배지(hyponex 3 g·L⁻¹, peptone 4 g·L⁻¹, sucrose 30 g·L⁻¹, plant agar 6 g·L⁻¹)에서 4주마다 계대배양하여 증식시켜 본 연구의 식물재료로 이용하였다. 배양환경은 온도 25°C, 광도 30 μmol m⁻²s⁻¹, 광주기 16/8시간의 조건으로 배양하였다.

배지종류, 성장조절제 및 당농도에 따른 철피석곡 PLB 성장 비교

PLB 증식에 적합한 배지의 종류를 알아보기 위해 1/2MS,

MS, VW (Vacin and Went 1949), H3P2 (Hyponex 3g·L⁻¹, Peptone 2 g·L⁻¹) H3P4 (Hyponex 3 g·L⁻¹, Peptone 4 g·L⁻¹), Orchidmax (Duchefa, Haarlem, The Netherlands)배지 등 총 6종류의 배지를 이용하였다. 또한 PLB 증식에 효과적인 식물생장조절제의 종류 및 농도를 알아보기 위해 H3P4를 기본배지로 하여 옥신류인 NAA 0.1, 1.0 mg·L⁻¹ 단용, NAA 0.1, 1.0 g·L⁻¹와 BA, 0.1, 1.0, 3.0 mg·L⁻¹, kinetin 0.1, 1.0 mg·L⁻¹ 및 TDZ 0.1, 1.0 mg·L⁻¹를 혼용하여 총 16종류의 배지를 이용하였다. 배지에 첨가되는 탄소원의 종류와 농도가 철피석곡의 PLB 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 H3P4를 기본배지로 하여 sucrose를 10, 20, 40, 60g·L⁻¹, glucose를 10, 20, 40, 60g·L⁻¹ 첨가한 배지를 이용하였다.

모든 배지는 sucrose 20g·L⁻¹, 한천 8g·L⁻¹를 첨가하였고 pH 5.8로 조정하여 250 mL의 배양용기에 50 mL 분주하여 사용하였다. 각각 배지에 약 40 mg의 PLB 덩어리를 병당 5개(약 200 mg)씩 치상하여 6반복 처리하였으며, 치상 4주 후에 PLB 생체중과 PLB의 크기, 갈변율을 조사하였다.

배지의 종류 및 농도와 sucrose 농도가 PLB로부터 Shoot 형성에 미치는 영향

PLB로부터 shoot 형성에 효과적인 배지의 종류와 적합한 sucrose의 첨가 농도를 알아보기 위해 1/4MS, 1/2MS, MS, HIP2, H3P4, 5 종류의 배지에 각각 sucrose를 10, 20, 30 g·L⁻¹씩 첨가하여 총 15 종류의 배지를 이용하였다. 각 배지는 sucrose 20 g·L⁻¹, 한천 8g·L⁻¹를 첨가하였고 pH 5.8로 조정하여 250 mL의 배양용기에 50 mL 분주하여 사용하였다. 각각 배지에 약 40 mg의 PLB 덩어리를 병당 5개(약 200 mg)씩 치상하여 6반복 처리하였으며, 치상 6주 후에 shoot 형성율, 형성된 shoot의 길이, 갈변률, PLB 생체중과 PLB의 크기를 조사하였다.

통계분석

모든 데이터는 평균±표준편차로 표시하였고, 집단 간 변이 차이를 알아보기 위해서 one-way ANOVA를 실시하여, 유의성이 있는 경우 Duncan's multiple range test로 사후검증을 실시하였다. 통계적 유의성은 P<0.05로 설정하여 분석하였다.

결과 및 고찰

배지종류에 따른 철피석곡 PLB 성장 비교

철피석곡의 PLB 기내증식에 효과적인 기본 배지를 알아보기 위해 조사한 결과는 Table 1과 같다. 철피석곡 PLB의 생체중 및 PLB 크기는 Orchidmax, H3P4 2종류의 배지에서 대체적으로 양호하였으며, 특히 Orchidmax에서 PLB 생체중과 PLB

Table 1 Effect of different media on PLB proliferation of *Dendrobium candidum* Wallich ex Lindley in vitro

Media	Fresh weight of PLB (g)/bottle	Size of PLB (mm)	Browning degree*
1/2MS	4.69±0.30d	2.8±0.1c	++
MS	2.58±0.20cd	1.9±0.0d	+++
VW	4.73±0.10cd	2.1±0.0d	+
H3P2	9.23±0.37bc	3.1±0.1b	-
H3P4	14.28±0.75ab	3.7±0.1a	-
Orchidmax	15.97±0.57a	3.9±0.0a	-

* - : no browning, +: low, ++ : middle, +++ : high

Different alphabetical letters are significantly different according to Duncan's multiple range tests at $P < 0.05$.

크기가 각각 15.97 g, 3.9 mm로 가장 양호하였다. 또한 Orchidmax, H3P4배지에서 배양한 PLB는 갈변이 되지 않았다. 반면 1/2MS, MS, VW배지에서 배양한 PLB의 경우 생체중이 낮고 크기 또한 작아 생육이 불량하였으며 PLB 일부는 갈변현상이 나타난 것을 알 수 있었다.

난과 식물 중 서양란에 속하는 심비디움, 팔레놉시스, 도리테놉시스 등 뿐만 아니라 동양란에 속하는 석곡 등의 대량 증식을 위해 PLB를 유도하여 증식하는 것이 유리한 것으로 보고된 바(Da Silva et al. 2006; Chen et al. 2000; Kim 2010; Park et al. 2003; Bae et al. 2014), 팔레놉시스의 경우, Roh(2014)는 배지별 PLB 생장을 실험한 결과 VW, Hyponex, MS배지 중에서 VW배지에서 PLB 증식효율 및 PLB로부터 신초발생율이 가장 높았다고 하였으며, Park et al.(1996)의 연구결과에서도 VW, Hyponex, MS 액체배지에서 팔레놉시스의 PLB 증식율을 비교한 결과 VW 액체배지가 PLB 증식에 가장 적합하다고 보고하였다. 반면 Kim et al.(2001)의 연구에서 MS, NDM 및 VW배지를 비교한 결과, MS와 NDM배지에서 PLB 증식율이 상대적으로 높았으며, 특히 NDM배지에서 배양된 PLB는 다른 배지의 PLB 보다 갈변이 적고 생육이 양호했다고 보고하였는데 이러한 차이는 배양 부위별로 적정배지가 다르고 PLB 유도 시 사용한 배지는 증식 시에도 영향을 미치기 때문이라고 분석하였다. 철피석곡의 경우 PLB 유도 및 기내 대량증식을 위해서는 MS배지가 가장 적합한 것으로 보고되었다(Zhou et al. 1999). 본 연구에서는 *D. candidum*로부터 PLB를 유도하여 대량증식에 적합한 기본배지를 알아본 결과, Orchidmax 배지가 가장 유리하였으며 H3P4배지 또한 양호한 것으로 나타난 반면 Zhou et al. (1999)의 연구에서 *D. candidum*의 PLB 증식에 적합하다고 보고한 MS배지에서는 오히려 PLB 증식이 가장 불량하였으며 갈변이 심하였다. 이는 비록 같은 식물 종이라 할지라도 배양환경, 배양에 사용된 품종이나 재료 등이 차이에서 기인하는 것으로 판단된다. Duchefa에서 생산된 Orchidmax배지는 무기물, 유기물, 비타민 등이 일반적인 난과 식물의 배양에 적합하게 조정된 배지로 특히 트립톤이 2 g·L⁻¹이 첨가 되었으며 배지의 산화를 막기 위해 MES (Morpholino Ethane Sulfonic acid)첨가된 것이

특징이다. 하지만 Orchidmax배지의 경우 Hyponex배지에 비해 가격이 비싸편이고, 배지내 sucrose 20 g·L⁻¹ 첨가되어 있어 실용적인 면에서 H3P4 배지가 유리한 것으로 판단하여 PLB 증식에 적합한 다양한 배양조건을 규명하기 위한 실험의 기본배지로 사용하였다.

NAA와 BA, Kinetin, TDZ의 단용 또는 혼용에 따른 PLB 증식

PLB에 효과적인 생장조절제의 종류 및 농도를 조사한 결과는 Table 2와 같다. NAA를 저농도인 0.1 mg·L⁻¹ 단용으로 첨가한 배지 또는 NAA 0.1 mg·L⁻¹에 kinetin 0.1 mg·L⁻¹을 첨가한 혼용배지에서 PLB 생체중은 각각 12.39 g과 12.72 g으로 양호하였으며 PLB 크기 또한 양호하였고 갈변현상이 나타나지 않았다. 한편 배지에 생장조절제를 첨가하지 않는 무처리배지(control)에서도 PLB 생체중과 크기 또한 11.13 g, 2.9 mm로 양호하였다. 반면 고농도의 NAA 단용배지 또는 NAA에 BA, TDZ를 첨가한 혼용배지에서는 PLB 생체중과 크기가 감소하였으며 특히 식물생장조절제의 농도가 높아질수록 생육이 현저히 감소하고 갈변현상이 심해지는 경향을 나타내었다.

난과 식물에서 PLB의 대량증식을 위해 다양한 종류의 생장조절제를 이용한 연구가 이루어진바, *Dendrobium moeniliforme*의 잎, 줄기, 뿌리에서 PLB 유도를 위해서는 NAA 1.0 mg·L⁻¹가 첨가된 배지에서 PLB 유도율이 가장 높았으며(Bae 2014), *Paphiopedium*의 경우, 1/2MS배지에 kinetin 4 μM을 첨가하였을 때 PLB의 증식율이 가장 높은 반면 BA의 첨가는 PLB 형성을 오히려 저해하였다고 보고하였다(Ng and Saleh 2011). 교잡종 *Cymbidium*의 경우 kinetin을 NAA와 혼용 첨가한 배지에서 PLB 형성 및 증식이 효과적인 것으로 보고되었다(Da Silva and Tanaka, 2006). 또한 Zhao et al. (2008)은 철피석곡(*Dendrobium cadidum* Wall ex Lindl.)의 callus로부터 PLB유도에 미치는 생장조절제 영향을 알아보기 위하여 NAA, BA, 2,4-D, kinetin을 첨가하였는데 생장조절제가 첨가되지 않은 1/2MS 배지에서의 PLB 유도 효율이 가장 좋았다고 보고하였다. 이와 같이 난과 식물의 PLB 증식은 종에 따라 생장조절물질의 종류와 농도에 따라서 PLB의 생장 양상이 다르게

Table 2 Effect of different concentrations of plant growth regulators on PLB proliferation of *D. candidum* Wallich ex Lindley in vitro

PGR (mg·L ⁻¹)			Fresh weight of PLB (g)/ bottle	Size of PLB (mm)	Browning degree *
Control			11.13±0.89abc	2.9±0.1ab	-
NAA 0.1			12.39±0.28ab	2.9±0.0abc	-
NAA 1.0			8.99±1.10abcd	3.0±0.1a	+++
NAA 0.1	BA	0.1	7.79±0.33abcd	2.5±0.3abcde	-
		1.0	7.00±1.52abcd	1.9±0.2ef	+
		3.0	7.13±0.37abcd	1.9±0.0def	+
NAA 1.0	BA	0.1	6.61±0.84cd	2.1±0.1def	+
		1.0	6.45±0.26cd	1.9±0.1def	+
		3.0	5.49±1.05cd	2.2±0.2bcdef	++
NAA 0.1	Kinetin	0.1	12.72±1.51a	2.6±0.1abcd	-
		1.0	8.06±0.04abcd	2.3±0.1abcdef	++
NAA 1.0	Kinetin	0.1	10.06±1.36abcd	2.4±0.1abcde	++
		1.0	8.02±0.96abcd	1.7±0.0f	++
NAA 0.1	TDZ	0.1	7.04±0.52cd	2.5±0.2abcde	-
		1.0	5.58±0.51d	2.3±0.1bcdef	+
NAA 1.0	TDZ	0.1	6.79±0.46bcd	2.2±0.0bcdef	+++
		1.0	6.03±0.79cd	2.1±0.2cdef	++++

* - : no browning, +: low, ++: middle, +++: high

Different alphabetical letters are significantly different according to Duncan's multiple range tests at $P < 0.05$.

나타남을 알 수 있었다.

본 연구에서 PLB 증식은 저농도의 NAA 단용배지 또는 저농도의 NAA와 kinetin 혼용한 배지에서 PLB 증식이 양호하였으며 또한 성장조절제를 첨가하지 하지 않는 배지에서도 PLB 증식이 양호한 것으로 나타난 반면 고농도의 식물생장 조절제 첨가는 PLB 생장을 저해하는 것을 알 수 있었는데 이러한 연구결과는 일치하였다(Zhao et al. 2008).

탄소원의 종류 및 농도에 따른 철피석곡 PLB의 성장 비교

배지에 첨가되는 탄소원의 종류와 농도가 철피석곡의 PLB 증식에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 배지 내 glucose와 sucrose 모두 저농도에서 PLB 생체중, 건물중, 크기가 양호한 반면 첨가농도가 증가할수록 PLB 생체중, 건물중, 크기 모두 현저히 감소하였다. PLB 갈변정도 또한 저농도에서는 갈변현상이 나타나지 않는 반면 농도가 증가할수록 갈변현상이 증가하는 것으로 나타났다. 탄소원 종류로는 glucose에 비해 sucrose를 첨가하였을 때 전반적으로 PLB 생장이 전반적으로 양호하였다. 특히 sucrose 10 g·L⁻¹을 첨가한 배지에서 PLB의 생체중은 16.71 g, 건물중은 0.64 g, 크기는 2.9 mm으로 PLB 생육이 가장 양호하였으며 갈변현상도 나타나지 않았다. 따라서 철피석곡의 PLB 증식을 위해서는 10 g·L⁻¹의 저농도 sucrose 첨가가 적합한 것으로 판단된다.

양란 심비디움의 PLB 증식을 위한 액체 배양의 경우 배지

내 sucrose 20 g·L⁻¹ 첨가 했을 때 증식율이 높다고 하였다 (Kusumoto 1980). 또한 팔레놉시스의 PLB 증식에 적합한 탄소원의 종류와 농도에 관한 연구 몇몇 연구가 이루어졌는데, Roh (2014)의 경우 sucrose 10~20 g·L⁻¹ 첨가 했을 때 PLB 생체중이 증가할 뿐 아니라 신초 발생률이 높았으며, Kim et al.(2001)의 경우 PLB 증식을 위해서는 sucrose 10 g·L⁻¹의 농도가 적합하다고 보고하였다. 본 연구에서도 sucrose를 저농도로 첨가한 배지가 고농도의 sucrose 첨가 배지에 비해 PLB 생육 및 증식이 유리하였는데 이는 고농도의 sucrose는 배지의 삼투압을 높여서 생육을 억제하기 때문인 것으로 판단된다.

다른 난과 식물 PLB 증식에 적합한 탄소원의 종류에 관한 몇몇 연구를 보면 *D. huoshanense*의 경우 PLB 생장에 적합한 탄소원을 알아보려고 액체 배지에 sucrose, glucose, fructose를 첨가한 결과 sucrose를 첨가하였을 때 glucose와 fructose를 첨가하였을 때보다 PLB 생장이 양호하였는데 그 이유로는 sucrose는 자당의 합성효소 및 분해효소의 가수분해에 의해 세포 생장에 위한 균형 잡힌 탄소원을 공급하고, 분해된 6탄당은 직접적으로 당 분해와 5탄당 인산염 과정에 직접적으로 관여하기 때문이라고 판단하였다(Zha et al. 2007). 반면 *Dendrobium* 'Alya Pink'의 경우 sucrose, glucose, fructose의 탄소원 중에서 glucose를 첨가가 PLB 증식에 가장 적합하다고 보고하였다(Nambiar et al. 2012). 본 연구에서는 철피석곡의 PLB 증식은 glucose보다는 sucrose를 10 g·L⁻¹의 저농도 첨가하였을 때 생육이 양호한 바, 난과 식물의 PLB 대량증식을

Table 3 Effect of concentrations of sucrose and glucose on PLB proliferation of *D. candidum* Wallich ex Lindley in vitro

Carbon source (g·L ⁻¹)		Fresh Weight of PLB (g)	Dry weight of PLB (g)	Size of PLB (mm)	Browning degree*
Sucrose	10	16.71±0.57a	0.64±0.01a	2.9±0.1a	-
	20	7.61±0.72c	0.48±0.03b	2.7±0.0ab	+
	40	1.33±0.19de	0.10±0.01cd	2.1±0.1c	+++
	60	0.40±0.12e	0.07±0.03d	2.1±0.1c	++++
Glucose	10	13.86±0.37b	0.56±0.01ab	2.8±0.1a	-
	20	3.81±1.06d	0.24±0.5c	2.4±0.1bc	++
	40	0.64±0.16e	0.06±0.06d	2.3±0.1c	+++
	60	0.99±0.34de	0.13±0.04cd	2.0±0.0ca	+++

* - : no browning, +: low, ++: middle, +++: high

Different alphabetical letters are significantly different according to Duncan's multiple range tests at *P* < 0.05.

Table 4 Effect of various media and sucrose concentration on induction of shoot formation from PLB in *D. candidum* Wallich ex Lindley in vitro

Media	Sucrose (g·L ⁻¹)	Rate of shoot formation (%)	Length of shoot (mm)	Fresh weight of PLB (g)/ bottle	Size of PLB (mm)	Browning degree*
1/4 MS	10	83.3±3.3a	1.2±0.2a	10.18±1.2bc	2.3±0.1bcdef	-
	20	55.0±5.0bcd	0.6±0.1a	12.05±1.1abc	3.1±0.0a	-
	30	35.0±5.0defg	1.0±0.2a	9.53±0.6cd	2.7±0.1abc	-
1/2 MS	10	78.3±1.7ab	1.3±0.2a	5.74±0.6efg	2.3±0.2bcdef	-
	20	46.7±1.7cde	1.0±0.3a	6.08±0.7def	2.0±0.1ef	-
	30	40.0±1.5cdef	1.2±0.2a	5.31±0.6efg	2.2±0.1def	-
MS	10	20.0±0.0fg	0.8±0.2a	2.09±0.9g	1.9±0.1f	+++
	20	20.0±0.0fg	1.3±0.1a	3.79±0.3fg	1.9±0.1f	-
	30	25.0±5.0efg	1.5±0.0a	2.77±0.4fg	1.9±0.1f	+++
HIP2	10	81.3±1.3a	1.3±0.1a	13.46±0.6ab	2.6±0.1abcd	-
	20	58.8±1.3bc	1.1±0.1a	12.01±0.6abc	2.8±0.0abc	-
	30	20.0±0.0fg	0.7±0.2a	5.57±1.3efg	2.5±0.1bcde	++
H3P4	10	50.0±7.1cd	0.9±0.1a	15.42±0.7a	2.8±0.1ab	-
	20	40.0±0.0cdefg	0.8±0.3a	8.22±1.2cde	2.6±0.1abcde	+
	30	16.0±4.0g	1.3±0.4a	3.60±0.3fg	2.3±0.1cdef	+++

* - : no browning, +: low, ++: middle, +++: high

Different alphabetical letters are significantly different according to Duncan's multiple range tests at *P* < 0.05.

위해서는 증식하고자 하는 난의 종류 및 재배종에 적합한 탄소원의 종류 및 농도에 관한 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

배지의 종류 및 농도와 sucrose 농도가 PLB로부터 shoot 형성에 미치는 영향

철피석곡의 PLB로부터 shoot 형성에 적합한 배지의 조건을 알아보기 위해 염류의 농도를 달리한 3종류의 MS배지 (1/4MS, 1/2MS, MS)와 2종류의 HIP2, H3P4배지에 sucrose를 10, 20, 30 g·L⁻¹ 첨가하여 PLB를 배양한 결과는 Table 4와 같다. 무기염의 농도가 낮은 1/4MS, HIP2배지에 sucrose가 10

g·L⁻¹ 첨가된 배지에서 shoot의 형성율이 각각 80.0%, 81.3%로 높았으며 shoot 길이도 1.2 mm와 1.3 mm로 양호한 편이었다. 하지만 sucrose농도가 높아질수록 shoot의 형성율이 급격히 낮아지는 경향을 나타내었다. 한편 무기염의 농도가 높은 1/2MS, MS, H3P4배지의 경우 무기염의 농도가 낮은 1/4MS, HIP2배지에 비해 shoot 형성율이 전반적으로 낮은 경향을 나타내었다. 특히 MS배지의 경우 다른 배지에 비해 sucrose 농도에 상관없이 shoot 형성율이 20%로 매우 낮았다. 증식된 PLB 생체중과 크기는 H3P4배지에 sucrose를 10 g·L⁻¹ 첨가한 배지에서 각각 15.42 g, 2.8mm로 가장 높았으며 shoot의 형성율이 양호하였던 1/4MS, HIP2배지에 sucrose가 10~20 g·L⁻¹

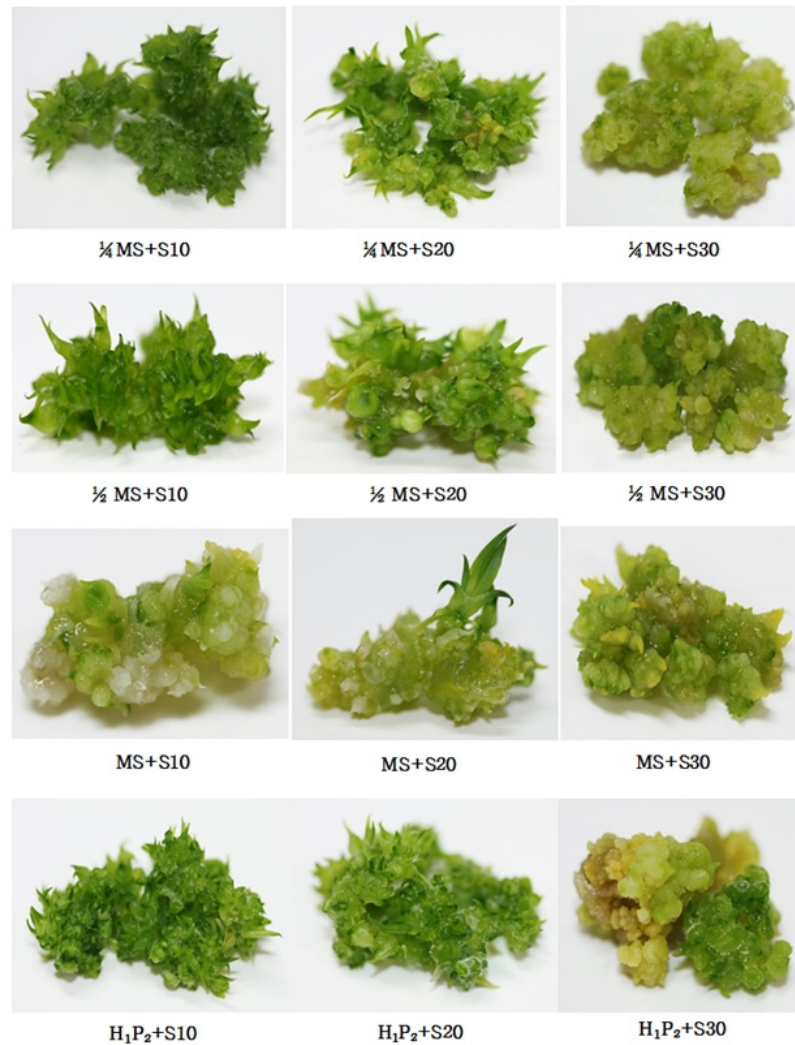


Fig. 1 Multiple shoot and PLB cluster that obtained on various media and sucrose concentration (S10; sucrose $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, S20; sucrose $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, S30; sucrose $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)

첨가된 배지에서도 PLB 증식 또한 양호한 편이었다. 반면 shoot 형성율이 가장 낮은 MS배지에서는 PLB 생체중과 크기 또한 가장 낮았다. 따라서 증식된 PLB로부터 shoot를 형성율을 높이기 위해서는 무기염의 농도가 낮은 $1/4\text{MS}$, H1P2 배지에 저농도의 sucrose $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 을 첨가하는 것이 바람직하며 이들 배지는 PLB 증식에도 바람직한 것으로 판단된다.

PLB를 통한 난과 식물의 대량증식과정에서 증식된 PLB로부터 shoot 유도는 필수적인 단계이며 이에 관한 연구는 *Phalaenopsis* (Chen and Piluek 1995), *Oncidium* (Chen and Chang 2000), *Cypripedium* (Shimura and Koda 2004)과 *Dendrobium* (Martin et al. 2005) 등 다양한 난과 식물을 대상으로 이루어져 왔다. 석곡속 중 *Dendrobium officinale*의 기내 배양시 MS, N6, $1/2\text{MS}$ 의 배지 중 MS배지에서의 multiple shoot 형성율은 높지만 갈변현상이 일어나고, 잎과 shoot의 생장이 억제되었다고 보고하였는데(Chen et al. 2014), 본 연구에서는 MS배지에서 갈변현상도 매우 심하였으며 shoot 형성율이 가장 낮았

다. Udomdee et al.(2015)은 *Dendrobium snowflake* ‘RED STAR’의 PLB 증식을 통한 식물체 재생을 위한 연구에서 sucrose $0.06 \sim 0.09 \text{ M}$ 과 maltose $0.06 \sim 0.12 \text{ M}$ 를 첨가했을 때 PLB 증식 효율이 높았지만 PLB에서 shoot로의 전환은 maltose, sucrose, sorbitol, glucose, fructose를 첨가했을 때 효율이 높다고 보고하였다. 본 연구의 철피석곡의 PLB로부터 shoot 형성은 H1P2 배지에 sucrose $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 첨가했을 때 shoot 형성율과 shoot의 길이가 양호할 뿐 아니라 PLB 증식에도 적합하다고 판단된다.

적 요

본 연구는 철피석곡의 PLB 기내 대량증식 방법에 대한 기초 자료를 제공함으로써 다양한 분야의 소재활용 수요를 충족시키고 아울러 멸종위기에 처해 있는 철피석곡을 보존하고

자 수행하였다. 종자유래의 PLB 재 증식에는 H3P4 기본배지에 NAA 0.1 mg·L⁻¹과 kinetin 0.1 mg·L⁻¹를 혼용한 배지가 가장 적합하였다. H3P4 기본배지 내 탄소원으로 sucrose 10 g·L⁻¹를 첨가했을 때 PLB의 생장이 가장 양호하였다. 재 증식된 PLB로부터 shoot 형성율은 1/4MS 또는 HIP2 배지에 sucrose를 10 g·L⁻¹ 첨가한 배지에서 가장 높았고 shoot의 초장도 길어졌다.

사 사

본 연구는 2016년도 순천대학교 학술연구비의 지원으로 수행되었다.

References

- Bae KH, Kim NY, Song JM, Song G (2014) In vitro Propagation and protocorm-like body formation of endangered species, *Dendrobium moniliforme*. J For Sci 30:126-132
- Chen B, Trueman SJ, Li J, Li Q, Fan H, Zhang J (2014) Micro-propagation of the endangered medicinal orchid, *Dendrobium officinale*. Life Sci J 11:526-530
- Chen JT, Chang WC (2000) Plant regeneration via embryo and shoot formation from flower-stalk explants of *Oncidium* 'Sweet Sugar'. Plant Cell Tissue Organ Cult 62:95-100
- Chen W, Cun SX (2002) In vitro rapid propagation of stems of *Dendrobium candidum*. Plant Physiology Communications 38:145-145
- Chen YC, Piluek C (1995) Effects of thidiazuron and N6-benzylaminopurine on shoot regeneration of *Phalaenopsis*. Plant Growth Regu 16:99-101
- Cui HY (2012) Production of biomass and bioactive compounds form protocorm like bodies of *Dendrobium candidum* using bioreactor system. Ph.D. thesis. Chunbuk National University, Cheongju, Korea.
- Cui HY, Lee EJ, Abdullahil Baque Md, Cui XH, Jang YS, Paek KY (2011) Biomass and polysaccharide production in PLB and multiple shoot culture of *Dendrobium candidum*: Effect of different hyponex media. Korean J Hortic Sci Technol 29:175-176
- Cui HY, Murthy HN, Moh SH, Cui Y, Lee EJ, Paek KY (2014) Protocorm culture of *Dendrobium candidum* in balloon type bubble bioreactors. Biochem Eng J 88:26-29
- Da Silva JAT, Chan MT, Chai ML, Tanaka M (2006) Priming abiotic factors for optimal hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae) PLB and callus induction, plantlet formation, and their subsequent cytogenetic stability analysis. Sci Hortic 109: 368-378
- He JB, Zheng CZ, Wang SL (1982) Multiplication of protocorm of *Dendrobium candidum*. Acta Bot Yunnanica 4:211-212
- Jones WE, Kuehnle AR, Arumuganathan K (1998) Nuclear DNA content of 26 orchid (Orchidaceae) genera with emphasis on *Dendrobium* Ann Bot 82:189-194
- Kim JH (2010) production system in vitro *phalaenopsis* plants and problems on domestic tissue culture facilities in Korea. 1th Orchid symposium pp. 11-19
- Kim MS, Eun JS, Kim JY (2001) Effect of culture medium, temperature, and light intensity on PLB propagation of *Phalaenopsis*. Korean J Plant Tissue Culture 28:215-219
- Kim TJ, Kim JH, Lee JW, Lee CH, Paek KY (2001) Effect of different shading on CO₂ uptake and growth and development of *Dendrobium phalaenopsis*. Korean J Hortic Sci Technol 42:111-115
- Kusumoto M (1980) Effects of coconut milk, agar, and sucrose concentrations, and media pH on the proliferation of *Cymbidium* protocorm-like bodies cultured in vitro. J Jpn Soc Hortic Sci 48:503-509
- Li B, Wei J, Wei X, Tang K, Liang Y, Shu K, Wang B (2008) Effect of sound wave stress on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation of *Dendrobium candidum* Colloids Surf B: Biointerfaces 63:269-275
- Li Y, Wang C, Wang F, Dong H, Guo S, Yang J, Xiao P (2010) Chemical constituents of *Dendrobium candidum*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 35:1715-1719
- Li Y, Wang CL, Wang YJ, Guo SX, Yang JS, Chen XM, Xiao PG (2009) Three new bibenzyl derivatives from *Dendrobium candidum*. Chem Pharm Bull 57:218-219
- Liu W, Wang B, Duan C, Li B (2005) A method for isolating functional RNA from callus of *Dendrobium candidum* contented rich polysaccharides. Colloids Surf B Biointerfaces 42:259-262
- Martin KP, Geevarghese J, Joseph D, Madassery J (2005) In vitro propagation of *Dendrobium* hybrids using flower stalk node explants. Indian J Exp Biol 43:280-285
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497
- Nambiar N, Tee CS, Maziah M (2012) Effects of organic additives and different carbohydrate sources on proliferation of protocorm like bodies in *Dendrobium* Alya Pink. POJ 5(1): 10-18
- Ng CY, Saleh NM (2011) In vitro propagation of *Paphiopedilum* orchid through formation of protocorm-like bodies. Plant Cell Tissue Organ Cult 105:193-202
- Park CM, Kwon JC, Han NK, Joung MS, Paek KY, Choi JW (2014) Comparative study of protocorm-like body and multiple shoots from *Dendrobium Candidum* on biological activities. J Soc Cosmet Scientists Korea 40:29-36
- Park SY, Murthy HN, Paek KY (2003) Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. Plant Sci 164:919-923
- Park YS, Kakuta S, Kano A, Okabe M (1996) Efficient propagation of protocorm-like bodies of *Phalaenopsis* in liquid medium. Plant Cell Tissue Organ Cult 45:79-85
- Roh HS, Kim JB (2014) Establishment of proliferation and regeneration system of PLBs in *Phalaenopsis* by treatments of a variety of types of medium, sucrose concentrations and anti-browning agents. J Plant Biotechnol 41:223-228

- Shiau YJ, Nalawade SM, Hsia CN, Mulabagal V, Tsay HS (2005) In vitro propagation of the Chinese medicinal plant, *Dendrobium candidum* Wall. Ex Lindl., from axenic nodal segments. In Vitro Cell Dev Biol, Plant 41:666–670
- Shimura H, Koda Y (2004) Micropropagation of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* through protocorm-like bodies derived from mature seeds. Plant Cell Tissue Organ Cult 78: 273–276
- Su H, Yang Y (2006) State quo of *Dendrobium* spp. resources of nabanhe nature reserve and countermeasures for protection. For Invent Plann 31:100–102
- Sun YY, Li K, Li CR, Duan ML, Su JK (2006) Current situation and development countermeasures of *Dendrobium* spp. industry for medicinal purpose of Yunnan province. For Invent Plann 31:45–47
- Udomdee W, Wen PJ, Chin SW, Chen FC (2015) Effect of carbon source on protocorm-like body induction, proliferation and regeneration in *Dendrobium snowfalke* ‘RED STAR’. Acta Hort 1078:113–120
- Vacin E F, Went E W (1949) Some pH changes in nutrient solutions. Botanical Gazette 110:605–613
- Ye XL, Cheng, SJ, Wang FX, Qian NF (1988) Morphology of immature seeds and development in vitro of *Dendrobium candidum*. Acta Bot Yunnanica 10:285–290
- Zha XQ, Luo JP, Jiang ST, Wang JH (2007) Enhancement of polysaccharide production in suspension cultures of protocorm-like bodies from *Dendrobium huoshanense* by optimization of medium compositions and feeding of sucrose. Process Biochem 42:344–351
- Zhang Q, Fang Y (2004). Tissue culture and in vitro seedling and protocorm-like body examination of *Dendrobium candidum*. Xibe Zhiwu Xuebao 25:1761–1765
- Zhao P, Wang W, Feng FS, Wu F, Yang ZQ, Wang WJ (2007) High-frequency shoot regeneration through transverse thin cell layer culture in *Dendrobium Candidum* Wall Ex Lindl. Plant Cell Tissue Organ Cult 90:131–139
- Zhao P, Wu F, Feng FS, Wang WJ (2008) Protocorm-like body (PLB) formation and plant regeneration from the callus culture of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. In Vitro Cell Dev Biol, Plant 44:178–185
- Zhao X, Sun P, Qian Y, Suo H (2014) *D. candidum* has in vitro anticancer effects in HCT-116 cancer cells and exerts in vivo anti-metastatic effects in mice. Nutr Res Pract 8:487–493
- Zhou G, Xie W, Cheng L. (1999) Factors Affect the growth of *Dendrobium canducum* Wall. ex Lindl. in Vitro. Jiangxi Science 17:231–235
- Zhu Y, Si J, Guo B, He B, Zhang A (2010) Quantitive variation of polysaccharides content in cultivated *Dendrobium candidum*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 35:427–430