

석사학위논문

*Cymbidium nipponicum*의
자가수분습성과 기내배양에 관한 연구



제주대학교 대학원

원예학과

강윤숙

2002년 12월

*Cymbidium nipponicum*의
자가수분습성과 기내배양에 관한 연구

지도교수 소 인 섭

강 윤 숙

이 논문을 농학 석사학위 논문으로 제출함

2002년 12월

강윤숙의 농학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____

위 원 _____

위 원 _____

제주대학교 대학원

2003년 2월

Self-Pollination and *In Vitro* Culture
of *Cymbidium nipponicum*

Kang, Youn-suk

(Supervised by Professor So, In-sup



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF
AGRICULTURE

DEPARTMENT OF HORTICULTURE
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2002. 12

목 차

Summary	1
I. 서 론	3
II. 연구사	5
III. 재료 및 방법	10
IV. 결과 및 고찰	16
V. 적 요	28
VI. 인용문헌	29

Summary

This study aimed at investigating the pollination process of *Cymbidium nipponicum* after it being flowered and its genetic relationship within individuals and between regions. In addition, this study established its cycle system from seeding to flowering *in vitro* of *Cymbidium nipponicum*, and identified that it is characterized as a unique self-pollination in the *Cymbidium* genus.

1. In *Cymbidium nipponicum*, self-pollination occurred a week after it being flowered, and embryos were formed sufficiently 5 months after it being flowered.
2. It was identified from RAPD analysis that there was no genetic relationship in terms of within individuals and between regions.
3. In germination of *Cymbidium nipponicum*, the liquid Knudson C medium was effective, and Peters 3g/L medium and Kyoto medium which include the activated charcoal was effective for rhizome culture.
4. The treatment in dark was more effective for the growth of rhizome, the number of flowering, and the length of flower stalk than the treatment in light. However, the treatment in light was more effective for the number of flower bud being formed than the



treatment in dark.

5. The two examination TTC test and *in vitro* culture - identified that its seed obtained from self pollination *in vitro* is being germinated as normal.



I. 서 론

난과식물(Orchidaceae)은 전세계적으로 800여 속, 30,000여 종이 있다 (Bailey 와 Bailey, 1976). 우리 나라에는 전국적으로 92종, 11변종, 7품종 등 총 110종류의 야생란이 분포되어 있다. 이중 상록성인 것은 한란, 보춘화, 새우난초, 사철란 등 39종으로 약 35%를 차지하고 있으며, 낙엽성인 야생란 류는 복주머니란, 자란, 은난초, 금난초, 닭의난초, 잠자리란초 등 모두 71종 류로 약 65%를 차지하고 있다(이, 1984).

대홍란(*Cymbidium nipponicum*)은 부생식물로 잎이 없고, 지하근경에서 꽃대가 나오면서 흰색 바탕에 홍자색의 꽃이 핀다. 산림내의 썩은 식물체에 기생하여 자라는 부엽성 부생종으로 지하경은 길이 15cm 정도로 길며 백색 이고 육질이 드문드문 분지하고 가는 털과 삼각상의 인편이 있으며 그 끝에서 줄기가 나온다. 줄기는 높이 10~30cm로 직립하고 다소 작은 털이 있으며 기부가 짧은 초로 된다. 막질의 인편엽이 드문드문 수개 있지만 기부가 짧은 초로 된다. 포는 길이 0.5~1cm로 막질로 넓은 피침형이며 끝이 날카롭다. 꽃은 7월 상순~8월 중순에 줄기 끝에 2~6개가 총상화서로 달리며 (김 과 이, 1997), 환경부에서 특정 야생 식물 제 49호로 지정, 보호하고 있다(제주도, 1999).

종명 '*nipponicum*'은 국내에서 통용되는 이름은 대홍란인데 그 이유는 최초 채집지인 전남 해남군 대홍사(현 대둔사)의 지명에서 유래한다.

제주도(해발 400m 이하), 남해안 도서(진도·남해도·미륵도·거제도) 및 남부지방(전남, 전북 고창, 경남 양산·울산, 경북 포항) 등지에 소수가 자생한다. 또한 세계적으로는 일본, 인도차이나 반도, 인도, 뉴기니까지 광범위하

게 분포하는 남방계 식물이다(김 과 이, 1997).

일반적으로 난과식물은 단자엽 식물 중에서 가장 진화한 식물군으로 분류되는데 증거로는 거의 모든 종류가 타가수분을 함으로써 종의 분화와 진화가 다양하게 존재하기 때문인 것으로 알려져 있다. 특히 *Cymbidium* 속 난은 열대로부터 온대지방까지 광범위한 분포지역을 점하고 있는 바 난과 식물군 중에서도 가장 진화한 속에 해당된다.

그러나 대부분의 *Cymbidium* 속과는 달리 개화 후 다른 수분 매개체의 도움 없이 자가수분을 하는 특성이 대홍란에서 발견되었기에 이들 식물종만이 갖는 생육습성상의 특이성을 관찰하며, 증거제시하고 대홍란의 기내배양을 확립하고자 본 시험을 실시하였다.



II. 연구사

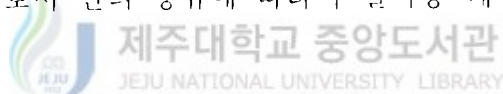
난과식물은 다른 식물과는 달리 종속간에 교잡이 비교적 쉽게 일어나고 있다. 난과 식물은 암술과 수술은 같은 주두부(column)에 있는데 수술은 그 맨 윗 부분에 있으며, 이에는 6개의 화분괴(pollinium)가 들어 있고, 그 바로 밑 약간 들어간 곳에 점액이 고인 암술머리(stigma)가 있다. 그러나 이들은 자가불화합성을 나타내며, 1개의 화분괴는 수백만 개의 화분립으로 구성되었다(郭, 1994). 자연적이거나 인공적이거나 교잡종으로 알려진 수적인 면에서 난과 식물과 비교할 만한 科(family)는 없을 것이다(Garay 와 Sweet, 1974). 1856년 *Calanthe dominyi*가 처음으로 인공교잡에 성공한 이래, 교잡종은 32,000 종에 이르고 해마다 1,000 종씩 증가하고 있다(Garay 와 Sweet, 1974; 郭, 1994).

난과 식물은 수분으로 인해 배주가 발달하게 되고(Heslop Harrison, 1957), 과산화 효소의 활력이 증진되며(Alvarez, 1968), 질소성분, 물, 인산, 탄수화물이 다른 부위에서 주두로 이동하여(Gessner, 1948; Oertli 와 Kohl, 1960), 주두와 자방의 건물중이 증대되고 인산이 축적된다(Oertli와 Kohl, 1960). 소화경의 굴곡이 변화하고(Laibach, 1930), 꽃잎과 꽃받침의 붕괴와 위조를 가져오며(Poddubnaya Arnoli 와 Selezeva, 1957), 주두가 폐쇄되며, 주두와 자방이 부풀게 되고(Hsiang, 1951a, b), 주두와 설판에 안토시아닌이 생성된다(Ames, 1948; Hsiang, 1951a). Arditti 와 Flick(1976)은 수분 후의 많은 현상들은 설판과 주두 부위에서 조절하는 것처럼 보이며, NAA가 화분의 역할을 한다고 보고하였다.

난과 식물의 종자는 매우 미세하고, 미숙배가 한 층의 세포로 된 종피에 싸여 있는 불안정한 배와 배유만 있거나, 배유가 전혀 없는 경우도 있다. 이

와 같은 종자의 특성 때문에 mycorrhiza와 공생에 의해서만 발아가 가능하므로 자연 상태에서의 발아율은 대단히 낮다. 이러한 난과 식물에 관한 연구는 Bernard가 *Noeottia*의 뿌리에 균사가 침입하여 공생한다고 기록한 이후(Arditti 등, 1972), 난과 난균과의 공생에 관한 많은 연구가 있었다(Hadley, 1970; Hadley 와 Williamson, 1972; Hench 등, 1981). 한편 난의 종자 발아에 관한 연구로는 1962년 Knudson이 난균의 도움이 없이 난의 종자를 땅이 첨가된 한천 인공 배지에서 발아시킬 수 있음을 보고한 이래 난종자 발아용 배지에 대한 연구가 많이 이루어져 있다(Downie, 1943; Ernst, 1975; Melntyre 등, 1972; Murashige 와 Skooh, 1962; Reyburnm, 1978).

Knudson (1946)은 *Cattleya*의 발아용 배지로는 Knudson C배지가 B배지보다 양호하다고 하였으며, *Cypripedium*의 경우 C배지보다는 B배지에서 좋은 결과를 얻음으로서 난의 종류에 따라서 발아용 배지가 다르다고 보고하였다.



Kohl (1962)은 *Cymbidium* 종자 발아시 암조건에서 발아가 잘 된다고 하였으며 鳥 등(1965)은 *Cymbidium* 종자 발아시 Knudson C배지가 B배지보다 효과적이라고 하였다.

Kano (1965)는 원예용 복합 비료인 Hyponex를 첨가하여 간편하면서도 생육에 효과적인 배지를 개발하였고, Kellman (1975)은 *Goodyera oblongifolia*의 경우 명, 암조건에서 모두 발아가 잘 되나, *G. resselate*는 명조건에서만 발아가 된다고 하였다. Harvais (1973)는 *Cypripedium reginae*의 종자발아시 25°C에 암배양 한 것이 발아가 양호하였으며, 배지 내의 낮은 질소 수준과 높은 염소 수준을 요구한다고 하였다. Ichihashi 와 Yamashita (1977)에 의하면 자란의 종자는 종자발아시 암모니움 이온을 요구하지 않으나 생육시에는 암모니움 이온이 생육이 촉진시킨다고 하였다.

Dennis 등(1981)은 *Paphiopedilum*종자 발아시 Norstogqowl에 8개월간 암

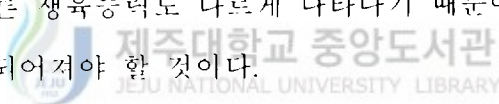
배양하는 것이 가장 효과적이라고 하였으며, 전과 정 (1978)은 석곡의 종자 발아시 Hyponex 3g/L에 peptone 5g/L나 tryptone 1g/L 첨가 배지가 유효하다고 하였으며, 서당은 3% 첨가가 좋다고 하였다. 정과 서 (1982)는 자란의 종자 발아시 35% H₂O₂용액에 35분간 종자를 살균하여, Kyoto Solution I에서 명배양 할 때 발아 및 초기 생육이 촉진된다고 하였으며, 정 (1980)은 풍란의 종자 발아시 Kyoto Solution II가 양호하다고 보고하였다.

鄭 등(1980)은 나도풍란의 종자 발아시 Nf G배지에서 79.0%로 발아가 가장 양호하다고, 건란은 Tsuchiya and Nirsch, Kyoto Solution II와 Nf G배지에서 발아가 양호하였다고 하였다(정과 전, 1983). 한편 한국춘란의 종자 발아시 소와 이 (1985)는 Kyoto Solution II 배지가 발아가 양호하다고 보고하였으며, 鄭 (1980)은 Hyponex 3g/L에 peptone 2g/L를 첨가하거나, Hyponex 3g/L에 peptone 4g/L를 첨가한 경우 암상태에서 발아가 잘 되었다고 하였다. 사철란의 경우 Kyoto Solution II 배지에서 암배양시 발아가 잘되었고, 배지의 당의 농도는 30%가 양호하였다(박, 1985).

Ardirtti (1967)는 난의 속과 종에 따라서 peptone의 요구도가 다르다고 하였는데, *Paphiopedilum*의 종자 발아시 배지내 peptone의 첨가가 유효하며 암배양하는 것이 발아에 효과적이라 보고하였다(Stimart 등,1981).

난과 식물에는 동일종·속이라 하더라도 각각의 발아와 묘의 생육을 주관하는 요인들이 다르기 때문에 개개의 대상식물에 따른 연구가 필요하게 된다. 난류 배양시 shoot 분화와 유묘생산에 있어서는 한란이나 춘란과 같은 온대산 *Cymbidium*류는 열대산 *Cymbidium*류와 달리 종자의 발아율이 지극히 저조할 뿐만 아니라 발아된 개체들마저도 protocorm이 생성되지 않고 대신 rhizome화하여 新芽나 뿌리의 분화가 잘 이루어지지 않으며, 성장점 배양을 하더라도 근경으로 분화되고 성장속도도 매우 느린데 한란 역시 개체와 뿌리의 분화가 잘 되지 않는다. 따라서 한란을 비롯한 온대산

*Cymbidium*류를 대량번식 하고자 할 때는 근경을 급속증식과 증식된 근경으로부터 가능한 다수의 新芽를 분화시키고 뿌리의 발생을 유도하여야 된다 (Ueda 와 Torikata, 1969). 근경의 급속증식 배양용 배지의 종류로서는 Whit배지(White, 1963), MS배지(Murashige 와 Skoog, 1962) 및 Hyponex 배지(Kano, 1965)가 일반적으로 사용되어 왔으며, 한란의 근경번식을 위하여 Kokubu 등 (1980)은 MS배지에 NAA 2mg/L를,李 등은 NAA0.1mg/L를 첨가한 배지에서 근경생장이 양호하다고 보고하였다. 한란의 shoot 분화에 있어서는 Kokubu 등 (1980)은 MS배지에 BA 5mg/L 첨가한 배지에서,李 등 (1984)은 MS배지에 BA 10mg/L 첨가한 배지에서 鄭 등 (1985)은 NAA 1mg/L와 kinetin 0.5mg/L 첨가한 배지에서 양호하다고 보고하였다. 이와 같이 shoot 분화 배지는 *Cymbidium*의 종에 따라 사용배지를 다르게 할 수 있었으며 그에 따른 생육능력도 다르게 나타나기 때문에 shoot 분화 배지에 대한 연구는 계속되어야 할 것이다.



RAPD(random amplified polymorphic DNA)법은 유전적인 차이를 확인할 수 있도록 했다(Williams 등, 1990; Welish 와 McClelland, 1990). 이러한 분자적인 지표(molecular marker)들은 형태적이거나 생화학적인 지표들보다 더욱 정확하게 유전적인 관계를 추정할 수 있다. 왜냐하면 첫째 잠재적으로 수적인 면에서 제한이 없고, 둘째, 환경에 영향을 받지 않으며, 셋째 연관지도(linkage map)로 조직화 할 수 있기 때문이다(Soller 와 Beckmann, 1983; Helentjaris 등, 1986). RAPD법은 RFLP(restriction fragment length polymorphism)법에 비해 기술적으로 간단하고 비용이 적게 든다. 그러나 반응조성물의 농도나 PCR 증폭조건 등에 의해 밴드패턴의 재현성이 영향을 받을 수 있다(Weeden 등, 1992). 그럼에도 불구하고 분자적 지표에 관한 연구에서 유전자형의 유전적 근연관계를 추정할 때 RAPD법과 RFLP법을 비교한 결과 유사한 결과가 나타났다(dos Santos 등, 1994). RAPD법을 이용

하여 주로 품종간의 근연관계나 품종의 분류 등에 많이 이용되어 왔는데, 난과식물에서는 춘란, 한란 등의 동양계 *Cymbidium*과 양란 *Cymbidium*, 열대 원종인 *Cymbidium aloifolium*, *Dendrobium*, *Phalaenopsis* 등 14종과 춘란과의 교배친화성을 RAPD법을 이용하여 분석한 보고가 있었다(최, 1996)

본 연구에서는 대홍란의 수분생리를 관찰하고, Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)법을 이용하여 개체간의 근연관계를 조사하였다.

또한 기내배양을 통한 자가수정 확인 및 수정 후 형성된 종자의 활력을 검정하였고, 종자발아에서 개화까지의 전 생육단계에 대한 배양과정을 확립하였다.



III. 재료 및 방법

공시재료로는 제주도 한라산의 영실 일대, 성읍리 일대 그리고 서광리 일대에서 자생하고 있는 대홍란의 근경을 채취하였고 제주도 외 지역으로는 전남 해남의 대홍사일원에서 동, 서, 남부지역을 설정하여 자생하고 있는 3개체를 채취하여 사용하였다. 채취된 근경은 대체로 5~10cm 길이, 2~3mm 두께의 것을 선별하여 난식재용 플라스틱화분(직경 15cm)을 사용하였고 식재재료는 바크를 이용하였으며 화분 당 4개씩의 근경을 심어 재배 후의 결과를 관찰하였다. 식재 2개월 후 개화가 시작되는 화분은 여타의 수분매개체가 접근하지 못하도록 망실에 옮겨 개화과정에 따라 시간별로 주두의 변화를 관찰하였고, 자방의 길이와 두께의 변화를 측정하였다.

자가수분은 유전적인 다양성을 감소시킬 것으로 생각되어 RAPD법을 이용하여 근연관계를 분석하였다. RAPD분석을 위한 genomic DNA는 PVP와 SDS로 정하고 칼로로포름추출방법을 사용하여 순수 분리하였다(Dellaporta 등, 1983). 대홍란 근경을 5 μ L(한 방울)의 1%(v/v) 2 mercaptoethanol을 넣고 잘 마쇄한 후 300 μ L extraction buffer [250mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), 200mM Tris/HCl(pH 8.0)]를 넣고 잘 섞어 실온에서 30분간 방치하였다. 여기에 10% polyvinylpyrrolidone(soluble PVP, Sigma, MW 10000) 90 μ L를 첨가하여 잘 섞은 후 1/2vol.의 7.5M ammonium acetate(NH₄OAc)를 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다가 chloroform/isoamyl alcohol을 1vol. 넣고 2~3분 동안 반응시킨 후 10분 동안 원심분리(10,000g, 4 $^{\circ}$ C)하여 상등액만을 분리하여 1vol.의 isopropanol을 넣고 20 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 침전시켰다. Isopropanol 혼합물은 침전 후 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심분리(10,000g)하여 상등

액을 따라 비리고 펠렛을 말린 후 500 μ L TE buffer [10mM Tris/HCl (pH 8.0), 0.1mM EDTA (pH 8.0)] 에 녹여 RNase 2 μ L를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시켜 RNA를 분리하고 다시 chloroform/isoamylalcohol을 1vol.넣고 반응시킨 후 원심분리하여 상등액을 취하고, 이것을 다시 isopropanol로 침전시킨 후 펠렛을 얻어 30 μ L의 3차 증류수로 녹여 DNA를 얻었다. DNA의 양은 Lamda DNA를 일련의 농도로 구배하여 agarose gel에서 비교하거나 EtBr(ethidium bromide) 직접 염색하여 비교하는 방법과, spectrophotometer로 측정하는 방법을 모두 사용하여 측정하였다(Sambrook 등, 1989).

유연관계분석을 위한 primer는 Canada의 British Columbia 대학에서 구입한 인위 합성된 10 mer(10 uncles)들 중에서 예비실험을 통하여 다양한 polymorphism이 인정된 19개의 primer를 사용하였다(Table 1.). DNA 증폭 반응을 위한 첨가요소의 기준량은 0.27 μ M primer와 1~5ng genomic DNA 용액에 1X buffer(10mM Tris·HCl, pH8.0, 50mM KCl, 0.1% Triton X 100, FINNZYNES Oy, Finland), 2.0mM MgCl₂, 200 μ M dNTP mix(dATP, dTTP, dGTP, dCTP, FINNZYNES Oy, Finland)와 0.5U의 Dynazyme(Thermus brockianus, FINNZYNES Oy, Finland)을 첨가하여 총 14 μ l로 하고, 동일량의 mineral oil을 첨가액에 overlay한 것을 기준으로 하였다. 증폭조건은 PTC-100 PCR 증폭기(MJ Research Inc.)로 94 $^{\circ}$ C (denaturation) 15초, 37 $^{\circ}$ C (annealing) 30초, 72 $^{\circ}$ C (extension) 1분으로 총 45cycles을 수행하였으며 cycle 전 초기 denaturation을 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 시켰고, 마지막 extension은 72 $^{\circ}$ C에서 5분간하였다. 증폭된 DNA는 1.4% agarose gel로 전기영동한 다음 EtBr(ethidium bromide)로 염색시킨 후 UV light에서 비교 관찰하였다.

Table 1. Primer sequence used on the *Cymbidium nipponicum* RAPD

Primer NO. ^z	Sequences
UBC 701	5' -CCCACAACCC 3'
UBC 705	5' -GGAGGAAGGA 3'
UBC 707	5' -CCCAACACCC 3'
UBC 711	5' -CCCACACCCA 3'
UBC 717	5' -CCCACACCCA 3'
UBC 720	5' -GGGAGGGAGA 3'
UBC 723	5' -CCCTCTCCTC 3'
UBC 731	5' -CCCACACCAC 3'
UBC 735	5' -GGGAGAGGAG 3'
UBC 748	5' -CCCTTCTCCC 3'
UBC 749	5' -GGGAGGAGAG 3'
UBC 753	5' -GGGAGGAGGA 3'
UBC 756	5' -CCCTCCTCCT 3'
UBC 760	5' -CCTTCCCTCC 3'
UBC 767	5' -ACCCACCACC 3'
UBC 779	5' -CCTTTCTCCC 3'
UBC 784	5' -GTGGGTGTTG 3'
UBC 789	5' -GGAAGGGAGA 3'
UBC 796	5' -AGAGGGAGGA 3'

^z Primer accession number of University of British Columbia in Canada

모든 다형화 밴드(polymorphic band)는 증폭된 DNA 조각의 존재유무에 따라 밴드가 나타난 것은 1, 밴드가 나타나지 않는 것은 0으로 하여 Nei dissimilarity(genetic distance) index(Nei and Li, 1979)를 사용하여 분석하였으며, 그 식은 다음과 같다.

$$\text{Dissimilarity} = 1 - 2N_{XY}/(N_X + N_Y),$$

N_{XY} = 유전자형 X와 Y사이에서 같은 분자량의 증폭된 DNA 조각의 수,

N_X = 유전자형 X에서 증폭된 DNA 조각의 수,

N_Y = 유전자형 Y에서 증폭된 DNA 조각의 수.

난 품종 혹은 계통간의 유전 특성에 따른 변이도 작성을 위하여 NTSYS program (Exeter Software, Setauket, N. Y.)을 사용하였으며, Sneath와 Sokal에 의해 개발된 비가중산술방식(UPGMA;unweighted pair group method with arithmetic averages)을 통계방식으로 채택하였다.

재현성 있는 결과를 위하여 순수분리한 DNA는 희석 후 각 primer 마다 3회의 반복실험을 실시하였으며, DNA polymerase는 Dynazyme 한 가지만을, PCP tube는 Perkin Elmer사의 Thin wall만을 사용하였다.

무균발아 실험은 자연에서 자가수정 후 형성된 성숙한 꼬투리를 채취하여 사용하였다. 종자는 NaOH 10%에 소독을 한 후 O₂의 투수성을 감안해서 Lipid(기름성분)를 제거하기 위해 KOH 0.1N에 1시간 침지하여 상피처리를 하였다. 배지는 MS, Kyoto, Knudson C 배지에 설탕 30g/L 첨가를 기본으로 peptone의 첨가 여부와 액체 고체배지로 나누어 시행하였는데 배지의 조성은 다음과 같다.

- 1) MS + sucrose 30g/L + agar 7g/L
- 2) MS + sucrose 30g/L
- 3) MS + sucrose 30g/L + peptone 3g/L + agar 7g/L

- 4) MS + sucrose 30g/L + peptone 3g/L
- 5) Kyoto - sucrose 30g/L + agar 7g/L
- 6) Kyoto + sucrose 30g/L
- 7) Kyoto + sucrose 30g/L + peptone 3g/L + agar 7g/L
- 8) Kyoto + sucrose 30g/L + peptone 3g/L
- 9) Knudson C + sucrose 30g/L + agrar 7g/L
- 10) Knudson C + sucrose 30g/L
- 11) Knudson C + sucrose 30g/L + peptone + agrar 7g/L
- 12) Knudson C + sucrose 30g/L + peptone

이상의 배지를 조제 후 pH 5.5~5.8로 보정하여 가압멸균기를 이용하여 121℃에서 20분간 멸균하였다. 배양환경은 주간은 16시간, 24±2℃, 광은 형광등을 이용하여 3,000lux의 조건이었고 야간은 8시간, 18±2℃의 조건이었다. 배양용기는 60mL의 test tube를 이용하여 20반복으로 하였고 파종 5개월 후에 받아수를 조사하였다.

균경배양 실험의 배지는 MS, Kyoto, Knudson C, Peters 3g/L를 기본으로 활성탄의 유무로 나누어 실시하였는데 이때 Peters의 사용은 Kyoto 배지에 들어가는 Hyponex에 비해 가격이 1/3 정도로 저렴하여 경제적인 측면을 고려하여 실행하였고 배지의 조성은 다음과 같다.

- 1) MS + sucrose 30g/L + agar 7g/L + Activated charcoal 2g/L
- 2) MS + sucrose 30g/L + agar 7g/L
- 3) Kyoto + sucrose 30g/L + agar 7g/L + Activated charcoal 2g/L
- 4) Kyoto + sucrose 30g/L + agar 7g/L
- 5) Knudson C + sucrose 30g/L - agar 7g/L - Activated charcoal 2g/L
- 6) Knudson C + sucrose 30g/L + agar 7g/L
- 7) Peters 3g/L - sucrose 30g/L - agar 7g/L - Activated charcoal 2g/L

8) Peters 3g/L + sucrose 30g/L + agar 7g/L

이상의 배지를 조제 후 pH 5.5~5.8로 보정을 하여 가압멸균기를 이용하여 121℃에서 20분간 멸균하였다. 배양환경은 무균발아 시험과 동일하였고, 배양용기는 600mL의 용기를 이용하여 20반복으로 하였다.

근경의 암배양 실험은 근경배양에서 가장 성적이 좋았던 Kyoto + sucrose 30g/L + agar 7g/L + Activated charcoal 2g/L 배지를 이용하여 빛이 전혀 투과하지 않는 박스에 넣어 배양을 하였다. 배양온도는 명배양과 동일한 16시간 24±2℃, 8시간 18±2℃의 조건이었고 20반복으로 처리하였다.

기내에서 형성된 종자의 발아력 검정을 위한 실험은 종자의 염색을 통한 검정법과 종자의 과중에 의한 검정법 두 방법을 이용하였다.

종자의 염색을 통한 검정은 TTC검정법을 이용하였다(Singh, 1981). Triphenyl tetrazolium chloride(TTC, C₁₉H₁₅ClN₄) 1% 수용액에 넣고, 30℃의 암조건에서 18~24시간 보관하여 관찰하였다. Triphenyl tetrazolium chloride 수용액의 pH는 6.5로 보정 후, 갈색병에 넣어 냉장고에 보관하여 사용하였다.

종자의 과중에 의한 검정에서는 종자의 무균발아에서 성적이 좋았던 Knudson C + sucrose 30g/L + agar 7g/L 배지에 종자를 과중하여 발아력을 검정하였다.

IV. 결과 및 고찰

만개한 대홍란(*Cymbidium nipponicum*)에 다른 수분매개체가 접근하지 못하도록 한 후, 시간별로 주두의 변화를 관찰한 결과 개화 후 일주일 이후부터 주두가 팽창하면서 anther cap이 달려있는 채로 주두가 폐쇄되었고, 이후 자방이 비대하였으며, 약 5개월 이후 배가 있는 종자가 형성되었다(fig. 1). 만개한 대홍란의 자방은 길이가 19mm, 두께가 2mm이었고, 만개 후 35일에는 각각 46mm, 5.2mm로 증가하였다.

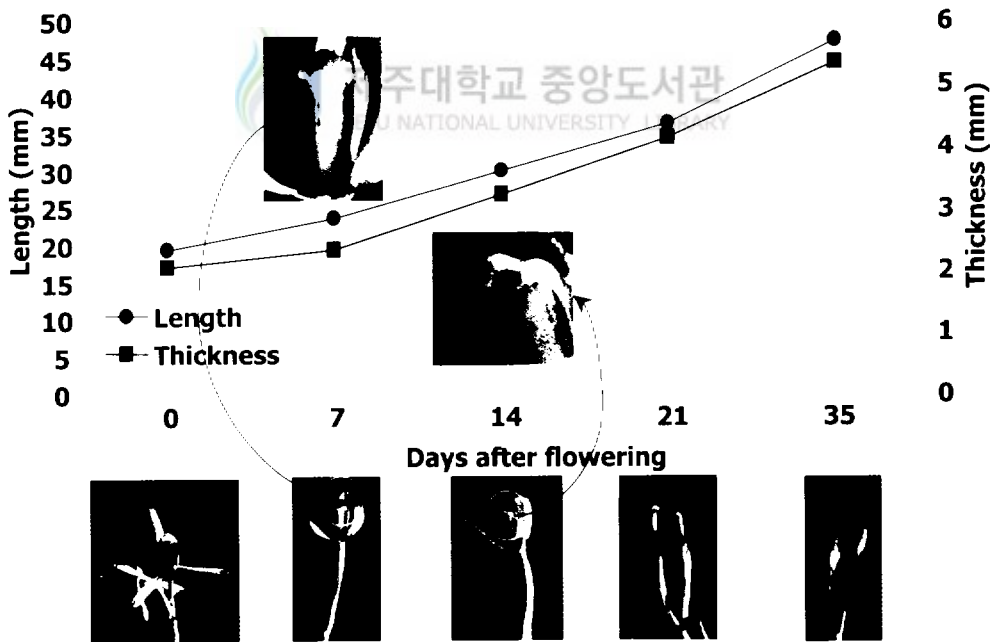


Fig. 1. Changes in ovary size of autogamous *Cymbidium nipponicum*

郭 (1994)은 난과식물은 다른 식물과는 달리 종속간에 교잡이 비교적 쉽게 일어나지만 자가불화합성을 가진다고 하였다. 난은 수분 후 주두가 팽창

하면서 주부가 폐쇄되고, 그 과정에서 에틸렌이 합성되어 발생하게되어 타종의 화분이 2차로 수분되지 못하도록 하는 기작을 갖는 것이 일반적인 사실이다(Avadhani 등, 1994). 그후 자방이 비대하기 시작하여 완전히 자방이 비대한 후 수정이 시작된다. 이것은 수정 후 자방이 비대하는 일반식물과 비교할 때 특이한 현상이다. 수정 후 종자가 형성되면서 배가 발달하게 되고 이로서 난과식물이 갖는 특이성 즉 무배유 종자로서의 완전한 배 발육이 촉진되어 성숙하고 발아력을 갖춘 종자가 완성된다(Arditte, 1992). 일반적으로 난과 식물은 단자엽 중에서 가장 진화한 식물로 알려져 있는데 이러한 근거로는 난과식물에 속하는 800여속, 30,000여종의 식물들 대부분이 타가수정에 의존하여 종을 유지하기보다는 진화를 지향하는 습성을 갖기 때문인 것으로 결론 지을 수 있다(한, 1982). 그러므로 화색이 다양하고, 흑색이 없으며 청색이 드문 등 수 많은 난과식물들은 자생하는 지역의 특성에 따라 수분매개의 곤충을 유인하기 위한 수단에 따라 색깔, 향기 등을 다양하게 갖는 생태적 의미를 갖는다.

그러나 본 연구의 공시 식물은 부생란이며 일정기간이라 할지라도 광합성에 의한 자가영양 충족 기능이 없는 한 종의 유지번식을 위한 자구책을 기능적으로 가져야만 하고 그렇기 때문에 개화단계에서도 자가화합할 수밖에 없는 필연적인 수분수정 수단을 습성화했다고 사료된다.

대홍란을 RAPD법을 이용하여 근연관계를 분석한 실험에서는 Fig. 2에서 보듯이 19개의 10mer primer로 분석한 결과, 전체 218개의 band가 나타났다. 또한 NTSTS program으로 UPGMA clustering 분석 결과(Fig. 3), 제주에서 자생하고 있는 대홍란 3계통의 계통간 UPGMA clustering 수준은 0.061로부터 0.102 그리고 전남 해남에서 채취한 3계통의 수준은 0.101로부터 0.144의 수치를 가지고 있어 동일 지역내 그리고 타지역간의 유전적 차이 분석에 유의성이 없는 것으로 해석 된다.

RAPD법은 유전적 다양성 혹은 유연관계를 구분하고자 할 때 주로 이용하는 방법으로 RAPD법에 의한 polymorphism은 한 품종에서 나타나더라도 다른 품종에서는 안 나타날 수도 있으며 특히 계통이 달라지면 더욱 그렇다 (Eun, 1995).

따라서 *Cymbidium*속에 속하는 난중에서 유일하게 자가수분하는 대홍란은 유전적인 다양성이 감소되어 개체간이나 지역간의 유전적 변이가 거의 없다는 사실을 본 RAPD법에 의하여 밝히는 바이다.



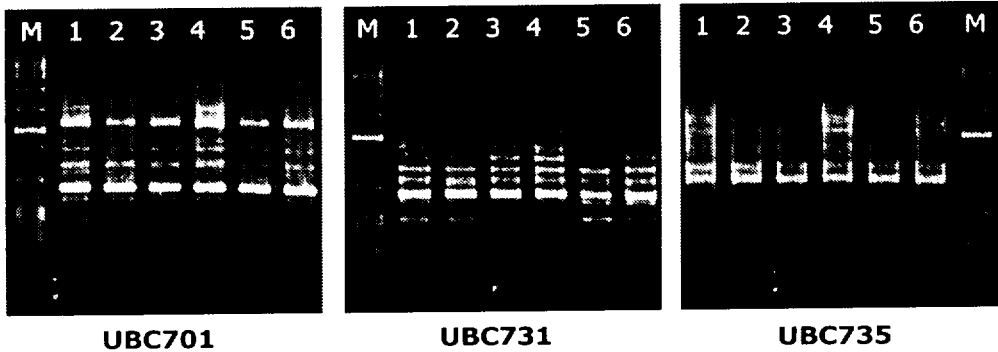


Fig. 2. RAPD profiles obtained from the *Cymbidium nipponicum* plants collected from 6 different location with the primer UBC701, 731, 733.
 M : Molecular size marker (1kb ladder, GIBCO, BRL.)
 1, 2, 3 : Native to Cheju Island
 4, 5, 6 : Native to Haenam, Cheolanamdo

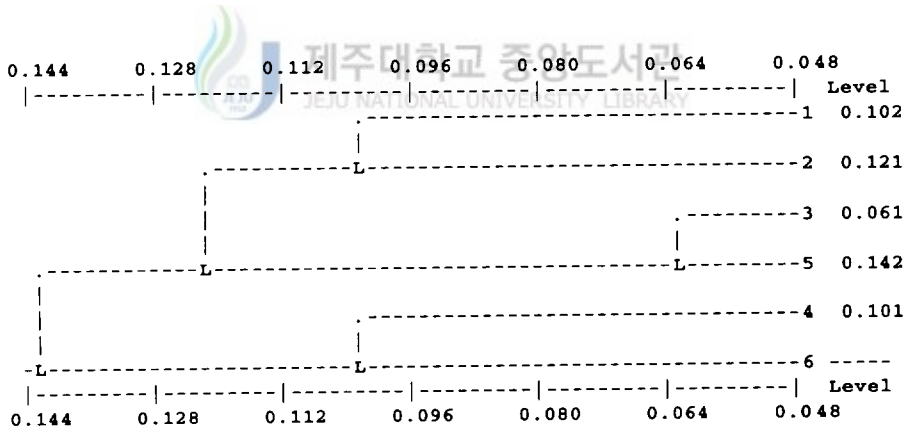


Fig. 3. Dendrogram of the *Cymbidium nipponicum* plants collected from 6 different locations based on UPGMA analysis system.
 1, 2, 3 : Native to Cheju Island
 4, 5, 6 : Native to Haenam, Cheolanamdo
 Values on the base line indicate the average genetic distance between two lines.

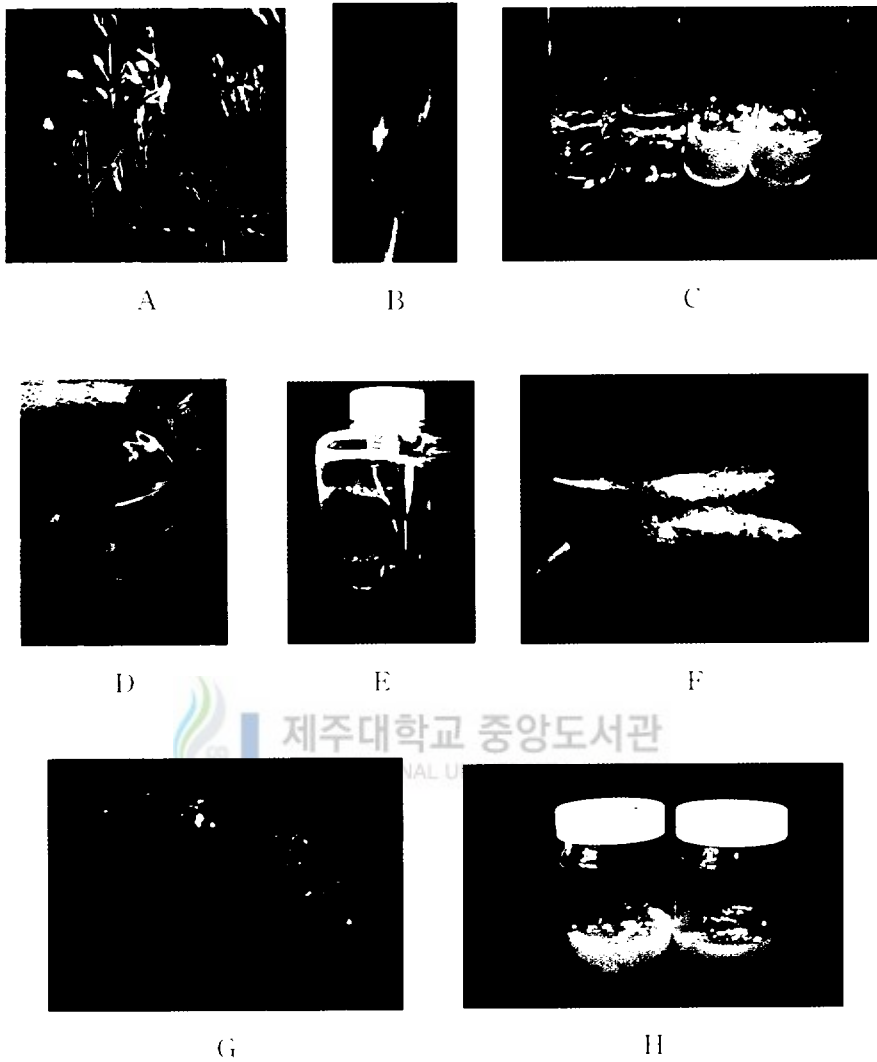


Fig. 4. Diagram of life cycle from seed to flowering stage on the *Cymbidium nipponicum*

- A : Flowering status in native stage, B : Seed pod in nature,
 C : Seed germination in vitro, D : Flower induction in the culture vessel.
 E : Seed pods ripened by self pollination, F : Seeds in the pod,
 G : vitality test of embryos by TTC solution,
 H : Germination of autogamous seeds

이상의 결과를 단적으로 증명할 수 있는 증거를 Fig. 4에서 볼수있는데, 야생상태에서 얻어진 종자를 채취하여(A, B단계), 인공배지에 파종하여 얻은 난경을 배양하여 기내개화를 유도하고(C, D단계), 기내에서 자가수분된 꼬투리를 3~4개월 성숙시켜 성숙된 종자를 얻은(E, F단계) 후 이 종자의 활력을 TTC검정법으로 검정하고 한편으로는 기내에 무균적으로 파종하여 종자 발아시킴으로서 발아된 난경을 얻을 수 있었다(G, H단계). 대홍란은 다른 *Cymbidium*속 난들이 간혹 기내배양하여 개화 후 꼬투리가 형성되었다 하여도 이들 대부분이 위 수정되어 배발생이 없이 꼬투리만 비대하는 경우(Avadhani et. al, 1994)와 비교될 수 있는 특이하며 흥미로운 난의 습성을 가지고 있음이 밝혀졌다 하겠다.

자외에서 자가수정 후 형성된 대홍란 종자 발아실험의 결과는 Fig. 5와 같다. 대홍란의 발아 실험에서는 Knudson C배지가 성적이 가장 좋았고 MS 배지에서 가장 낮았다. Peptone을 첨가한 배지에서는 오히려 성적이 낮았고, 액체배지가 고체배지보다 성적이 좋았다.

이와 같이 무배유 종자로서 종을 유지하고 있는 난과식물은 종자발아양상이 각각 다르게 나타나는 바, 연구대상 식물에 대한 각각의 발아 요건들을 확립하는 것은 후속되는 배양의 목적을 충족시킬 수 있는 필수단계라 할 수 있다. 본 시험의 결과에서 보듯이 대홍란은 Knudson C배지가 다른 배지에서 보다 가장 좋은 발아를 보인 것은 공시한 3종의 종자발아용 배지를 비교할 뿐 때 hyponex는 원예용 복비로 시판되고 있는 제품이므로 일단 N:P:K의 수준이 10:13.2:16.6mg/L로 환산될 수 있고 KC배지와 MS배지를 비교해 볼 때 (E.E, George et. al, 1987), 8.41:5.51:1.83과 7.0:0.82:1.93으로 나타나며 배지에 함유된 총 이온수는 33.39mg/L와 16.79mg/L로 구성된다. 이러한 배지의 조성으로 볼 때 KC배지에서 발아가 가장 양호했던 결과를 N:P:K 수준의 변화부다를 배지에 함유된 총이온수가 발아에 촉진적 결과를 나타낸 것이 아닌가 사료된다.

또한 종자발아가 어려운 동양란계 심비디움속의 발아 촉진법으로 우선 소와 이(1985)의 한국준란 종자발아 시험에서 밝힌 바와 같이 종자를 상피처리하여 투수촉진 및 휴면물질제거에 Ca^{++} 이온이 효과적이었다는 결과를 감안할 때 우선 KC배지가 MS배지보다 함유하고 있는 배지의 총이온수의 우위성에 기인된다고 볼 수 있으며 Ca^{++} 이온의 양도 KC배지가 8.46meq/L인데 반하여 MS배지는 1.21meq/L이므로 KC배지가 7배 정도 Ca^{++} 이온의 수가 많으므로 발아촉진효과를 얻었음을 미루어 알 수 있다. 따라서 앞으로 배지의 이온 총함유량과 Ca^{++} 이온의 수적 변화에 따른 난과식물의 종자발아 촉진 효과에 대한 정밀적 검토가 요망된다하겠다.

한편, 배지의 물리성 즉 고체, 액체 배양에 따른 발아력 차이는 역시 대홍란도 온대원산이므로 준란, 한란과 같이 휴면물질을 함유하고 있음을 시사한다 하겠다. 또한 발아의 최소요건 즉 종피를 투과하여 배와 배유에 접촉되어야만 하는 수분의 공급에 있어 액체배지자체가 갖는 구조적 장점 때문에 고체배지보다 월등한 성적을 얻은 것으로 사료된다.

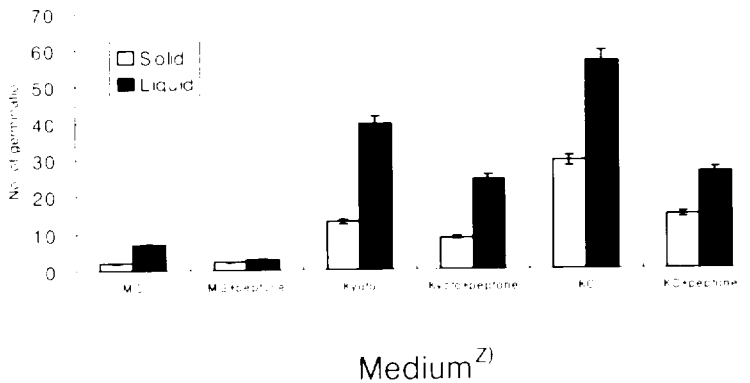


Fig. 5. Comparison of various seed germination medium for the *Cymbidium nipponicum*

^{Z1} See material and methods

대홍란의 근경배양 실험에서는 근경의 생장은 peters 3g/L와 kyoto배지에 activated charcoal을 첨가한 배지에서 양호하였다(Table 2., Fig. 6.). 반면, 종자발아실험에서 성적이 좋았던 Knudson C배지에서는 근경의 생육이 매우 저조했다. 모든 처리에서 다른 온대산 *Cymbidium*속의 근경과 달리 근경이 신장 성장하기 보다는 분지를 많이 발생하는 생장을 하는 경향을 보였다. 본 시험의 결과로 제시된 활성탄 첨가 효과는 일반적으로 알려진 사실로서 동양란계 즉 온대 원산 *Cymbidium* 난들의 경우 근경생육에 효과적인 결과와 유사한 경향을 나타내고 있다. 따라서 부생란으로 대홍란 자체가 영양분 즉 유기물을 합성할 수는 없지만 동양란계 심비디움의 특성인 종자의 휴면 등이 문제시되며 근경생육 또한 활성탄 첨가 효과가 인정되는 바 대홍란 자체는 분류학상 심비디움속에 포함되는 것 또한 증명 될 수 있는 근거를 제시할 수 있겠다.

난과 식물에는 동일한 종·속이라 하더라도 각각의 발아와 묘의 생육을 주관하는 요인들이 다르기 때문에 개개의 대상식물에 따른 연구가 필요하다. 난류 배양시 온대산 *Cymbidium*류는 열대산 *Cymbidium*류와 달리 종자의 발아율이 지극히 저조하고 rhizome화하여 新芽나 뿌리의 분화가 잘 이루어지지 않으며, 성장점 배양을 하더라도 근경으로 분화되고 성장속도도 매우 느리다. 온대산 *Cymbidium*류를 대량번식 하고자 할 때는 근경을 급속히 증식해야 된다(Ueda 와 Torikata, 1969). 근경의 급속한 증식을 위한 배양용 배지의 종류로서는 Whit배지(White, 1963), MS배지(Murashige 와 Skoog, 1962) 및 Hyponex 배지(Kano, 1965)가 일반적으로 사용된다

Table 2. Effect of activated charcoal(A · C) with various culture media on the *Cymbidium nipponicum* rhizomes as grown 4 months

Treatment ¹⁾	Growth degree	
	without A · C	with A · C
Knudson C	-	+
MS	-	+
Peters 3g/L (10:30:20)	++	+++
Kyoto (6.5:6:19)	++	+++

¹⁾ Seed material and methods.



Fig. 6. Photo showing rhizome growth status of the *Cymbidium nipponicum* as affected by culture media

Table 3. Effect of light and dark condition on rhizome growth and flowering in rhizome culture of the *Cymbidium nipponicum*

Treatment	Rhizome weight (g)	No. of flower buds	No. of opened flowers	Flower stem length (cm)	Flower stem thickness (mm)
Dark	11.9	11	8	8.5	3.4
Light	6.1	25	5	2.3	2.0

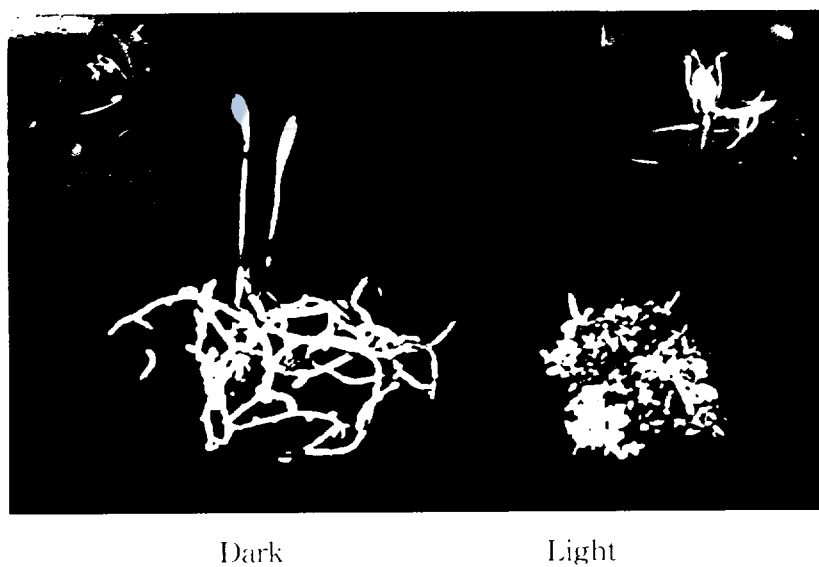


Fig. 7. Photo showing rhizome growth and flowering response to light and dark condition in rhizome culture of the *Cymbidium nipponicum*

근경의 암배양 실험에서는 근경의 형태가 명배양 실험에서와는 달리 다른 온대산 *Cymbidium*속과 같은 형태로 자랐다(Fig. 7). 암배양 실험에서는 명배양보다 화뢰의 발생 수는 적었으나 근경의 무게, 개화수, 화경의 길이, 화경의 두께에서 모두 성적이 월등히 좋았다(Table 3). 명배양에서는 대홍란이 빛에 민감하게 감응하여 화뢰가 발생하는 수가 많았으나 근경이 총생의 형태로 자라 충분한 생장이 못 이루어져 개화수가 작았고 개화된 꽃은 기형의 형태로 나타났다고 사료된다.

이러한 결과 역시 앞선 시험 즉 배지에 활성탄 첨가 시험 결과를 볼 때 무처리보다 월등한 근경생육 반응을 보인 결과를 우선 꼽을 수 있다. 또한 자연 상태에서의 대홍란 개화 습성을 고려할 때 부엽에서 발아된 근경은 어느 정도의 생육을 거쳐 개화기에 꽃대만을 지상으로 노출시켜 개화하므로 근경생육이나, 종자발아에 광선의 필요가 없음을 알수 있었고 본 시험의 결과 또한 이러한 습성을 반영한다. 그러나 명배양의 경우에는 근경의 생육이 저해되고 짧고 가는 근경의 선단부마다 꽃눈이 착생되는 것으로 보아 광선의 자극이 대홍란의 개화를 유도하고 있음을 시사한다고 볼 수 있다.

따라서 본 연구의 결과를 총괄적으로 정리한다면 부생란으로 알려진 대홍란은 온대원산 *Cymbidium*속에 속하는 특이한 난으로서 속내의 식물 중 유일하게 자가수분, 수정하는 종이라는 사실과, 이를 뒷받침하는 근거로는 RAPD 검정에 의해서도 존재하고 있는 종내의 식물 중 변이성을 관별할 수 없을 정도로 순계임이 확인 되었다. 또한 자연에서의 개화습성을 관찰한 결과에서도 지하부로부터 돌출하는 화경이 이미 anther cap의 탈리 없이도 수분이 이루어져 개화 되는 시점부터 이미 주두가 비대함을 확인 할 수 있었으며, 보다 종호가한 근거로는 기내에서 개화한 대홍란이 여타의 매개체가 없이 자가수분되어 꼬투리를 형성하고 성숙하여 종자를 많이 생산한 점과 이를 종자를 TTC로 활성검정한 결과와 종자의 기내기내발아처리시 발아력이 자연에서 채취된 종자와 같은 발아양상을 보였다는 사실이다. 그러므로

대홍란은 *Cybidium*속 난들 중에 유일한 부생란이며 그러한 습성을 보충 보완하기 위해서 자가수분하는 특성을 가지고 있다는 사실을 확인 증명함에 본 연구의 결과를 종합하는 바이다.



V. 적 요

*Cymbidium nipponicum*의 개화 후 수분과정을 관찰하고 RAPD법을 이용하여 지역간, 개체간의 근연관계를 조사하였다. 또한 *Cymbidium* 속에서 유일하게 자가수분하는 대홍란의 기내종자 과정으로 개화까지의 cycle을 확립하였다.

1. 타가수분이 이루어지지 못하도록 차단한 상태에서 개화 후 일주일 이후부터 주두가 팽창하면서 anther cap이 있는 채로 주두가 폐쇄되었고, 이후 자방이 비대하였으며, 약 5개월 이후 배가 충실히 형성되었다.
2. RAPD법에 따른 유전분석에서는 *Cymbidium nipponicum*은 개체간이나 지역간의 유전적 변이가 보이지 않았다.
3. 발아용 배지로는 Knudson C 액체배지가 가장 성적이 좋았으며, 근경 배양 배지로는 Peters 3g/L 배지와 Kyoto배지에 활성탄을 첨가한 배지가 가장 성적이 좋았다.
4. 암처리 배양이 명처리 배양보다 화뢰의 형성 수는 적었으나, 근경의 생육과 개화수, 화경에서 성적이 좋았다.
5. 기내배양에서 자연적으로 자가수정되어 얻어진 종자는 TTC검정법과 무균발아법을 통하여 확인한 결과 발아력이 정상적임이 밝혀졌다.

VI. 인용문헌

- Alvarez, M. R. 1968. Temporal and spatial changes in peroxidase activity during fruit development in *Encyclia tampensis* (Orchidaceae). Amer. J. Bot. 55:619-625.
- Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. Bot. Rev. 33: 1-97.
- Arditti, J. 1992. Fundamentals of orchid biology. pp 485-529. John Wiley & Sons New York, USA.
- Arditti, J. and B. H. Flick. 1976. Post pollination phenomena in orchid flowers. VI. Excised floral segments of *Cymbidium*, Amer. J. Bot. 63:201-211.
- Arditti, J., P. L. Healey and R. Ernst. 1972. The role of mycorrhiza in nutrient uptake of orchid. II. Extra cellular hydrolysis of digosaccharides by asymbiotic seedlings. Amer. Orchid Soc. Bull. 41:503-510
- Avadhani, P. N., H. Nair, J. Arditti and C. S. Hew. 1994. Physiology of orchid flowers. pp.198-238. In: Arditti, J. (ed.). Orchid biology: Reviews and perspectives, VI. John Wiley & Sons, New York.

Bailey, L. H. and E.Z. Bailey. 1976. Hortus third. pp. 353-354, 795-796.
McMillan Publishing Co., New York.

제주도·제주발전연구원. 1999. 제주도에 자생하는 멸종위기, 보호야생식물,
제주자연환경보고서(2). 나우인쇄출판사, 서울.

전재기, 정재동. 1978. 석곡(*Dendrobium monile*)종자의 무균배양에 관한 연구. I.한천, 당 및 peptone 및 tryptone의 농도가 발아와 생육에 미치는 영향. 경북대학교 논문집(자연과학) 25:305-313.

정재동 . 1980. 풍란(*Neofinetia falcata*)종자의 무균배양. I. 무균발아 및 생장에 관한 기초 연구. 한국조직배양학회지 6:49-66.

정재동. 1980. 풍란(*Nofinetia falcata*)종자의 무균배양. II. Peptone과 tryptone을 첨가한 Hyponex배지가 발아와 생육에 미치는 영향. 한국조직배양학회지 7:13-22.

정재동, 서정해. 1982. 자란(*Bletilla striata*)종자의 무균발아에 관한 연구. 1. 기본배지, 명암처리 및 auxin류가 발아와 유묘생육에 미치는 영향. 한국조직배양학회지 9:27-33

鄭載東, 全在琪, 金聖洙, 李宗. 1985. 자생한란(*Cymbidium kanaran*)의 rhizome 성장과 기관분화. 한원지. 26(3): 281-288.

崔至鎔. 1996. 韓國春蘭과 다른 *Cymbidium*과의 交配親和性에 관하여. 高麗

- Dellaprotta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation version II. *Plant Mol. Rep.* 1:19-21
- Dennis, P. S. and P. D. Ascher. 1981. *In vitro* germination of *Paphiopedipum* seed on a completely defined medium. *Sci. Hort.* 14: 165-170
- dos Santos, J. B., J. Nienhuis, P. Skroch, J. Tivang, and M. K. Slocum. 1994. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. *Theoretical Applied Genet.* 87:909-915
- Dowine, D. G. 1943. Notes on the germination of *Corallorhiza innata*. *Trans. and Proc. Bot. Soc. Edinburgh.* 33(4):380-390
- Ernst, R. 1975. Studies in asymbiotic culture of orchids. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 44:12-18.
- Eun, M. T. 1995. Genome mapping technology and its application in plant breeding. pp. 57-85, *The 9th Plant biotechnology symposium : Plant breeding and molecular biology*, Suwon, Korea, July 7-8, 1995.
- Garay, L. A. and H. R. Sweet. 1974. Natural and artificial hybrid generic

name of orchids. pp. 485-561. In: Withner, C. L. (ed.). The orchids. John & Sons, New York.

George, E. E., D. J. M. Puttock and George, H. J. 1987. Plant culture media. pp. 323-326, Exergetics Limited, UK.

Gessner, F. 1948. Stoffwanderungen in bestäubten. Biol. Zentralbl. 67:457-479

Hadley, G. 1970. Non specificity of symbiotic infection on orchid mycorrhiza. New Phytol. 69:1015-1023.

Hadley, G. and B. Williamson. 1972. Features of mycorrhizal infection in some Malayan orchids. New Phytol. 71:111-118.

한장열. 1982. 식물조직배양학. pp. 68-104. 일조각, 서울

Harvais, G. 1973. Growth requirements and development of *Cypripedium reginae* in axenic culture. Can. J. Bot. 51:327-332.

Helentjaris, T., M. Slocum, S. Wright, A. Schaefer and J. Nienhuis. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphism. Theoretical Applied Genet. 72:761-769

Hench, J. E., P. S. Dennis and D. A. Peter 1981. Terrestrial orchid seed

germination *in vitro* on a defined medium. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106:193 196

Ichihashi, S., M. Yamashita. 1977. Studies on the media for orchid seed germination. I. The effects of balances inside each cation and anion group for the germination and seedling development of *Bletilla striata* seeds. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 45:407 413.

Kano, K. 1965. Studies on the media for orchid seed germination. Mem. Fac. Agri. Kagawa Univ. 20:1 70.

Kellman, M. C. 1975. Plant geography. p. 7 42. Methuen and Co. Ltd. Cambridge.



김수남, 이경서. 1997. 한국의 난초. pp. 146 421. 교학사, 서울.

Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. Amer. Orchid Soc. Bull. 15:214 217.

Kohl, H. C. 1962. Notes on the development of *Cymbidium* from seed to plantlet. Amer. Orchid Soc. Bull. 31:177 220

Kokubu, T., K. Yuichi, H. Yoshiro, K. Tokiwa and F. Kiyohide. 1980. Organogenesis in sterile culture of oriental *Cymbidium*, *Cymbidium kanran* Makino. Mem Fac. Agr. Kagoshima Univ. 16 : 53 64

郭炳華 외. 1994. 花卉園藝各論. pp. 413-470. 鄕文社, 서울.

Laibach, F. 1930. Untersuchungen über die Postfloration tropischer Orchideen. *Planta* 9:341-387.

이종석. 1984. 한국야생란의 종류와 지리적 분포에 관한 연구. 제주대학교 논문집 19:31-54.

이종석, 광병화, 이병기, 정재동. 1984. 한국자생한란에 관한 연구. I. 한란의 근경배양에 관하여. *한원지*. 25(2): 126-135.

Melntyre, D. K., G. J. Veitch, and W. Wrigley. 1972. Australian terrestrial orchids from seed. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 51:1093-1097.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plantarum*. 15:473-479.

Oertli, J. O. and H. C. Kohl. 1960. Der Einfluss der Bestäubung auf die Stoffbewegungen in *Cymbidium*-blüten. *Gartenbauwissenschaft*. 25:107-114.

박재호. 1985. 사철란(*Goodyera schechtendaliana*) 종자의 무균발아와 유묘의 생육에 관한 연구. 제주대학교석사학위논문.

Poddubnaya Arnoldi, V. A. and V. A. Selezneva. 1957. Orchidei i ih kouloura. USSR Acad. Sci., Moscow.

Reyburnm A. N. 1978. The effects of pH in the expression of darkness requiring dormancy in seeds of *Cypripedium reginae* Walt. Amer. Orchid. Soc. Bull. 47:798-802.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning laboratory manuals. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, USA.

Singh, F. 1981. Differential staining of orchid seeds for viability testing. Amer. Orchid Soc. Bull. 50:416-418

소인섭, 이종석, 1985. 조직배양 기술을 이용한 춘란의 무균발아와 대량번식에 관한 연구. 한국원예학회지 26(4):375-380.

Soller, M. and J. S. Beckmann. 1983. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. Theoretical Applied Genet. 67:25-33.

Stimart, D. P. and P. D. Ascher. 1981. *In vitro* germination of *Paphiopedilum* seed on a completely defined medium. Sci. Hort. 14:165-170

Ueda, H. and H. Torikata. 1969. Organogenesis in meristem culture of

Cymbidium II. Effects of growth substances on the organogenesis in dark culture. J. Japan Soc. Hort. Sci. 38(2): 188-193.

Weeden, N. F., G. M. Timmerman, M. Hemmat, B. E. Kneen, and M. A. Lodhi. 1992. Inheritance and reliability of RAPD markers, pp. 12-17. In: Applications of RAPD technology to plant breeding. Crop Sci. Soc. Amer., Madison, Wis.

Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18:7213-7218.

Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers, Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.

White, P. R. 1963. The cultivation of animal and plant cells. pp. 37-53. Ronald Press Co. New York.

鳥淵博高, 澤完, 志佐誠. 1965. ラン種子の無菌発芽に関する研究(第1報). *Cymbidium* 種字の発芽および発育について. 日本園藝學會誌 34:63-70

감사의 글

지난 27년간 뒷바라지 해 주신 저희 가족들에게 감사드립니다.

부족한 저를 아낌없는 지도와 조언으로 이끌어 주신 소인섭 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 바쁘신 와중에도 세심하게 논문을 지도해주신 문두길 교수님, 강훈 교수님께 감사드리며, 또한 평소 많은 가르침을 주신 한해룡 교수님, 백자훈 교수님, 장전익 교수님, 박용봉교수님, 송관정 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

대학원 생활동안 힘들 때마다 충고와 격려로 도와주신 여러 선배님들과 후배님들에게 감사드리며, 원예학과 대학원 선·후배님께도 모두 고마움을 전합니다. 특히, 실험에 많은 도움을 주신 최지용 선배를 비롯한 조직배양실 선·후배님께 감사의 마음을 전합니다.

언제나 저에게 힘이 되어준 배기훈 선배를 비롯한 92학번 선배님들과 저희 95학번 동기 여러분께도 감사를 드립니다.

그리고 지난 10년 동안 같이하며 든든한 믿음을 준 은수에게도 고마운 마음을 전합니다.