

濟州寒蘭의 器內 培養 技術開發과  
近緣關係 究明

Development of *In Vitro* Culture Technique  
in *Cymbidium kanran* Native to Cheju Island  
and its Genetical Relationship among Native  
Habitat Plants



110.349

濟州大學校 大學院  
園藝學科

高 泰 信

2000年 12月

# 濟州寒蘭의 器內 培養 技術開發과 近緣關係 究明

指導教授 蘇寅燮

高泰信

이 論文을 農學博士 學位論文으로 提出함

2000年 12月

 제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY  
高泰信의 農學博士 學位論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_

委 員 \_\_\_\_\_

委 員 \_\_\_\_\_

委 員 \_\_\_\_\_

委 員 \_\_\_\_\_

濟州大學校 大學院

2000年 12月

Development of *In Vitro* Culture Technique  
in *Cymbidium kanran* Native to Cheju  
Island and its Genetical Relationship  
among Native Habitat Plants

**ko, Tae-Sin**

(Supervised by professor So, In-Sup)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL  
 FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE  
OF  
DOCTOR OF AGRICULTURE

DEPARTMENT OF HORTICULTURE  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2000. 12.

# 目 次

Summary	1
I. 緒 言	5
II. 研究史	8
III. 材料 및 方法	14
IV. 結果 및 考察	21
1. 寒蘭의 種子 發芽, 健苗 育成	
1-1. 寒蘭의 種子發芽法 改善	
1-2. 抗酸化劑 處理效果	
1-3. 天然果汁添加 效果	
1-4. 根莖의 附着與否에 따른 器內育苗 效果	
2. 寒蘭 個體間의 RAPD分析에 의한 遺傳的 特性	
2-1. 自然短葉種, 人爲的 誘發 短葉種의 生育과 遺傳的 關係	
2-2. 種子發芽 個體間의 遺傳的 特性	
2-3. 濟州寒蘭의 自生地別 遺傳的 近緣關係	
V. 綜合考察	56
VI. 摘 要	63
VII. 引用文獻	66

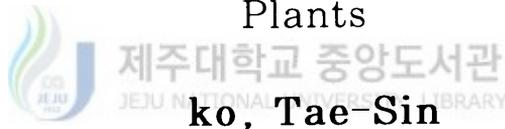
# 濟州寒蘭의 器內 培養 技術開發과

## 近緣關係 究明

高 泰 信

(濟州大學校 大學院)

Development of *In vitro* Culture Technique in  
*Cymbidium kanran* Native to Cheju Island and  
its Genetical Relationship among Native Habitat  
Plants



ko, Tae-Sin

(Graduate School, Cheju National University)

### Summary

1. The results after sowing *Cymbidium kanran* seed by self-pollination and cross-pollination is that mean days to emergence of cross-pollination seeds(184days) were 17 faster days than those of self-pollination seeds(201days). The mean number of first germinated plants was much more in cross-pollination seeds than in self-pollination seeds, and the total number of germinated plants after a year also was more

prevalent in cross-pollination seeds than in self-pollination seeds.

The faster media in germinated days of seeds was 1/2MS. The days from sowing to germinating were from 181 to 190 days and had no differences among medium, but the germination experiment carried with pasteurization methods was faster as many as 68 days in voltex-mixer(145 days) than that of magnetic(213days). There was a trend that the number of germinated seeds at the beginning step was much more in the sowing plot on 1/2MS medium after voltex-mixer pasteurization, but a year after sowing, there were much more germination in 1/2MS sowed through both voltex-mixer and handling treatments than any other treatments.

In the germination experiment by the seed coat softening treatments, germination began from the 60th days after sowing in the Wilson's solution and 0.1N KOH mixture treatment, and the germination was the most predominant between 120 and 180 days.

2. From the result carried to investigate the efficacy of edible agar, chemical agar and gelrite which was inactive solid material composing a component parts of solution, the 2.5g/L gelrite treatment was superior to the others one in its shoot growth and price respects.

Anti-oxidant treatment for new shoot differentiation indicated that polyvinylpyrrolidone(PVP, M.W.40,000) was better than anti-oxidant, aspartic acid, ascorbic acid, and rutin. 0.1 to 1.0mg/L BA, 0.1mg/L NAA and 1g/L PVP plot showed the best growth in the plant growth regulator treatments. The higher BA and NAA concentration is, the higher the degree of brownness in the medium is. And the action of the regulators

was suppressed. Therefore, for rapid propagation and healthy seedling production it is recommended using 2.5g/L gelrite for inactive material, 0.1 to 1.0 mg/L BA plus 0.1 mg/L NAA and 1g/L PVP for prolonging the period of culture through inhibiting the oxident.

3. Potato and banana were used to investigate its effect on *in vitro* culture. Banana juice 100g/L plus potato juice 50g/L mixture showed 5cm higher in height, and increased leaf number, branched number and fresh weight then any others this implied that potato juice and banana juice mixture is adequate for *in vitro* culture of *Cymbidium kanran*. Removal or cling of a rhizome revealed that the shoot culture removed rhizome showed the best growth in fresh weight, leaf length, leaf width and root length and mean bulb diameter was over 12mm and the number of healthy new shoot also was over 5.

4. The growth characteristics comparison of the normal type derived from rhizome *in vitro* cultivated, which is germinated from seeds crossed chungwha with jawha, artificially induced dwarf type by unconazole treatments and natural dwarf type showed that the natural dwarf type was shorter about 1/5 in length, thicker in thickness of new bulbs, thicker and shorter in rhizome, and greater in the number of branched rhizome.

The result of genetic affinity similarity through RAPD with gernomic DNA in *Cymbidium kanran* was 0.929 between N and AD and 0.75 between AD and ND. The results of cluster analyzing through UPGMA indicated that N and AD was linked in a cluster. This RAPD makers may be used as a good molecular marker for dividing natural dwarf type into artificial dwarf type.

5. The results analysed from DNA patterns between individual rhizome of 10 which is derived from seed cross-pollinated and self-pollinated is that the size of DNA fractions was ranged from 0.4 to 2.3kbp and the number of polymorphism were 10~16 in self-pollinated, and 9~17 in cross-pollinated.

The total genetic affinity similarity of them was 0.3810~0.7692 in self-pollinated and 0.5 ~ 0.90 in cross-pollinated.

6. The results of DNA analysis from 23 different sites collected revealed that the size of DNA fractions ranged from 0.4kbp to 2.0kbp and the number of bands amplified in each primer varied 3 to 14 and these total genetic affinity similarity was 0.75 to 0.95. showing deep relationship.



## I. 緒 言

蘭은 單子葉植物에 屬하는 가장 진화된 다년생 초본으로 전 세계적으로 600~800屬에 25,000~30,000여種이 分布되어 있고(Arditti, 1967, 1981 ; 韓, 1973, ; Larson, 1980) 種間 혹은 屬間 交配를 통하여 새로운 品種들이 계속 육성되고 있는데, 현존하는 高等植物 中 가장 거대한 種·屬을 거느린 식물이다(郭, 1994).

이들 中 *Cymbidium*屬은 약 70여種이 있고 대부분 熱帶 및 亞熱帶 地域에 분포하고 있으며 일부 屬이 溫帶地方인 韓國, 日本 및 中國에 自生하고 있다(腹部慶俊 等 1979; 石井林寧 等, 1969). 植物學的인 의미는 없으나 熱帶原産의 것은 歐美 各국에서 많이 재배되고 육종되어 왔기 때문에 西洋蘭(western orchid)이라 하며, 中國·韓國 및 日本의 溫帶地方에서 自生하며 옛날부터 재배되어온 蘭을 東洋蘭(oriental orchid)으로 구분하고 있다(郭, 1986).

濟州道の 한라산 남쪽 경사면에서만 自生하고 있는 濟州寒蘭 (*Cymbidium kanran* Makino)은 春蘭과 더불어 우리나라에서 自生하고 있는 東洋蘭 중의 하나로서 잎의 자세와 향기, 그리고 꽃색깔의 다양함 때문에 園藝的으로 매우 중요한 위치를 차지하고 있다. 흔히 寒蘭은 原産地에 따라서 濟州寒蘭, 日本寒蘭, 臺灣寒蘭, 中國寒蘭 等으로 구분하고 있으나 이는 自生지역을 표시한 것일 뿐이며 식물학상으로는 紫寒蘭 (*Cymbidium kanran* Makino forma *purpurascens* Makino), 靑寒蘭 (*Cymbidium kanran* Makino forma *viridescens* Markino), 大葉寒蘭 (*Cymbidium kanran* Makino var. *latifolium* Makino), 更絲寒蘭 (*Cymbidium kanran* Makino forma *purpureo-viridescens* Makino)으로 구분하고 있다(夫宗休, 1964).

寒蘭의 특징은 一莖多花性으로서 그윽한 향기와 고아한 草勢가 돋보이며 花色도 다양할 뿐만 아니라 늦가을에 꽃망울을 터뜨리는 開花習性이 있다. 濟州 自生種으로 알려져 애호도가 높은 濟州寒蘭은 1967년 7월 11일 天然記念物 191호로 지정, 보호되고 있지만 春蘭과는 달리 自生地가 파괴되어 개화주를 찾아볼 수가 없을 정도로 멸종위기에 처해 있다. 현재에 寒蘭과 春蘭은 組織培養技術을 이용한 인위증식법이 확립되어(崔等, 1987, 1989, 1993, 1996; 蘇等, 1985; 金等, 1979, 1988; 李, 1982, 1986, 1989, 1990, 1991) 종자의 무균발아법으로부터 개체 증식 단계가 체계적으로 정립되어 쉽게 생산될 수 있다는 점은 고무적인 일이다.

그러나 組織培養法은 植物의 種이나 品種에 따라서 적용되는 종자발아 배지의 종류 및 첨가물질의 종류가 다르며 특히 개체분화를 위한 auxin과 cytokinin의 종류와 첨가농도 및 조합, 기내육묘를 위한 첨가물질 및 배양방법 등 각각의 연구결과들이 다르게 제안되어 있기 때문에 어려운 점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 보다 체계적인 연구가 요망되고 있는데 본 연구에서는 寒蘭의 급속증식을 위한 종자발아방법 및 器內育苗에 관한 연구를 통해 寒蘭의 증식을 위한 효율적인 배양방법을 개발하고자 일련의 시험을 수행하였다.

또한 최근에 濟州寒蘭을 他家交配하여 동일한 꼬투리에서 발아된 개체 중 일부 短葉種을 획득한 바, 정상적인 것과 인위적으로 왜화제를 처리하여 왜화시킨 개체간의 생육특성을 상호 비교하고자 하였다.

그리고 지금까지 栽培되고 있는 蘭類의 品種分類는 形態的 특성을 조사하여 분류를 하고 있으나, 최근 分子生物學의 발달과 더불어 시험관 내에서 소량의 특정한 DNA만을 짧은 시간 내에 기하급수적으로 증폭시킬 수 있는 기술인 Polymerase Chain Reaction(PCR)을 이용하는 DNA 지

문법(Jeffery 等, 1985)으로 種間 및 種內 개체간의 遺傳變異를 확인하는 새로운 방법이 활용되고 있다. PCR기기를 이용하여 Tag polymerase와 primer 等으로 DNA의 특정부위를 증폭시키는 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) 기법(William 等, 1990)은 시험수행이 간편하고 DNA多型性を 보기가 용이하여 品種識別, 육종의 집단해석, 系統分類 等に 널리 이용되고 있다(Kim, 1996, 崔 等, 1998, 1999; 金 等, 1998; 玄 等, 1999; 경 等, 2000).

본 시험에서도 RAPD기법을 이용하여 종자발아시에 발생된 短葉種과 정상적인 개체, 인위적으로 유발시킨 短葉種 그리고 自家 및 他家交配에 의하여 형성된 종자에서 발아된 개체간의 遺傳的 近緣關係를 비교하였으며, 濟州道에 自生하는 寒蘭을 自生地域別 개체들간의 近緣關係와 그들의 연관성을 조사하여 분류체계를 확립하는데 기초자료를 제공하고자 하였다.



## II. 研究史

### 1. 寒蘭의 種子 發芽, 健苗 育成

蘭의 종자는 미세하고 胚가 未熟한 상태이며 胚乳가 없어서 자연상태에서는 발아가 극히 어려워 mycorrhiza라는 蘭菌과 共生하여 발아가 가능하게 되어 분화가 이루어진다고 보고되어 있다(Bernard, 1909, 韓, 1973; Larson, 1980). 그러나 Knudson(1922)이 蘭의 종자를 寒天에 糖을 첨가한 人工배지에서 발아시킬 수 있음을 밝혀낸 이후 인공교잡에 의한 蘭의 육종사업이 활발히 진행되고 있다. 이러한 육종사업은 亞熱帶를 原産으로 하는 洋蘭系統에서만 많이 이루어지고 있고 溫帶原産인 東洋蘭들 중 심비디움屬은 종자를 파종하였을 때 종자발아 기간이 오래 걸리거나 발아율이 낮기 때문에 育種期間이 장기간 소요되고 있다.

溫帶産 東洋蘭도 계통 및 品種에 따라 발아력이 다른데 이들 東洋蘭에 관한 종자발아 및 器內培養에 관하여는 많은 보고가 있다. 春蘭의 경우 Kyoto II 배지가 우수하다고 하였으며(崔 等, 1987), 蘇와 李(1985)는 MS배지에 peptone 3g/L을 첨가하는 것이 좋다고 보고한 바 있고, 鄭 等은 紫蘭(*Bletilla striata*)종자의 無菌培養(1982), 소엽풍란의 종자발아(1984)에 Kyoto I 배지에 peptone 4g/L을 첨가하는 것이 발아수나 protocorm 생육이 가장 좋다고 보고하였다. 寒蘭의 종자발아에서 Kokube 等(1980)은 MS(Murashige & Skoog)배지를, 加古(1976)는 Tsuchiyua와 Nitsch micro-element배지를, 長島(1982)는 Hyponex배지를 사용하였으며, 白 等(1987)은 Kyoto II 배지, 崔(1990)는 Hyponex배지, 李(1989)와 金(1994)은 MS배지를 사용하는 것이 寒蘭의 종자발아에 효과적이라는 보고 등 연구자마다 寒蘭의 종자발아 배지에 관하여 다르게 보고되어 있다.

종자발아를 促進하기 위한 연구로는 東洋蘭의 종자를 播種前에 Wilson 溶液에 종자를 소독하면 발아가 증가된다고 보고하였으며(Kano, 1965), 특히 狩野(1976)는 0.1N KOH 용액을 처리하면 투수성의 促進과 아울러 발아억제물질을 제거할 수 있다고 하였다. 坂本(1985)은 0.1 KOH 용액에 5분간 처리하는 것이 좋다고 하였으며, Nagashima(1982)는 日本 春蘭의 종자에 KOH 처리하면 種皮가 상처를 입은 후 수분이 胚까지 도달 하는데 90~120분이 경과된다고 보고하였다.

한편 1930년대 Kögl 等에 의해 IAA의 추출과 더불어 1955년 Skoog 와 Miller가 cytokinin을 인공적으로 합성하고, 1957년 auxin과 cytokinin을 혼용하여 tobacco callus에서 shoot가 유기되는 것을 발견한 이래 이 物質들은 植物組織培養分野에 유용하게 널리 이용되어 왔다.

Ueda와 Torikada(1969)는 *Cymbidium pumilum*에서 NAA 0.1mg/L 이하의 농도는 shoot생장을 促進하였으나 그 이상에서는 억제되었으며, *Cymbidium goeringii*는 kinetin 10mg/L에 NAA를 혼용처리하였을 때 저농도의 NAA는 shoot생장을 促進하였으나 고농도에서는 억제적이라 하였다. 杵谷 鄭(1978, 1979)은 *Cymbidium wakakusa*에서 NAA 0.5mg/L를 첨가하는 것이 효과적이라고 보고하였으며, Niemann(1980)은 *Paphiopedilum* 화경으로부터 식물체 형성은 BA가 효과적이라고 보고하였다. 春蘭, 大明蘭, 一莖九花 및 建蘭은 NAA 2.0mg + BA 1.0mg/L 첨가배지가 분화 및 생장이 促進된다고 보고하였으며(Chei 等, 1987), *Cymbidium faberi*의 rhizome을 배양할 경우 BA(0~10ppm) 처리시 shoot형성에는 크게 영향을 받지 않았으나 BA 0.01ppm처리시 shoot가 가장 길게 자랐다(Hasegawa, 1985)는 보고가 있었다.

또한 *Cymbidium kanran*의 rhizome 배양에서 金 等(1979)은 NAA 5.0mg/L와 BA 0.5mg/L의 단용 또는 NAA 0.1mg/L 혼용처리로 rhizome생육이 양호하다고 하였으며 李 等(1984, 1986)은 BA 5.0mg/L와 10.0mg/L의 단용 또는 NAA 0.1mg/L 혼용 첨가로 shoot가 발생되었고, shoot분화는 BA 10.0mg/L 단용처리가 효과적이라고 보고하였다. 그리고 金 等(1988)에 의하면 寒蘭의 근경분화를 위하여 BA의 첨가효과가 크지만 발근이나 rhizome생육에는 효과가 없다고 보고하였다.

그러나 東洋蘭의 근경배양시 cytokinin처리로 인하여 배지가 심하게 갈변하여 정상적인 생육이 저해되는 현상은 배양 중 식물체가 분비하는 페놀화합물에 의해서 배지내의 유효 무기이온들이 산화되므로써 발생하는 현상이다(Constantin 等, 1977; Drew, 1979; Ichihashi 等, 1977; Ishii, 1980). 寒蘭의 경우에는 cytokinin류의 첨가와 그 농도의 증가에 따라 갈변도가 심하게 나타난다. 鄭 等(1985)과 Ernst(1974)는 활성탄의 첨가효과로써 대사분비물이 흡수된다고 하였고, 蘇(1985)는 활성탄의 첨가에 의해 안개초의 기내발근이 용이하다고 하였으며, 李 等(1985)은 寒蘭의 근경배양에서 활성탄을 2g/L 첨가하면 근경의 생육이 잘되고 분화수가 증가하며 건전한 묘의 생산이 가능하다고 하였으며, 蘇와 朴(1989)은 활성탄을 사용할 경우 生長調節物質이 활성탄에 의해 흡수되어 그 처리효과를 인정할 수 없다고 하였는데 生長調節物質 처리시에는 배지의 산화를 감소시킬 수 있는 抗酸化劑의 선별 그리고 그에 따른 배지의 갈변도와 배지내의 페놀화합물의 함유 정도, 培養苗의 급속생장을 위한 배지내에 첨가되는 培養液의 불활성지지물과 유기물질의 종류와 첨가농도 등의 연구가 필요하다.

배지에 天然產物을 첨가하는 것으로 coconut milk의 처리가 좋다고 하는 것은 널리 알려진 사실인데(Jeyanayaghy 等, 1966; Pages,

1971), 쏘과 鄭(1979)은 *Dendrobium nonile* 유묘 배양시 사과주스 200g/L, 토마토주스 100g/L, 鄭 等은(1984, 1985) *Aerides japonicum*의 종자발아와 유묘생육에 Hyponex 배지에 바나나즙 35g/L과 활성탄 2.0g/L를 첨가하는 것이 좋았으며, *Cymbidium ensifolium*의 rhizome생육에 coconut milk 150g/L 첨가가 효과적이라는 보고가 있었다. 한편 李 等(1985)은 Hyponex II 배지에 Passion fruite 果汁의 첨가로 寒蘭근경의 생육과 분화에 효과적이라 보고한 바 있는데, *Cymbidium*屬의 배양시 바나나 100g/L와 감자 50g/L를 첨가하여 좋은 결과를 얻었다는 보고도 있다(Arditti, 1968; 康, 1989).

또한 東洋系 심비디움 배양에 관한 대부분의 연구는 기내에서의 생산성에 관한 연구결과이며 경화 이후의 생존율 향상이나 강건묘 육성에 관해서는 언급된 바 없다.

蘭科植物도 다른 과의 식물과 마찬가지로 組織培養으로부터 개체를 발생시키는데는 큰 문제점이 없으나 경화단계에서 어려움이 있다. 기존의 東洋蘭系統들의 근경배양은 왕성한 근경생장에 비해 shoot의 크기가 작고 축이 많이 불어나지 않으며, 경화단계에서 생존율이 저조하였다. 배양 단계에서 여러 개체를 형성하여 건전한 묘를 육성시킬 경우에는 경화단계에서도 지속적으로 성장할 뿐만 아니라 생존율이 100%에 달할 수 있고, 이듬해에 개화되는 경우도 있어서 培養묘의 급속생장과 경화 성공률의 향상을 위해 본 연구를 수행하게 되었다.

그리고 東洋蘭에서 短葉種에 대한 관심이 높아가고 있는데 이들은 자연 상태에서 발견되거나 실생배양과정에서 일부 관찰되고 있다. 이러한 현상은 식물체내에 GA합성을 저해하는 물질이 존재하거나 遺傳的 突然變異에 의한 것이라 생각된다. 또한 花壇이나 盆花用 花卉類에서 성장억제제를 사용하여 절간신장을 억제시켜 관상가치를 높이거나 개화기를 조절할 목적으로 이용하는 경우가 있다( Barrett, 1982; Larson, 1985;

Million 等, 1988; Choi 等, 1988). 이들 생장억제제는 경엽살포, 토양관주 等 간단한 처리에 의해서 植物의 줄기신장을 억제할 뿐만 아니라 花芽分花 및 開花促進(Kim, 1995; Larson, 1985), 엽형 및 엽색(Kim, 1998; Sul 等, 1997) 그리고 花形の 변화(Kim 等 1989, 1992) 等 부차적인 결과도 보고되고 있다. Lee와 Lee(1997)는 植物生長調節物質이 구절초의 조직배양시 유묘생육에 미치는 영향을 조사하여 생장억제제 Uniconazole 0.1mg/L와 Zip 0.01mg/L을 혼용첨가하면 건전한 유묘를 생산하는데 효과적이라 보고하였으며, 鄭 等(1999)은 紫蘭의 기내배양에 Uniconazole 0.2mg/L를 하면 생장억제효과가 뚜렷하다고 보고한 바 있어 본 연구에서는 Uniconazole처리에 의해 얻어진 寒蘭과 종자발아에서 획득한 2종에 대하여 생육특성을 비교 分析하였다.



## 2. 寒蘭 個體間의 RAPD分析에 의한 遺傳的 特性

植物의 種間, 種內의 系統간에 變異分析은 表現型과 형태적 특징을 기초로 하여 이루어져 왔으나 최근 들어서 植物의 분자수준에서의 차이를 이용한 분자마커에 의한 變異分析과 分類 및 品種구분이 수행되어지고 있다.

가장 먼저 植物育種에 이용된 분자마커는 동위효소로 체세포변이(Chen 等, 1998)와 園藝種의 分類에 isozyme maker나 형태적인 특성을 이용하여 왔으나 형태적인 특성은 환경의 영향에 불안정하고, isozyme의 이용은 정보화마커의 숫자가 한정적이기 때문에 이러한 것들을 系統分類에 이용하는 것은 한계가 있다(崔 等, 1999)고 하였다.

그러나 分子生物學의 발달로 핵산지문법(DNA fingerprinting)이 개발되어 생물체의 genome상에 나타나는 遺傳的 變異 검출과 생물개체

간의 유전형 분석이 효율적으로 이루어지게 되었다. 핵산지문법은 1985년 영국의 Jeffrey에 의하여 개발되었으며 생물개체의 특이적 DNA구조의 차이점(多型性, polymorphism)이 인간의 지문처럼 다양하다고 하여 명명되었는데 핵산지문은 다양한 생물계에서 적용되어 有用形質探索, 種의 判別, 遺傳病診斷, 病原菌識別 等 다양한 목적에 이용되고 있다.

핵산지문법으로는 제한효소단편형(Restriction Fragment Length Polymorphism : RFLP)법과 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction : PCR)법이 개발되어 分子수준에서 系統分類가 가능하여 植物의 分類에 널리 이용되고 있다(Reed와 Mann, 1985; Williams 等, 1993; Yamagishi, 1995).

植物의 遺傳的 近緣關係를 研究하는 方法으로 PCR을 이용한 핵산지문기술인 Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD) 分析方法은 대상 생명체들의 genome 구조를 비교하는데 이용될 수 있는 DNA 단편들을 증폭하기 위하여 10-mer 정도의 짧은 random primer를 이용하는 PCR 기술로 다른 분자마커 탐색방법들에 비해 광범위한 變異分析을 할 수 있으며, 빠르고 효과적으로 시료간의 변이를 발견하는 방법(Welsh 等, 1990 ; Williams 等, 1990)으로서 최근에 여러작물들에 대해 RAPD分析이 이루어지고 있다. 그 예로 파파야(Stiles 等, 1993), 사과(芮, 1994), 복숭아(Lu 等, 1996) 등의 品種을 구분하거나 Allium (Wilkie 等, 1993), Lentils(Sharma 等, 1995), 호박 品種의 비교(全, 1993), 그리고 제비꽃(Ko 等, 1998) 등의 遺傳的 關係 평가와 지방재래종 산달래의 類緣關係分析(허 等, 1998), 섬초롱꽃의 種內 變異探索(金 等, 1998) 등에 유용하게 사용되어 왔다. 그리고 蘭類에 대한 類緣關係分析은 일부 東洋蘭 심비디움(崔 等, 1998)과 새우란(玄 等, 1999)에서 보고된 바 있다.

### Ⅲ. 材料 및 方法

#### 1. 寒蘭의 種子 發芽, 健苗 育成

##### 1-1. 寒蘭의 種子發芽法 改善

##### 1-1-1. 交配方法 및 培地種類에 따른 種子發芽

濟州寒蘭의 종자발아기간 단축 및 발아 개체수를 많이 확보하기 위하여 청화(青花) 및 자화(紫花)를 이용하여 自家 및 他家交配를 한 후 1년간 성숙된 종자를 시험 재료로 MS(Murashige & Skoog Medium : 이하 MS배지라 칭함)배지와 MS배지의 무기물함량을 반으로 감량한 1/2MS 배지, 그리고 蘭의 종자발아에 많이 이용하는 Kyoto I 배지(Hyponex 3g/L), Kyoto II 배지(Hyponex 3, Pepton 2g/L)에 종자를 置床하였다.

종자소독은 Wilson's 용액( $\text{CaCl}_2$  10g을 증류수 140ml에 포화시킨 후 여과지로 걸러낸 용액 : 이하 Wilson's 용액이라 칭함)에 Tween-80을 첨가하여 각각 15분씩 소독하여 무균상에서 깔대기에 여과지(Watman no.11)를 깔고 소독액 및 종자를 넣어 여과한 후 멸균수로 5회 세척하여 300mL flask에 置床하였다

置床用 배지는 sucrose 30g/L, pH는 5.3으로 조절하였고 寒天이 첨가되지 않은 液體배지를 제조하였으며, 회전진탕배양방법으로 시험을 수행하였고 진탕속도는 분당 80회로 조정하였다.

발아기간 중의 배양환경은 溫度  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 光度 1,500lux로 1일 16시간 조명하였으며 種子置床 후 2개월은 暗狀態를 유지하였다.

발아조사는 發芽始(근경이 0.01mm 정도로 육안관찰이 가능한 시기)까지의 소요일수와 발아개체수를 置床 후 1주일 간격으로 관찰하면서 기록하였으며 置床 1년 후의 총 발아수를 조사하였다.

## 1-1-2. 消毒方法 및 培地種類에 따른 種子發芽

濟州寒蘭 청화 및 자화를 이용하여 他家交配를 한 후 1년간 성숙된 종자를 시험재료로 消毒方法은 종자와 消毒液(Wilson's용액)을 혼합하여 ① Handling ② Magnetic stirrer ③ Voltex mixer ④ Ultrasonic cleaner(B8200R4, Branson회사제품)를 이용하여 15분간 소독한 후 置床하였으며 치상용 배지, 치상방법, 배양방법 및 발아조사 등은 시험 1-1-1과 동일하게 수행하였다.

## 1-1-3. 種皮軟化處理에 의한 種子發芽

種皮軟化처리는 ① Wilson's용액 ② Wilson's용액 + KOH 0.1N ③ Wilson's용액에 소독 후 소독액을 제거하고 KOH 0.1N용액에 침지 처리 ④ Wilson's용액 + Voltex mixer의 4수준으로 30분간 처리하였다. 또한 KOH 처리시에도 Wilson's용액과 동일한 농도가 되도록 정량하여 용액에 포화시킨 후 여과하여 사용하였다. 種子置床은 1/2MS배지를 이용하였으며 배지조제와 배양방법은 시험1-1-1과 동일하게 수행하였다.

## 1-2. 抗酸化制 處理效果

### 1-2-1. 固形物質種類에 따른 器內育苗 效果

寒蘭 근경분화배지 조제시 배지에 첨가되는 불활성지지물인 고형물질의 종류에 따른 효과를 구명하기 위하여 고형물질을 ① 食用寒天 ② 試藥用寒天(Junsei Co.) ③ gelrite(gel-lan gum, Sigma)의 3수준으로 MS배지에 peptone 2g/L, sucrose 30g/L, BA 2mg/L, NAA 2mg/L을 첨가하고, pH를 5.5로 조정하였다. 培養容器는 300ml의 flask에 60ml씩 주입한 배지에 2cm로 절단한 근경을 10개씩 置床하여 10반복으로 배양하였다.

培養環境은 시험 1-1과 동일하게 관리하였으며 생육조사는 置床 6개월 후에 실시하였다.

### 1-2-2. 抗酸化劑의 種類別 處理 效果

寒蘭의 근경분화시 生長調節物質인 BA를 첨가하면 shoot분화율은 높으나 배지가 갈변되어 생육이 정지되는 현상이 나타난다. 이러한 현상을 防止하기 위하여 抗酸化劑로서 ① ascorbic acid 10mg/L, ② aspartic acid 10mg/L, ③ rutin 100mg/L, ④ polyvinylpyrrolidone (PVP, MW.40,000) 1g/L를 첨가하였으며, 배지는 MS기본배지에 sucrose 30g/L, peptone 2g/L, BA 2mg/L + NAA 2mg/L, pH 5.3으로 조정하였다. 培養容器는 300ml의 flask에 60ml씩 주입한 배지에 2cm로 절단된 근경을 10개씩 置床하여 10반복으로 실시하였고 배양환경관리 및 생육조사는 시험 1-2-1과 동일하게 수행하였다.

### 1-2-3. 生長調節物質의 處理時 酸化防止效果

시험 1-2-2에서 가장 좋은 결과를 보인 2.5g/L의 gelrite처리와 1g/L polyvinylpyrrolidone(PVP)가 첨가된 MS배지를 사용하여 生長調節物質인 BA(Benzyl amino purin)와 NAA( $\alpha$ -naphthalene acetic acid)를 0, 0.1, 1.0, 5.0, 10.0mg/L를 각각 혼용 및 단용으로 처리하였다. 寒蘭의 shoot분화를 쉽게 하기 위하여 시험 1-1에서 획득한 근경을 증식하여 2cm 크기로 절단하여 300ml flask에 10개씩 置床하고 처리당 10반복으로 시험을 수행하였고, 生長調節物質이 첨가되지 않은 배지에는 2g/L 활성탄을 첨가하였다.

배지의 조성은 MS 기본배지에 pepton 2g/L, sucrose 30g/L를 첨가하고 pH 5.5로 조정하였다. 배양기간 중의 배양환경관리 및 생육조사는 시험 1-2-1과 동일하게 수행하였다

배지의 갈변도 측정은 Hendel 등의 방법에 따라 배지에 70% ethanol을 추출물 농도 범위에 맞게 같은 용매로 희석하여 420nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

페놀화합물은 Swainhr과 Hillis의 방법에 따라 수행하였는데, 0.4mL의 70%ethanol 추출액에 7mL의 증류수와 0.54mL의 Folin-Denis 시약을 가하여 섞어준 다음 3분 후에 1mL의 Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub> 포화용액을 가하여 잘 혼합한 후 1시간 동안 정치하였다가 725nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### 1-3. 天然果汁 添加效果

寒蘭의 효과적인 器內育苗方法을 구명하기 위하여 天然果汁인 바나나즙과 감자즙을 넣은 배지를 조성 초장 4~5cm크기의 유묘를 기내에 이식하여 시험을 실시하였다. 배지는 hyponex 3g/L, pepton 2g/L, sucrose 30g/L를 넣어 조성하고 바나나즙과 감자즙을 0, 10, 50, 100, 150g/L를 혼용 및 단용 첨가하였으며 agar 8g/L를 넣은 후 pH 5.5로 조절하였다.

培養은 500ml 배양병에 5주씩 5반복으로 置床하여 시험을 실시하였다. 배양환경조건은 시험 1-2와 동일하게 수행하였으며 생육조사는 배양 1년 후에 실시하였다.

### 1-4. 根莖의 附着與否에 따른 器內育苗效果

寒蘭의 근경과 근경에서 발생된 shoot(초장 5cm)를 공시재료로 이용하였다. 처리방법은 ① 근경만을 置床한 것, ② Shoot에 근경을 부착하여 置床한 것, 그리고 ③ shoot만을 置床하는 방법의 3처리로 하였다.

MS기본배지에 peptone 3g/L, sucrose 30g/L, starch 3g/L, NAA 2mg/L, PVP 1g/L, charcoal 2g/L, agar 7.5g/L, pH 5.5로 조성된 배지에 置床하여 관리하였으며 배양환경조건 및 생육조사는 시험 1-3-1과 동일하게 수행하였다.

## 2. 寒蘭 個體間的 RAPD分析에 의한 遺傳的 特性

### 2-1. 自然 短葉種과 人爲的 誘發 短葉種의 生育및 遺傳的 關係

濟州寒蘭의 他家交配(赤花×紫花)종자를 받아시켜 발생된 근경을 배양하여 얻어진 일반형(normal type :이하 N으로 표시)과 자연발생된 短葉種(normal dwarf type : 이하 ND로 표시)의 생육 및 근경, 외형적 특이성을 조사하였다. 아울러 Uniconazole을 처리하여 얻어진 인위적 短葉種(artificially induced dwarf type :이하 AD로 표시)을 위의 2종의 개체군과 서로 비교하여 園藝的 가치를 검토하였다. N과 ND의 근경배양은 MS배지에 寒天 9g/L, 활성탄 2g/L과 NAA 2mg/L 그리고 sucrose 40g/L에 옥수수 전분 3g/L를 첨가한 배지를 사용하였다.

AD의 발생을 위하여 근경배양배지에 uniconazole 10mg/L를 첨가 사용하였으며, 置床 개체군 중 矮化된 근경과 개체를 별도로 분리하여 3회 이상 계대배양을 통해 矮性化가 확실히 인정되는 개체를 선택하여 조사하였다. 배양은 800ml 배양병에 200ml의 배지를 첨가한 後 처리당 10반복으로 실시하였고 置床재료는 2cm의 근경을 용기당 10개씩 置床하여 8개월 배양 후의 생육특성을 조사하였다.

自然的 變異種인 矮性種과 uniconazole을 처리하여 인위적으로 유발시킨 矮性種간의 遺傳的인 연관성이 있는지의 여부를 알아보기 위하여 RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNA)分析을 하였으며 genomic DNA분석은 Junghaus와 Metzlafrk(1990) 방법을 이용하였다.

RAPD分析을 하기 위하여 Operon회사(CA. USA) 제품의 random primers를 사용하여 polymerase chain reaction(PCR)을 수행하였다. PCR 조건은 template DNA 50ng, primer 400nM, dNTP 200uM, MgCl<sub>2</sub> 2.5mM, 그리고 Taq polymerase 0.5unit를 사용하였으며 총 반응용량은 10uL로 하였다. 반응시간은 최초 94℃에서 10분 동안 denaturation한 후 94℃에서 1분 denaturing, 36℃에서 1분 annealing, 72℃에서 2분 extention으로 하여 총 45회를 반복한 후 최종적으로 72℃에서 10분간 반응시켜 종료하였다. PCR 생성물을 1.5% agarose gel에서 100volt로 5시간 동안 전개시켰고, Ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator에서 확인하였다.

統計分析은 NTSYS-pc(version 1.70)프로그램을 이용하였으며, 유사도 지수계산에는 Jaccard's coefficient을 이용하였고, 집괴분석은 非加重평균결합(unweighted pair-group method with arithmetic averages : UP-GMA)으로 계산하였다

## 2-2. 種子發芽 個體間的 遺傳的 特性

본 시험에 사용된 근경은 自家交配(紫花) 및 他家交配(赤花×紫花)에서 형성된 종자를 과종하여 여기에서 생성된 근경을 개체별로 증식하여 이용하였다. RAPD分析을 위하여 SRILS Uniprimer Kits를 사용하여 polymerase chain reaction(PCR)은 Accupower PCR-Premix (Bioneer회사 제품)를 이용하였다

PCR 조건은 template DNA 25ng, primer 1uL, dNTP 200 uM, MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, Taq polymerase 0.5unit를 혼합하여 반응용량은 20uL로 하였다. 반응시간은 처음 94℃에서 4분 동안 denaturation한 후 94℃에서 1분 denaturing, 55℃에서 1분 annealing, 72℃에서 2분 extention으로 총 35회를 반복한 후 마지막으로 72℃에서 7분간

반응시켰다. 처리 후에는 4℃로 식힌 후 전기영동 전까지 -20℃에 보관하였다. PCR 생성물을 1.5% agarose gel에서 70Volt로 5시간 동안 전개시켰으며 ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator에서 확인하였다.

類緣關係 分析을 위한 統計分析 및 유사도 지수계산은 시험 2-1과 동일한 방법으로 수행하였다.

### 2-3. 濟州寒蘭의 自生地域別 遺傳的 類緣關係

濟州 自生寒蘭의 遺傳的 近緣關係 구명도 RAPD방법을 이용하였고 표고별 돈네코 自生寒蘭과 論古岳, 嶺南里, 道順川 上流, 오렌지장원, 新禮里 河川邊, 선돌 等地에서 수집한 시료와 栽培種인 仙鶴, 臺灣寒蘭, 中國寒蘭, 日本寒蘭 그리고 春蘭을 시험재료로 이용하였다

RAPD分析을 하기 위하여 UBC(University of British Columbia)에서 구입한 random primers를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였고 PCR조건은 DNA 10ng, dNTP 2.5mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5mM, Primer 50ps mole, Taq polymerase 1.25unit를 혼합하여 총 반응용량은 20uL로 하였다.

PCR 반응시간은 93℃에서 4분동안 denaturation한 후 94℃에서 1분 denaturing, 37℃에서 1분 annealing, 72℃에서 1분 extention으로 총 35회를 반복한 후 72℃에서 10분간 반응시켰다.

## IV. 結果 및 考察

### 1. 寒蘭의 種子 發芽, 健苗 育成

#### 1-1. 寒蘭의 種子發芽法 改善

##### 1-1-1. 交配方法 및 培地別 種子發芽

濟州寒蘭의 自家 및 他家交配 後 얻어진 종자를 MS배지 등 4가지 배지에 종자를 置床한 결과는 Fig 1, 2, 3과 같았다. 自家 및 他家交配 (청화×자화)종자의 평균 발아소요일수는 184일인데 비하여 自家交配種子是 201일로 他家交配種子が 17일 정도 빠른 경향이였다. 배지별 발아일수도 1/2MS배지가 Kyoto I 배지보다 28일이 빠른 175일이 소요되었으며 他家交配種子を 1/2MS배지에 汚種한 처리가 汚種 후 165일만에 발아되었다.

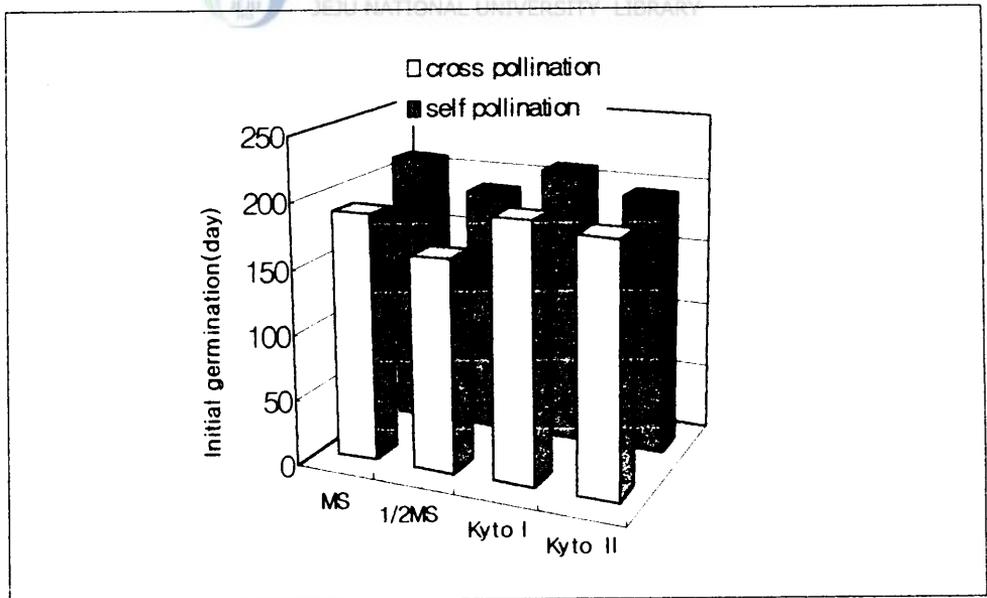


Fig. 1. Days for initial germination of *Cymbidium kanran* seeds by artificial pollination and various medium.

白 等(1990)이 溫帶産 *cymbidium*의 종자발아소요일수가 119~453일로 種이나 交雜有無에 따라서 차이가 심하다는 보고와 金 等(1996)의 濟州寒蘭種子의 自家 및 他家交配를 한 후 MS배지에 과중할 경우 自家交配種자의 평균 발아소요일수는 164일인데 비하여 他家交配種자는 106일로 빠른 경향을 보였다고 한 보고와 유사한 경향으로서 본 시험의 경우에 있어서도 自家交配보다 他家交配種자의 발아일수가 빠른 경향을 보였다.

교배방법별 초기 발아개체수도 自家交配보다 他家交配種자가 많은 경향이었는데 自家交配종자의 평균발아수가 6개에 비하여 他家交配種자는 39개로 6배 이상 발아가 많이 되었으며 배지별 종자발아 경향을 보면 1/2MS배지에서 발아수가 많았다. 또한 自家交配의 경우 종자발아수가 9.3개에 비하여 他家交配를 한 것은 74.5개로서 많은 경향이었는데 崔와 鄭(1992)은 溫帶系 *cymbidium*屬 종자발아시 交配組合에 따라 발아상태가 차이가 있었다는 보고와 같은 결과이었다.

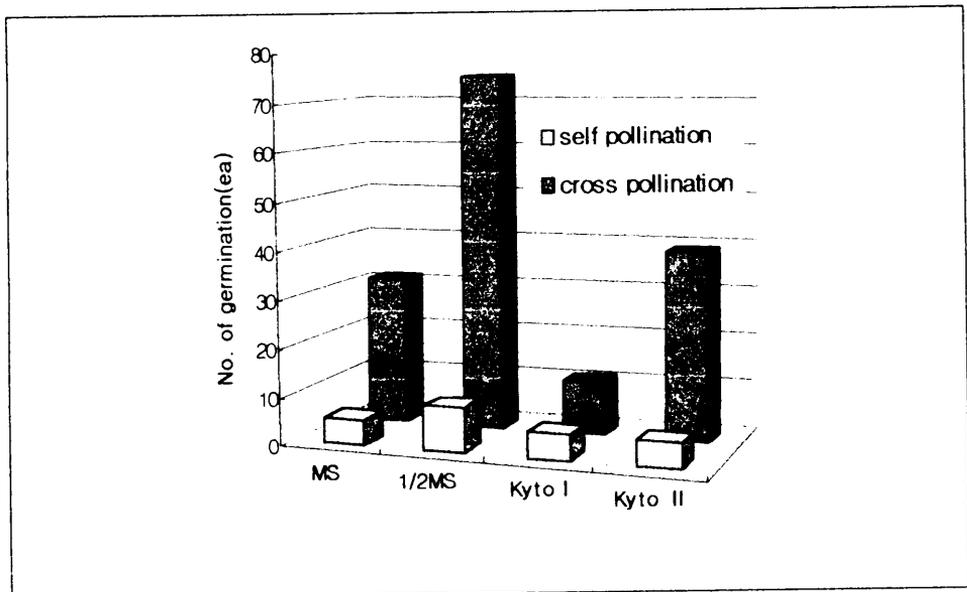


Fig. 2. Number of initial seed germinated by artificial pollination and various medium in *Cymbidium kanran*.

또한 1년 후의 발아개체수도 自家交配種子가 19.3개인데 비하여 他家交配種子는 57개로 많았으며, 배지별 발아수도 1/2MS배지에 파종한 처리가 他처리에 비해 많은 경향이였다(Fig.3).

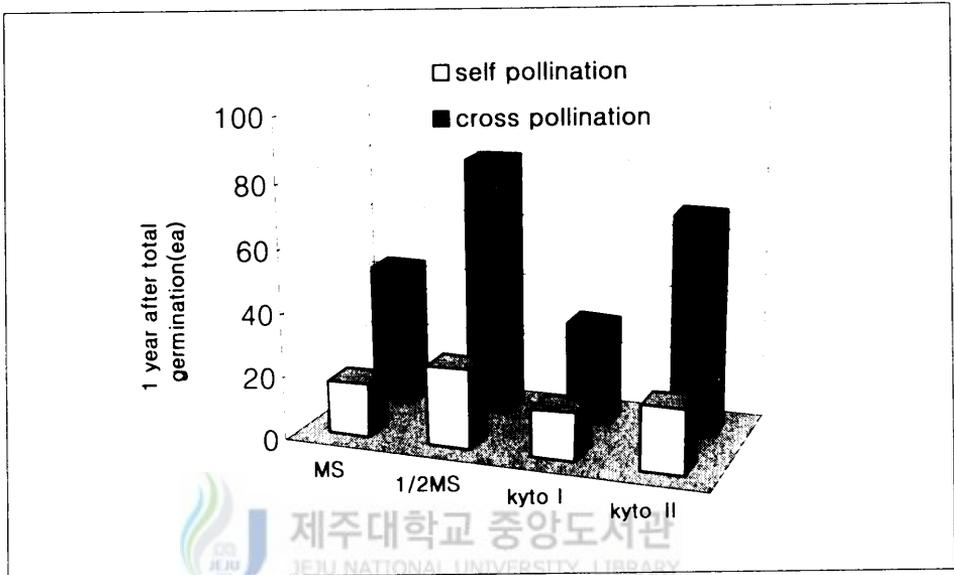


Fig. 3. Number of seed germinated at 1 year after seeding by artificial pollination and various medium in *Cymbidium kanran*.

蘭科植物에 대한 종자발아에 대하여 長島(1982, 1983)는 MS배지보다 Hyponex배지가 *Bletilla striata*, *Cymbidium goeringii*, *Calanthe furata*, *Paphiopedilum insigne* 등의 종자발아에 좋았다고 보고하였으며 Oliva와 Arditti(1984)는 *Cymbidium*의 종자가 Hypo-nex배지에서 100% 발아되었는데 蘭의 종류, 배지조성, 배양조건에 따라 차이가 있다고 보고한 바 있다. 또한 *Bulbophyllum inconspicuum*은 1/2MS배지가 효과적이었으며(高,1987), 양란 심비디움은 Hyponex 배지에서 발아가 빠르고 발아개체수도 많았다는 보고(金 等 1998)가 있었다.

寒蘭의 종자발아에 관한 보고도 연구자에 따라 달랐는데 白 等(1987), 金 等(1996)은 MS배지, 崔(1990), 長島(1982)는 Hyponex배지가 효과적이라는 보고가 있었으며, Kokubu 等(1980)과 李 等(1984)은 종자과종 후 근경형성까지는 MS배지가 빠르다고 보고하였으나 본 시험에서는 1/2MS배지에서 종자발아가 빠른 경향을 보였으며 自家交配와 他家交配에 따른 발아능력의 차이는 종자의 胚形成과 관련된 生理的 특성 및 종자의 불투수성 등이 관여하는 것으로 추측되나 금후 연구가 필요하리라 생각되었다.

### 1-1-2. 消毒方法 및 培地別 種子發芽

他家交配種子를 이용하여 종자 소독시 종자를 Willson's 용액에 침지하여 Handling, Magnetic stirrer, Voltex-mixer, Ultrasonic cleaner를 이용하여 15분간 살균 후 소독한 종자를 4종의 배지에 置床한 시험 결과는 Fig. 4, 5, 6과 같았다.

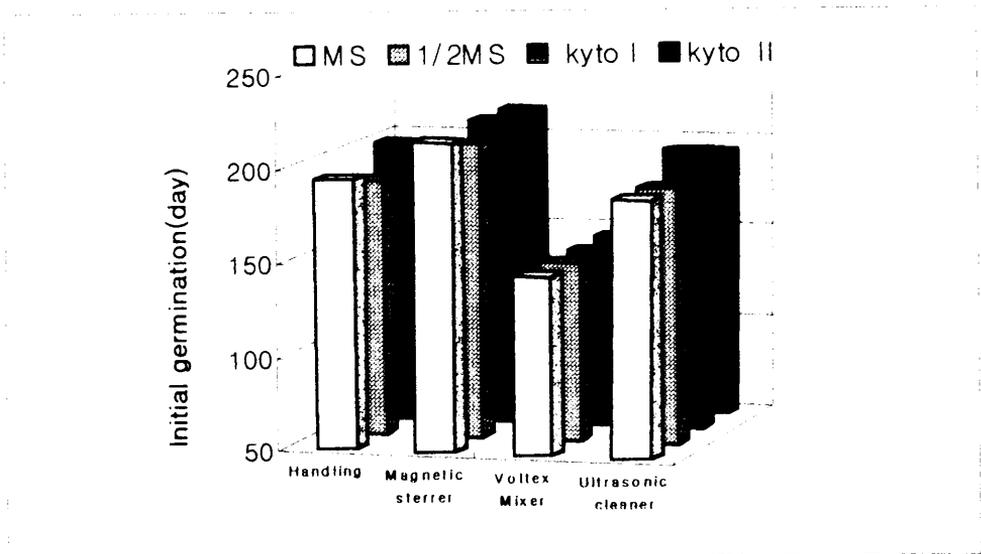


Fig. 4. Days for initial germination by artificial pollination and various medium in *Cymbidium kanran* seeds.

종자소독방법별 발아소요일수는 Voltex-mixer를 이용한 것이 145일 정도 소요되었으나 Magnetic stirrer를 이용한 처리는 213일로 68일 정도 늦게 발아되었으며 Handling, Ultrasonic cleaner를 이용하여 종자소독을 한 것은 비슷한 경향을 보였고 배지별 발아 소요일수는 185~190일로 배지에 따른 발아일수의 차이는 거의 없었다.

소독방법별 초기 발아개체수는 Voltex-mixer이용 파종구가 30개에 비하여 Magnetic stirrer를 이용한 처리는 6.3개로 발아수의 차이가 인정되었으며 그 다음이 Ultrasonic cleaner를 이용한 파종구가 발아가 많은 경향이었고 배지별 발아개체수는 13.0~20.3개로 처리간에 차이가 없었다.

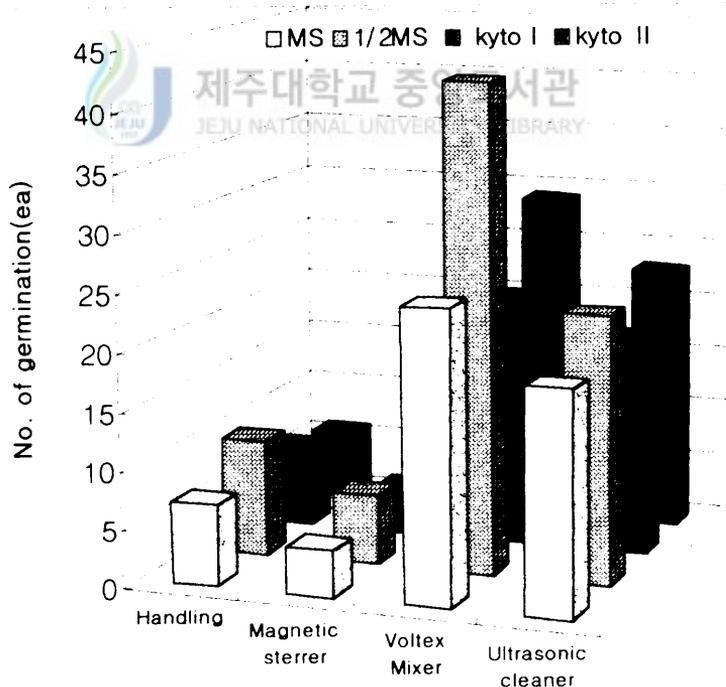


Fig. 5. Days for seed germination on artificial pollination and various medium in *Cymbidium kanran*.

또한 置床 1년 후의 종자발아는 Voltex-mixer 및 handling방법이 58.7~66.8개로 발아수가 많은 경향이었고 배지별로는 1/2MS배지에서 80.5개로 타배지에 비해 2배 이상 발아수가 많았다.

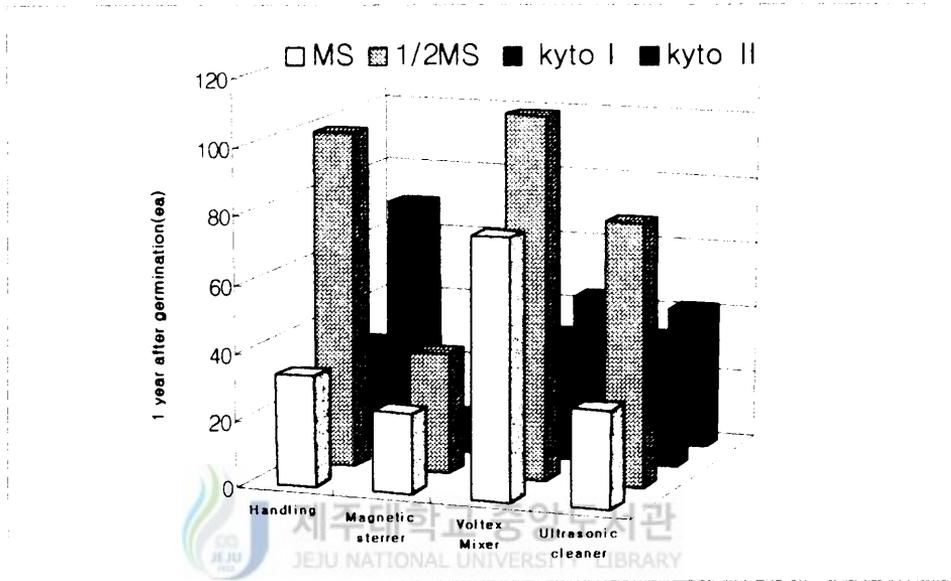


Fig. 6. Days for germination after 1 year on artificial pollination and various medium in *Cymbidium kanran*.

종자를 置床하기 前에 超音波처리를 한 경우 Miyoshi와 Mii(1988)는 *Calanthe discolor*의 종자파종시 超音波처리를 4~16분간 처리했을 때 발아율이 무처리에 비해서 4~6배 증가된다고 하였으나 16분 이상 처리한 것은 감소한다고 보고하였으며, 崔 等(1991, 1992)은 東洋系 *Cymbidium*屬 종자의 발아시 30~120분간 超音波처리를 하면 발아일수가 78일이었지만 차이는 나타나지 않으나 240분간 처리하면 55일이 소요되어 발아소요일수가 단축되었다고 하였으나 본 시험에서는 15분간 처리한 결과에서는 Magnetic stirrer처리를 제외하고 발아에 큰 영향을 미치지

않아 관행적으로 행하여지는 Handling방법을 이용하거나 Voltex-mixer를 이용하여 종자를 소독하여 파종하는 것이 효과적인 것으로 사료되었다.

### 1-1-3. 種皮軟化處理에 의한 種子發芽

濟州寒蘭의 청화(青花)와 자화(紫花)를 他家交配 後 1년간 성숙된 종자를 이용한 種皮軟化처리 시험결과는 Fig.7 및 Table 1과 같았다

Wilson's용액 및 Voltex mixer + wilson's용액 처리는 파종 120일이 경과되어야 발아되는 것을 관찰할 수 있었으나 Wilson's용액에 KOH 0.1N를 혼용하거나 消毒 後 KOH를 처리한 구에서는 파종 60일부터 발아되었고, 파종 180일째의 발아수는 KOH를 처리한 구가 KOH를 처리하지 않은 구와 비교해 보았을 때 발아개체수가 상당히 많은 경향을 보였다.



Fig. 7. Rhizome formation of germinated seed in *Cymbidium kanran*.

坂本(1985)에 의하면 日本의 四國地方産 野生蘭 종자발아에는 KOH 0.1M 농도에서 5분간 침지처리하는 것이 좋았다고 하였고, 康(1989)은 竹柏蘭 종자발아에 0.1N KOH를 90분간 처리하는 것이 효과가 있었다고 하였는데, 韓(1982)은 東洋蘭 종자의 발아억제요인으로는 종피가 두껍기 때문에 종피내로의 수분, 양분, 산소 등의 투과불량과 발아억제물질의 존재 등을 들었다. 본 시험결과를 볼 때 KOH처리에 의하여 단단한 종피를 구성하고 있는 cellulose질이 가수분해되어 늘어남에 따라 투수성이 促進되고 2차적으로 液體배지에 잠기므로 발아억제물질의 용출을 쉽게하여 발아가 促進되는 것으로 추측되었다.

Table 1. Effect of scarifying with KOH for the germination of *Cymbidium kanran* seeds.

Treatment	Germination after seeding(days)					
	30	60	90	120	150	180
Wilson's solution	-	-	-	2	5	7
Wilson's solution + 0.1N KOH	-	2	14	32	87	152
0.1N KOH after wilson's solution	-	1	15	35	90	150
Voltex mixer + wilson's solution	-	-	8	16	18	24

한편 蘭은 他家受精植物로서 동일한 꼬투리 내에서 나온 종자라 할지라도 形質의 分離가 심하여 종자발아능력이 다를 수 있으므로 育種을 目標로 하는 交配種子인 경우 가능한 한 破종된 종자가 많이 발아되어야만 선발폭이 넓어질 것이라 생각되었다.

## 1-2. 抗酸化劑 處理效果

### 1-2-1. 固形物質種類에 따른 器內育苗 效果

본 시험은 배지내에 첨가하는 固形物質인 食用寒天, 試藥用寒天, 그리고 Gelrite에 대한 生長反應을 보기 위하여 근경을 배양한 결과, shoot 발생수는 2.5g/L gelrite처리에서 7.6개로 가장 많았고, 食用寒天에서는 5.4개로 가장 적었다(Table 2).

Table 2. Effect of shoot formation in MS medium contained various gelling agent on rhizome culture *in vitro* of *Cymbidium kanran*.

Gelling agent	Shoot		Root		Rhizome	
	No. (ea)	Length (cm)	No. (ea)	Length (cm)	Weight (g)	Tiller (ea)
Undefined edible agar(9g/L)	5.4	3.0	3.2	6.8	2.45	8.5
Chemical agar (9g/L)	7.2	3.6	3.6	5.4	2.84	7.4
Gelrite(2.5g/L)	7.6	3.6	3.0	5.8	3.20	7.6

\* Basal medium were MS medium contained with 2mg/L BA and 2mg/L NAA.

Shoot길이는 큰 차이가 없었으나 뿌리의 길이는 食用寒天 배지에서 6.8cm까지 신장되었다. 근경생육면에서는 gelrite 처리구에서 3.2g으로 가장 무거웠고, 분지수는 8.5개로 食用寒天 처리구에서 가장 많았다.

Huang(1984)에 의하면 *Cattleya*의 조직배양시 shoot와 발근용 배지로서 0.2%의 gelrite와 0.8%의 試藥用寒天 간의 차이를 발견할 수 없었다고 보고하였는데 본 시험에서도 이와 비슷한 경향이였다.

Gelrite는 *Pseudomonas*가 glucose를 기질로 하여 생산하는 hetero polysaccharide의 일종으로 무미, 무취, 무독성의 백색분말이며 試藥寒天의 1/2~1/4의 양으로 한천과 동일한 강도의 gel을 얻을 수 있는 장점이 있다. 또한 植物組織培養에 사용하면 수용액 속의 양이온과 결합하여 내열성을 가지며 낮은 산도에서도 gel의 강도가 저하되지 않고 식물체의 성장속도를 가속화하는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 측면에서 볼 때 지금까지 한천만을 사용하던 기존의 관념에서 탈피하여 gelrite의 이용은 한천 9g/L와 비교할 때 g당 단가가 試藥用寒天보다 2배 비싸다 하여도 gelrite 2.5g/L 즉, 약 28%의 양으로 한천을 대체할 수 있으므로 生産原價는 한천의 거의 절반 가량 된다. 또한 寒天培地보다 배지의 투명도가 매우 좋아 세균 오염시에도 한천에 비해 육안으로 쉽게 판별할 수 있다.

食用寒天은 試藥用寒天보다 가격면에서 1/3수준인데 食用寒天은 精製가 불충분하여 다소의 염분과 불순물이 혼합되어 있으나 본 연구의 결과와 같이 생육이나 개체발생면에서 고가의 試藥用寒天과 별다른 차이가 없어서 食用寒天의 이용성에 대한 검토도 필요하다고 사료되었다.

### 1-2-2. 抗酸化劑의 處理 效果

근경배양시 몇가지 酸化防止劑 처리에 의한 산화방지 효과는 Table 3과 같았다. 우선 대조구에서 shoot 발생수가 8.7개로 他처리에 비하여 많았지만 뿌리수나 근경생장이 거의 없고 배지의 갈변도가 심했음을 알 수 있었다. 한편 錯鹽效果로 인하여 抗酸化效果가 있다고 알려진 ascorbic acid와 aspartic acid는 무처리에 비하여 shoot 발생수는 적었지만 근경신장과 배지의 갈변도는 약간 향상된 결과로 나타났다. 100 mg/L rutin처리에서는 개체수, 뿌리수, 근경무게 및 분지 발생수가 다른 抗酸化劑보다 적었으나 배지의 갈변도 효과는 약간 있었다.

Table 3. Effects of MS medium contained with various anti-oxidants on rhizome culture of *in vitro* *Cymbidium kanran*.

Treatment	Shoot		Root		Rhizome		Intensity of brown coloring
	No. (ea)	Length (cm)	No. (ea)	Length (cm)	Weight (g)	Tiller (ea)	
Control	8.7	0.6	0.0	0.0	0.65	0.0	+++ <sup>z</sup>
Ascorbic acid(10 mg/L)	3.0	4.5	4.4	5.4	3.32	8.7	+++
Aspartic acid(10 mg/L)	3.4	4.8	4.8	5.0	3.52	8.0	+++
Rutin(100mg/L)	3.6	4.3	5.2	5.8	2.95	5.2	++
Polyvinylpyrrolidone(1g/L)	5.2	5.8	4.5	5.2	2.49	3.6	+

\* MS medium contained with BA 2 mg/L and NAA 2 mg/L.  
 z) Brown coloring : + ; dilutions, ++ ; mild, +++ ; middle, ++++ ; strong.

그러나 PVP 1g/L 처리에서는 shoot발생과 shoot길이, 그리고 발근 상태는 다른 처리보다 상당히 높았고, 근경의 생장과 분지수는 적었으나 갈변방지 효과는 가장 좋은 경향이였다.

배양 중 배지의褐變은 배양식물이 분비하는 페놀화합물(phenolic compound)에 의해서 배지내의 유효 무기이온들이 산화되어 발생하는 현상인데(Ishii, 1980; So 等, 1985) 이는 배양하는 식물의 영양상태(Hu 等, 1983) 혹은 생육시기(Ichihashi 等, 1977)에 따라서도 각각 다르게 나타나며, 대사분비물으로써 페놀화합물의 발생량 증감에 따라 좌우된다고 하였는데 이러한 현상을 방지하기 위하여 활성탄의 처리가 우선적으로 제안되고 있다(Drew, 1979; Ernst, 1974; Fridborg 等, 1975).

그러나 활성탄의 첨가는 배지에 첨가되는 生長調節物質을 흡수하므로써 生長調節物質의 처리효과를 감소시킨다는 사실이 So와 Park(1989)에 의해서 보고된 바, 활성탄보다 우수한 효과를 나타내는 항산화제를 찾는 것이 중요하다고 사료되었다.

寒蘭의 경우에는 生長調節物質 중 특히 cytokinin의 첨가와 그 농도의 증가에 따라 갈변도가 심하게 나타난다. 따라서 그러한 반응이 심하게 발생할 수 있는 재료에 대하여 抗酸化劑의 사용이 필수적이라 할 수 있는데 본 시험에서는 PVP의 항산화 효과를 뚜렷이 인정할 수 있었으며 東洋系 *Cymbidium* 경정배양과 근경으로부터 유묘의 증식시 배지에 PVP첨가로 갈변현상이 억제된다는 결과와도 일치하는 경향이였다(Choi 등, 1996).

### 1-2-3. 生長調節物質의 處理時 酸化防止 效果

寒蘭 근경의 급속증식과 shoot분화를 促進시키기 위하여 植物生長調節物質의 처리와 산화방지 효과를 시험한 결과 PVP 1g/L 처리에서 植物生長調節物質의 효과가 뚜렷이 나타난 반면 PVP무처리구에서는 생장반응이 나타나지 않았다(Fig. 8, 9, 10, 11).

근경의 분지수에서 PVP 처리구가 무처리구에 비해 전체적으로 BA 0.1mg/L 처리구에서 생육이 좋은 것으로 나타났고, BA농도가 증가할수록 분지수가 감소하였으며, BA 0.1mg/L와 NAA 0.1mg/L 혼합 처리구에서 가장 좋았다(Fig. 8).

BA 첨가농도가 증가할수록 shoot수도 증가하는 傾向이었으나 PVP 무처리구에서는 반응이 일정하지 않았다. shoot길이는 PVP 처리구가 무처리구에 비해 좋았는데 특히 BA 1.0mg/L + NAA 1.0mg/L 처리구에서 가장 좋았고 BA 5.0mg/L + NAA 0.1mg/L 처리 및 BA 0.1mg/L + NAA 0.1mg/L 처리구에서도 좋은 결과가 나타났다.(Fig. 9,10)

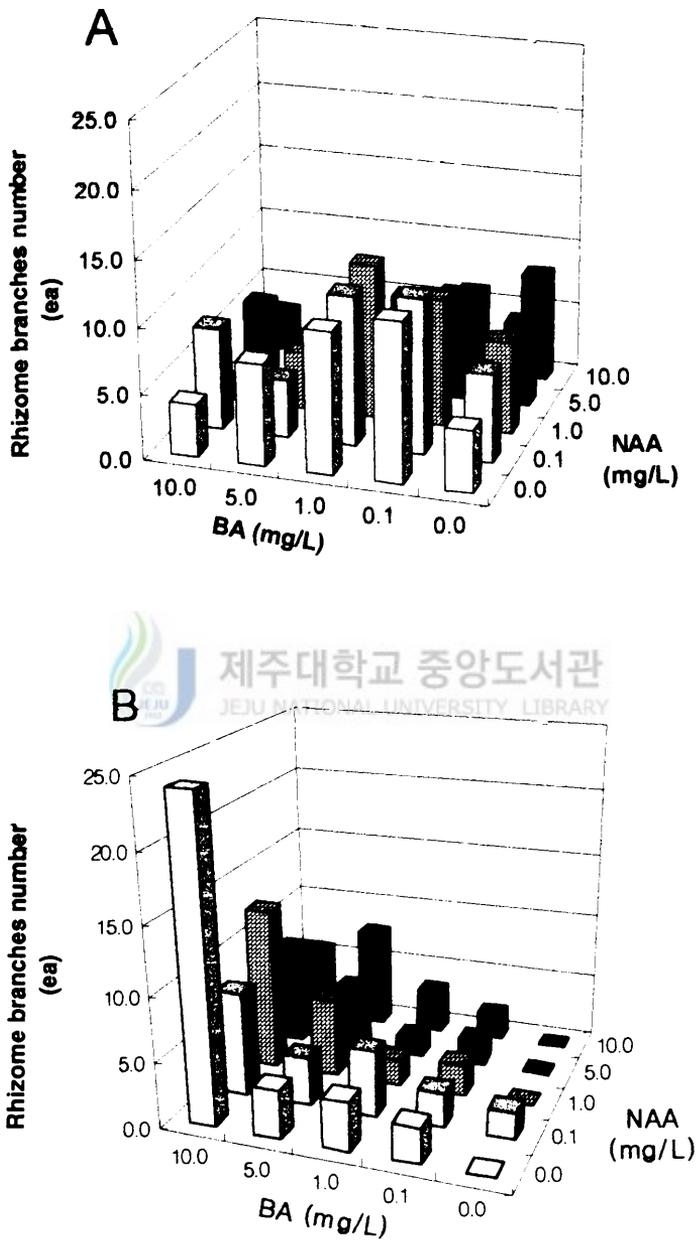


Fig. 8. Effect of various concentration of NAA and BA on rhizome growth of *Cymbidium kanran* in MS medium supplemented with polyvinylpyrrolidone(B) and without(A).

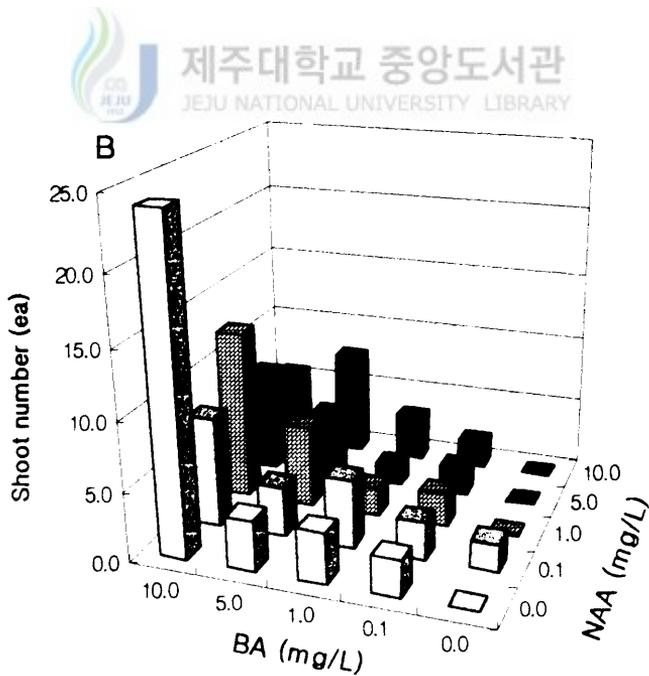
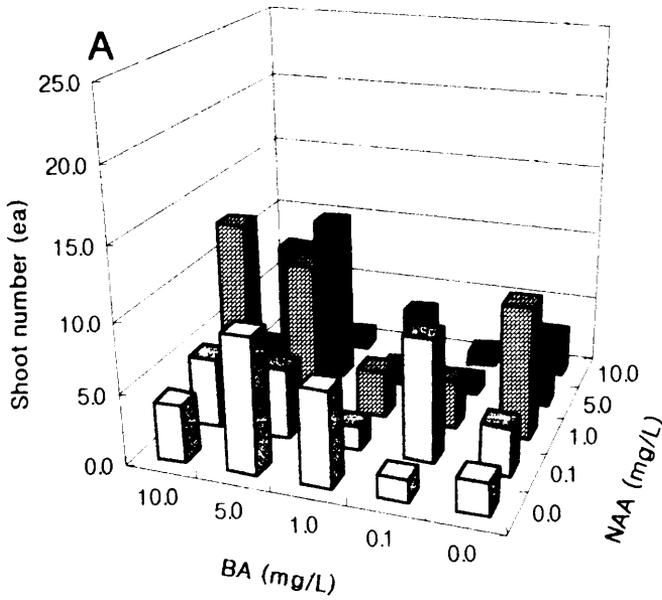


Fig. 9. Effect of various concentration of NAA and BA on shoot number of *Cymbidium kanran* in MS medium supplemented with(B) and without(A) polyvinylpyrrolidone.

寒蘭의 근경배양시 배지에 BA 5~10ppm을 첨가하면 shoot분화수는 많았으나 shoot신장이 느리고 발근이 어렵다고 하였고(金 等,1988), 李 等(1998)은 줄무늬변이종 비아란의 shoot발생은 10.0mg/L에서 가장 많았다고 하였는데 본 시험에서도 같은 결과를 보였다

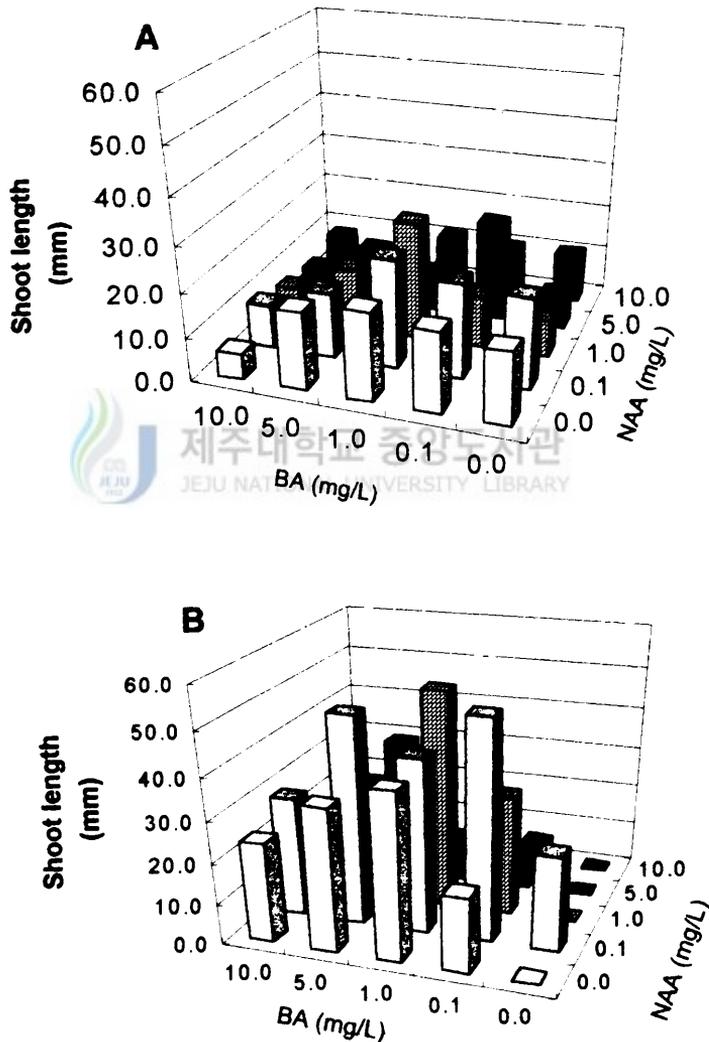


Fig. 10. Effect of various concentration of NAA and BA on shoot length of *Cymbidium kanran* in MS medium supplemented with (B) and without (A) polyvinylpyrrolidone.

뿌리의 길이도 PVP처리구가 무처리구보다 좋은 효과를 나타내었는데 NAA농도가 증가할수록 뿌리의 길이가 긴 경향이였다.(Fig. 11)

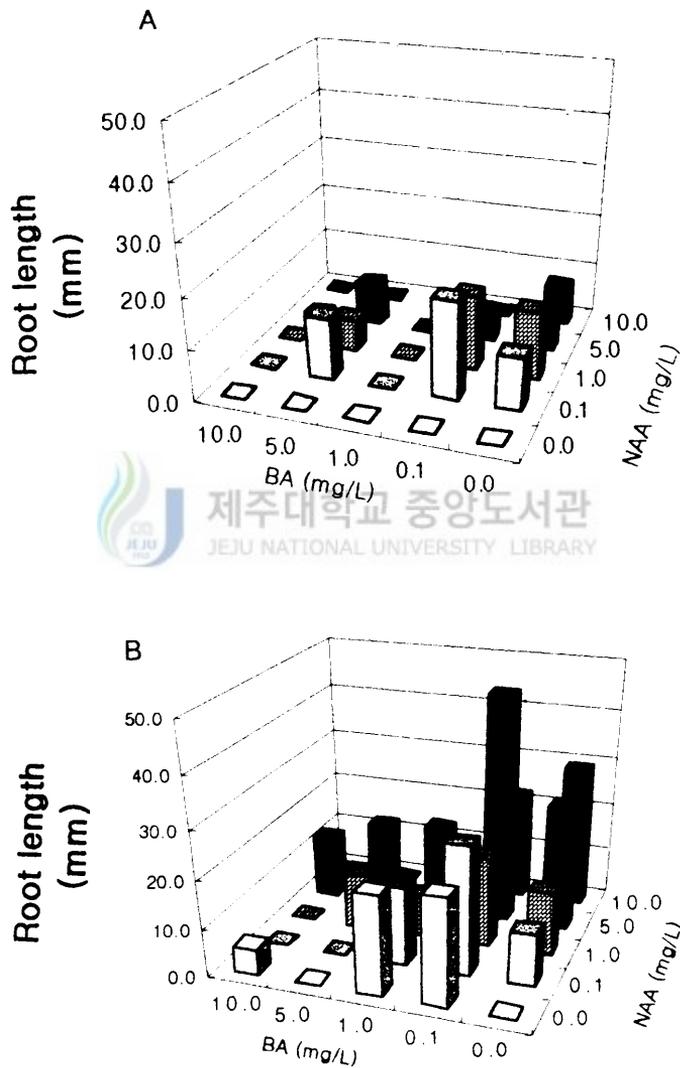


Fig. 11. Effect of various concentration of NAA and BA on root length of *Cymbidium kanran* in MS medium supplemented with poly-vinylpyrrolidone(B) and without(A).

이와 같은 경향으로 볼 때 PVP처리구가 무처리구에 비해 전체적인 생육이 좋은 傾向을 보였고, 분지수, shoot발생수, shoot길이, 근장 등 모든 면을 고려할 때 MS기본배지에 BA 0.1mg/L와 NAA 0.1mg/L, 그리고 PVP 1g/L 첨가구가 가장 좋은 결과를 나타냈다. BA 1.0mg/L + NAA 1.0mg/L 처리시에는 shoot길이가 가장 길었으나 분지수나 shoot발생수, 근장 등에서 BA 0.1mg/L + NAA 0.1mg/L 처리구에 비해 좋지 않은 경향이였다.

배지의 산화방지에서 PVP처리구가 무처리구에 비해 매우 좋은 결과를 나타냈는데, 대조구로 사용된 활성탄 처리구보다도 더 좋은 결과를 나타냈다(Fig. 12). 한편 무처리구는 植物生長調節物質 첨가농도가 높아질 수록 배지의 갈변도가 심하게 나타난 반면 PVP처리구에서는 갈변현상이 억제되었다.

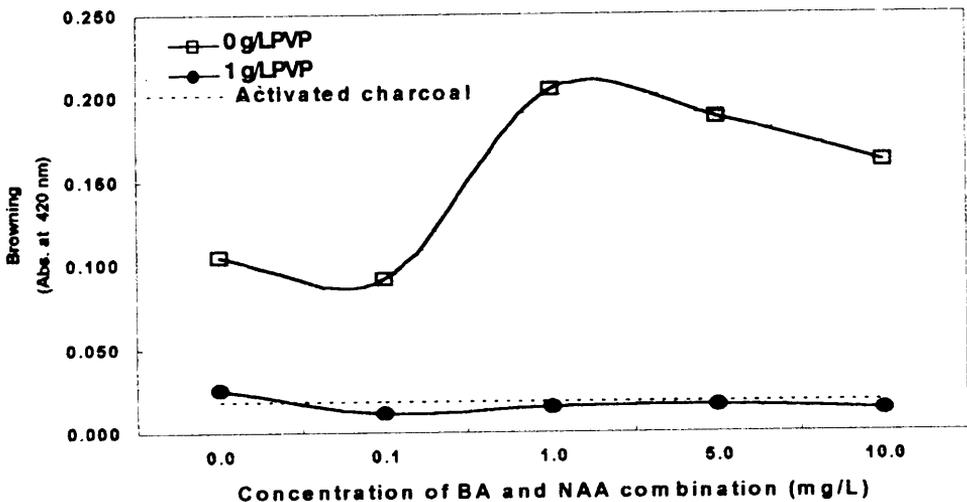


Fig. 12. Effect of polyviinylpyrrolidone(PVP) on medium browning.

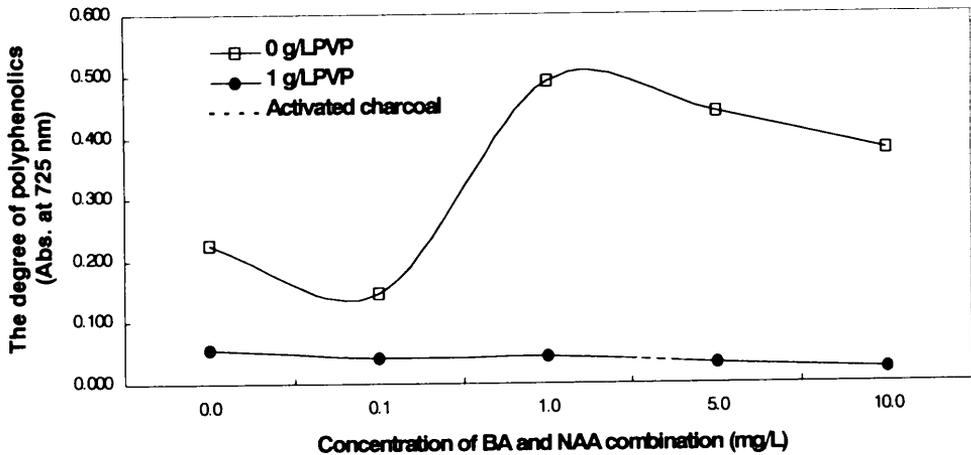


Fig. 13. Effect of polyviinylpyrrolidone(PVP) on medium polyphenolics.

寒蘭의 器內배양에서 흔히 나타나는 배지의 갈변화는 725nm에서 흡광도가 최대로 나타나는 페놀화합물인데 (Ishii, 1980) PVP처리를 통하여 배지내의 유효 무기물과의 산화를 방지하는 효과로 인하여 배지의 안정성을 높이므로 특히 寒蘭과 같은 배지의 갈변화가 심한 식물의 배양에 꼭 필요하다고 사료되었다.

따라서 寒蘭의 경우 급속한 개체 증식을 위해서는 BA 0.1~1.0mg/L과 NAA 0.1mg/L, PVP 1g/L를 첨가하면 배지의 산화를 억제하고 植物生長調節物質의 역할이 정상적으로 이루어질 수 있을 것으로 사료되었다.

### 1-3. 天然果汁 添加 效果

濟州寒蘭의 효과적인 器內育苗方法을 개발하기 위하여 배지에 天然果汁인 감자즙과 바나나즙을 첨가한 결과 초장은 무처리 12.3cm에 비하여 바나나즙 100g/L + 감자즙 50g/L 혼용처리구가 17.3cm로서 길었으며, 분지수(촉수)는 바나나즙 150g/L 첨가와 바나나즙 100g/L + 감자즙 50g/L 첨가가 1.7개로 첨가하지 않은 것의 1.4개에 비하여 0.3개가 많았다(Fig 14).

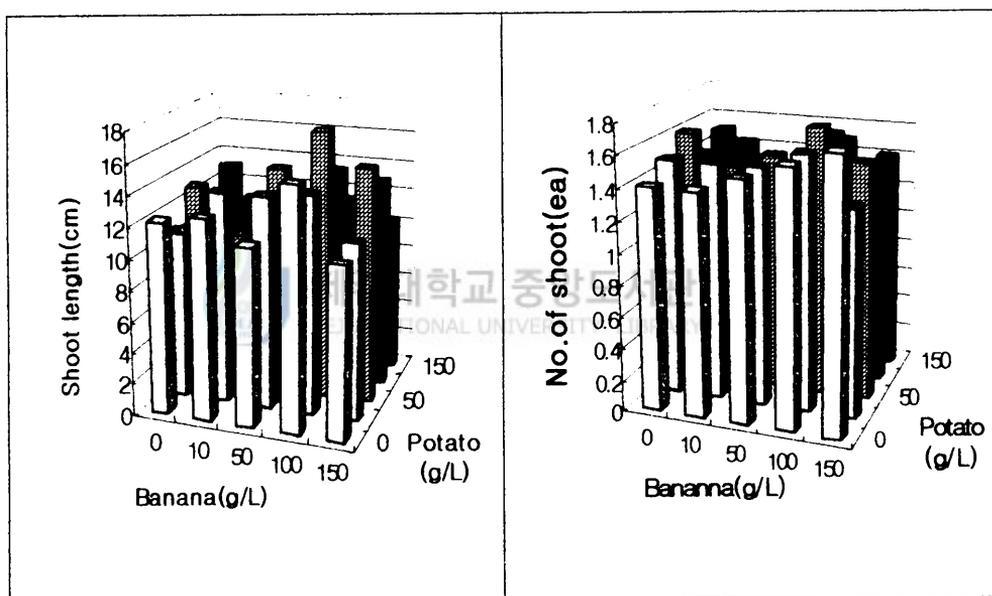


Fig. 14. Effect of various concentration of banana and potato on shoot length and number of *Cymbidium kanran* in Hyponex medium.

엽수는 무처리시 6.7매에 비하여 바나나즙 100g/L + 감자즙 50g/L 혼용첨가시 9.3매로 가장 많았으며, 근장은 무처리 5.4cm에 비하여 바나나즙 50g/L + 감자즙 50g/L 및 바나나즙 100g/L + 감자즙 50g/L 처리구가 11.4cm로 가장 길었으며, 근수는 바나나즙 100g/L 단용처리한 것이 8.5개로 가장 많았다(Fig.15).

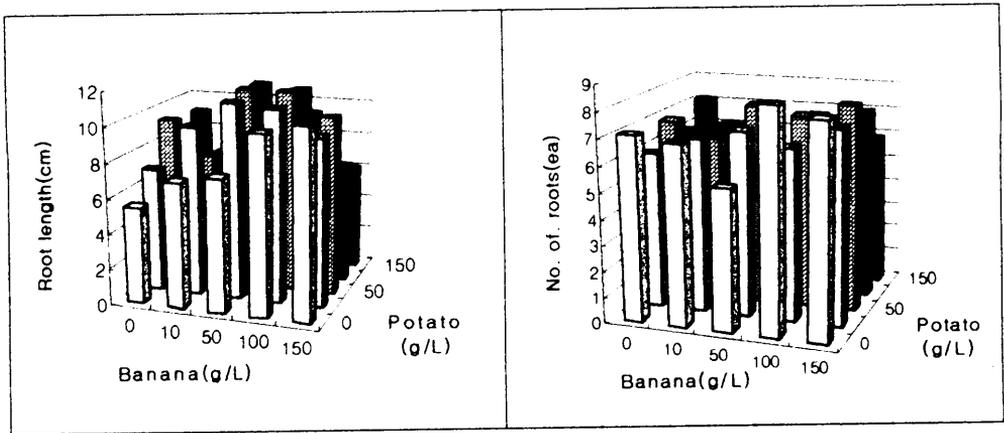


Fig. 15. Effect of various concentration of banana and potato juice on root length and number of *Cymbidium kanran* in Hyponex medium.

생체중은 바나나즙 100g/L + 감자즙 50g/L 혼용처리시 4.61g으로 가장 무거웠다.

寒蘭의 근경배양을 위하여 李(1989)는 MS배지에 캄프살 1~3g/L 또는 복합비료 1~3g/L를 첨가한 배지와 Hyponex 3g/L에 캄프살 1~3g/L 또는 복합비료 1g/L를 첨가한 배지에서 식물체의 크기가 뚜렷하게 促進되었다고 하였고, 全 等(1978)은 *Dendrobium nonile* 종자의 무균배양시 20%의 apple juice, 10%의 tomato juice가 shoot 및 뿌리생육에 효과적이라고 하였으며, 白 等(1987)은 溫帶產 cymbidium의 rhizome으로부터 식물체 형성에는 tomato juice 및 potato juice를 이용할 수 있다고 하였다. 또한 楠元(1979)는 *Cattleya*의 유묘생장에 banana juice는 낮은 농도의 coconut milk와 비슷한 경향을 보였다고 보고한 바 있다.

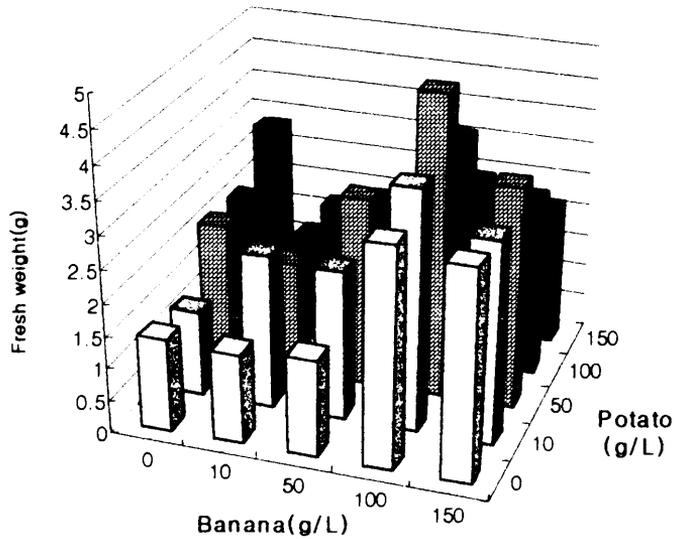


Fig. 16. Effect of various concentration of banana and potato juice on fresh weight of *Cymbidium kanran* in Hyponex medium

그러나 崔 等(1993)은 溫帶産 cymbidium의 경정배양으로부터 근경형성을 위한 天然果汁 첨가 효과시 15%의 coconut water를 첨가한 배지에서는 근경형성이 양호한데 비하여 사과즙, 바나나즙, 감자즙은 오히려 抑制的이었다고 보고하였으나 康(1989)은 竹柏蘭의 근경배양에서 바나나즙과 감자즙 첨가가 유묘생육에 양호하였다고 한 것을 보면 天然果汁 첨가는 培養體의 종류에 따라 첨가효과가 다르게 나타남을 알 수 있었다. Arditti 等(1982)의 보고에 의하면 바나나는 질소원을 많이 함유하고 있어  $\text{NO}_3^-$  함량이 적은 배지에서 첨가효과가 크다고 하였는데 본 시험의 결과에서도 감자즙과 바나나즙 첨가로 인하여 shoot 및 뿌리 생육이 뚜렷하게 양호함을 알 수 있었으며 天然果汁의 첨가효과는 배지 및 성장단계에 따라 반응이 달라질 수 있는 것으로 생각되었다.

#### 1-4. 根莖의 附着與否에 따른 器內育苗 效果

器內培養幼苗에 근경의 附着 有無에 따른 기내육묘결과 근경만을 배양하면 초장 11.3cm, 엽폭 0.6cm, 근장 6.2cm이였고 근경을 완전하게 제거하고 shoot만을 배양한 경우에는 생체중, 엽장, 엽폭, 근장에서 모두 생육이 좋은 결과를 보였으며, shoot에 근경을 붙여 배양한 경우는 새로운 shoot의 발생과 더불어 근경의 생육도 왕성하였으며 5개 이상의 벌브를 가진 개체와 5개 이하의 벌브가 있는 개체가 절반씩 나타났다.

Table 4. Growth characteristics of shoot and rhizome culture *in vitro* of *Cymbidium kanran*

Treatment	Fresh weight (g)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Root length (cm)	No. of plantlet (more than 5 bulbs) (ea)	No. of plantlet (less than 5 bulbs)(ea)	No. of rhizome (ea)
Shoot	9.9	19.1	1.3	9.7	2.9	0.0	0.5
Shoot + rhizome	6.4	17.8	0.9	6.9	1.0	1.0	1.7
Rhizome	5.3	11.3	0.6	6.2	0	0.7	4.7

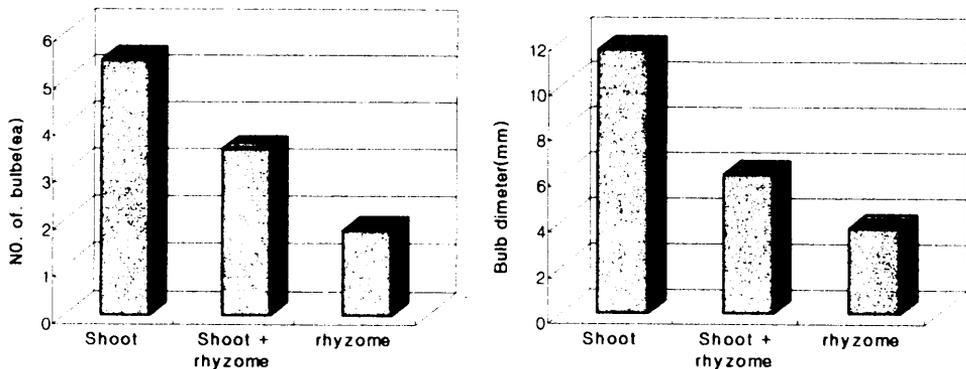


Fig. 17. Growth characteristics of shoot and rhizome culture *in vitro* of *Cymbidium kanran*.

특히 株당 별브수가 shoot만을 배양할 경우 5.4개인데 비하여 shoot에 근경이 부착되어 배양된 구는 3.5개. 근경만을 배양할 경우는 1개로 기내육묘는 근경을 제거한 shoot를 배양하는 것이 별브가 많이 형성됨을 알 수 있었으며 근경만을 배양한 경우는 새로운 shoot가 발생되더라도 별브수가 증가하지 않았고 shoot생육이 미약한 반면 근경의 생육은 왕성한 경향이였다(Fig.17).

별브경도 근경만을 배양한 구는 0.7mm인데 비하여 shoot에 근경을 부착한 경우는 6.1mm. shoot만을 배양한 경우는 11.6mm로 별브의 비대도 왕성함을 관찰할 수 있었다.

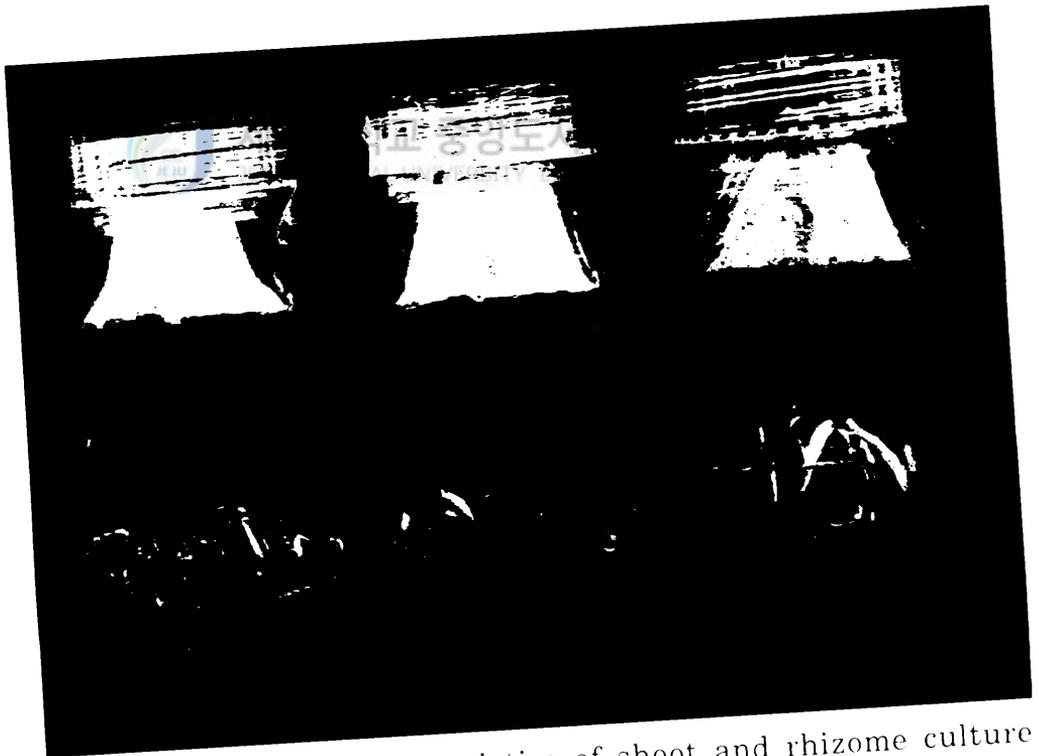


Fig. 18. Growth characteristics of shoot and rhizome culture *in vitro* of *Cymbidium kanran*.

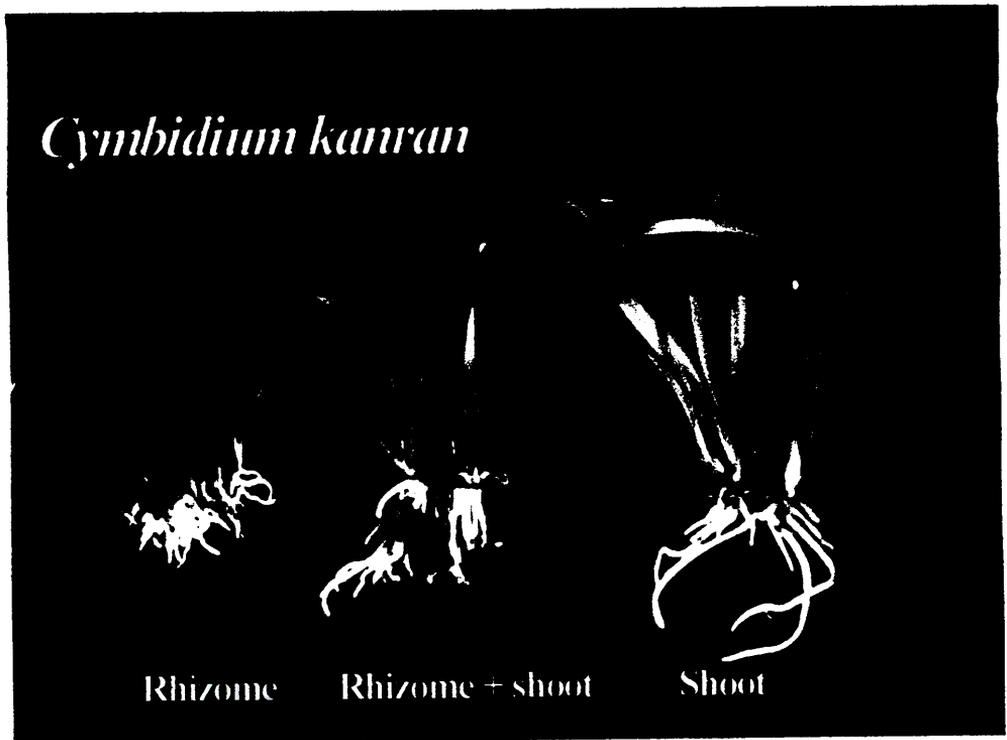


Fig. 19. Growth characteristics of shoot and rhizome culture *in vitro* of *Cymbidium kanran*.

組織培養을 통한 寒蘭의 健苗를 확보하기 위하여는 근경배양을 통해서 얻어진 shoot에 부착된 근경을 완전히 제거한 다음 기내에서 육묘하면 강건한 묘를 획득할 수 있어 경화과정에서 생존율을 훨씬 높일 수 있을 것으로 사료되었다.

## 2. 寒蘭 個體間의 RAPD分析에 의한 遺傳的 特性

### 2-1. 自然短葉種과 人爲的 誘發 短葉種의 生育 및 遺傳的 關係

#### 가. 自然短葉種과 人爲的 誘發 短葉種의 生育特性

濟州寒蘭을 他家交配하여 획득한 개체와 배지에 uniconazol를 첨가하여 인위적으로 유발한 短葉種의 생육특성을 비교한 결과 自然發生한 短葉種(ND)의 엽장이 2.3cm인데 비하여 一般種(N)은 약 5배인 10.8cm로 크며, 엽폭은 ND가 0.42cm로 N의 0.36보다 더 넓었다(Table 5, Fig.20).

Table 5. Growth characteristics of plantlets and rhizome of AD, ND and N of *Cymbidium kanran*.

Strains	Leaf(cm)		Leaf index	Rhizome (cm)		
	Length	Width	Length/ width	Length	Thickness	No. of tiller
ND <sup>z)</sup>	2.32	0.42	1.84	4.22	0.34	9.8
AD	6.46	0.54	2.41	5.36	0.31	8.7
N	10.84	0.36	12.75	8.33	0.18	3.6

<sup>z</sup> ND : natural dwarf type

AD : artificially induced dwarf type

N : normal type

엽형지수는 ND가 1.84로 가장 낮고, N은 12.75로 높았다. 또한 근경의 굵기는 ND가 0.34cm로 가장 굵었고, 인위적 短葉種(AD)은 0.31cm로 중간이었으며, N가 0.18cm로 가장 얇고 길이는 길었다.

人爲短葉種(AD)과 같이 Uniconazole을 처리하면 地上部의 생장을 抑制하고 상대적으로 地下部의 생장을 促進한다는 보고(Boe 等, 1973; Dyson, 1972)가 있는데, 이는 <sup>13</sup>C를 사용하여 <sup>13</sup>C의 이동을 조사한 결과 地上部보다 地下部쪽으로 이동이 促進되어 생장억제제처리에 의하여 동화산물의 분배의 변화가 형태변화로 나타난다고 하였다(Kim and Suzuki, 1989).

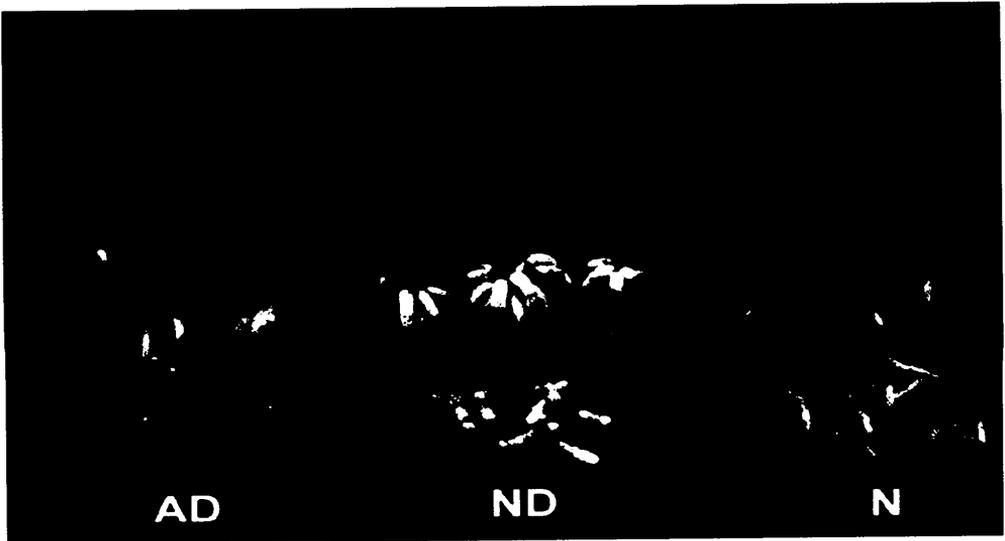


Fig. 20. Growth characteristics of plantlets and rhizome of AD, ND and N of *Cymbidium kanran*.

AD : artificially induced dwarf type

ND : natural dwarf type

N : normal type

이와 같은 결과로 볼 때 ND는 다른 두종과 확연하게 다른 생육특성을 나타내었다.

植物體에서의 矮性化는 멘델의 법칙에 의해서 분리되는 흥미있는 현상 중에 하나이다. 간혹 비정상적인 세포벽의 생성(Reiter 等, 1993) 혹은 세포신장이나 확대에서의 결함(Aeschbacher 等, 1995) 등에 의하여서도 矮性化 突然變異가 생성된다고 보고되었다. 또한 최근에 토마토에서 분리된 矮性化에 관련된 유전자(Bishop 等, 1996)는 GA가 아닌 植物生長에 影響을 미치는 것으로 알려진 brassinasteroids의 대사에 관련되었을 가능성이 제시되었다(Sakurai 等, 1993). 하지만 矮性化에 관련된 대다수의 突然變異들은 GA의 대사 및 인식과 관련이 있다고 보고되었다(Reiter, 1993).

Kim(1998, 1999)의 보고에 의하면 양란 심비디움에 GA합성억제제인 uniconazole입제 1g/L를 화분 배양토 위에 뿌려주었을 때 開花가 促進

되고 植物體의 초장을 줄일 수 있다고 하였고, 鄭 等(1999)은 *Bletilla striata*의 器內培養에서 유니코나졸(uniconazole) 0.2mg/L처리로 shoot가 7.6mm로 무처리의 85% 정도 생장억제효과가 높았으나 근장은 차이가 없고 근수가 많았으며 근경이 증가하는 경향을 보였다고 보고하였다. 본 시험에서의 AD는 약제의 농도차에 따라 왜화 정도가 반비례적으로 나타나는 실험외적 결과로 미루어 볼 때, 왜화제의 효과는 한시적인 矮性化, 즉 첨가된 왜화제가 식물체의 GA합성을 잠정적으로 억제하는 현상인 것으로 추측되었다.

나. 自然短葉種과 人爲的 誘發 短葉種의 遺傳的 特性

他家交配에 의하여 육성한 일반 寒蘭과 短葉種, 그리고 인위적으로 유발한 短葉種 寒蘭의 遺傳的 特性을 分析하기 위하여 10개의 random primers를 사용하여 얻은 多型性 밴드는 총 32개였으며, monomorphic 한 PCR products는 23개였다(Table 6).

Table 6. The list of sequences and GC content of random primers used in this study

Primer	Sequences ( 5' → 3' )	No. of bands	GC contents (%)
OPA-10	GTGATCGCAG	4	60
OPA-11	CAATCGCCGT	3	60
OPA-12	TCGGCGATAG	1	60
OPA-13	CAGCACCCAC	3	70
OPB-16	AGCCAGCGAA	5	60
OPB-1	GTTTCGCTCC	3	60
OPB-2	TGATCCCTGG	2	60
OPB-4	GGA CTGGAGT	3	60
OPB-7	GGTGACGCAG	3	70
OPB-8	GTCCACACGG	5	70

각각의 primer에 의하여 각기 다른 수의 多型性 밴드가 생겼으며, primer OPA12는 1개, primer OPB16은 5개의 DNA fragments를 증폭하였다(Fig.21 )

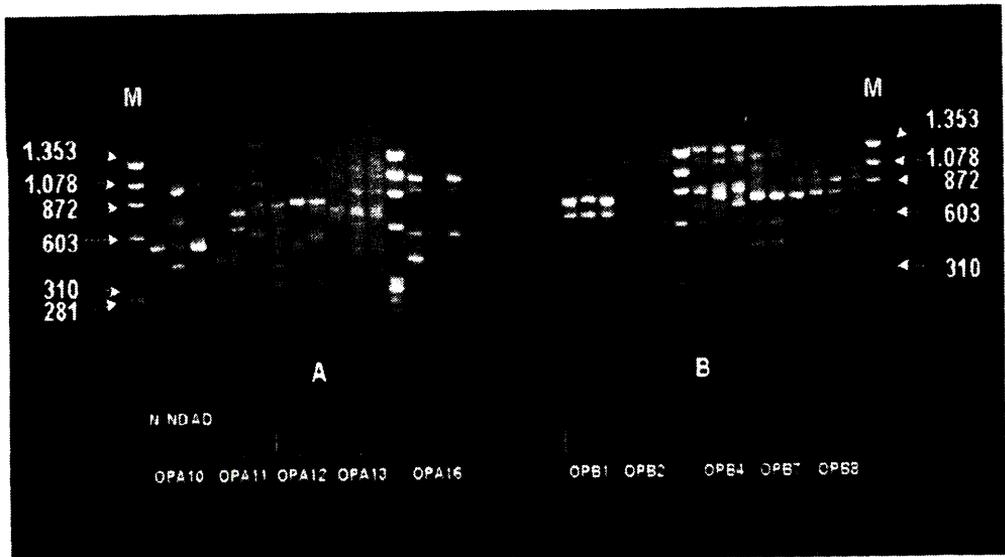


Fig. 21. RAPD profiles obtained from three types of *Cymbidium kanran* using the primers (A) OPA 10, 11, 12, 13, 16 and (B) OPB 1, 2, 4, 7, 8.  
M : Size maker( $\phi$  x 174 DNA/*Hae*III)  
N : Normal type  
ND : Natural dwarf type  
AD : Artificially induced dwarf type

N, ND와 AD를 구분하기 위해서는 OPAprimer가 OPBprimer 보다 좋은 결과를 보였으며 특히 OPA 10, 11, 16primer가 좋은 분자지표로 나타났다.

일반적으로 primer의 염기구성은 증폭된 DNA 단편의 길이에 많은 영향을 미치며(William 等, 1990) primer의 G.C의 함량이 높을수록 DNA 단편의 재현성을 높일 수 있는 것으로 알려져 있는데(Yoo 等, 1996), 본 시험에 사용한 10mer primer의 G.C함량은 60% 이상으로서 비교적 높은 경향이였다.

총 32개의 多型性 밴드를 가지고 Jaccard's coefficient 계산을 통한 유사도 지수는 0.75~0.929이었다(Table 7).

Table 7. Similarity matrix from three types of *Cymbidium kan-ran* using Jaccard's coefficient.

	N <sup>z</sup>	ND	AD
N	1.0000000		
ND	0.7575758	1.0000000	
AD	0.9285714	0.7500000	1.0000000

<sup>z</sup> See Fig.20

類似度指數는 N과 AD 사이가 0.929로 높았으며, AD와 ND 사이의 지수는 0.75였다.

N과 AD의 유전자형을 비교했을 때 적은 수의 多型性이 관찰되었다. F1 사이인 이들이 遺傳的으로 매우 가깝다는 것을 보여주는 것이다.

이것은 왜화제를 처리함으로써 DNA서열의 변화가 이루어지는 것이 아니라 DNA傳寫를 조절함으로써 왜화가 이루어지는 것으로 생각할 수 있었다. 그러나 N 또는 AD와 유사도 지수가 낮은 ND는 수정시 염색체 또는 DNA의 전이, 전사, 중복, 제거 등 다양한 경로를 거쳐 일어나 여러 가지 多型性을 나타낸 것으로 사료되었다. 본 시험에서는 AD의 유전형질이 N과 유사하다고 하였지만 AD의 생육특성이 다음 세대로 이어지는지에 대한 검토가 필요하다. 본 시험에 사용한 RAPD markers에 의한 變異의 구분은 自然的으로 發生한 短葉種과 왜화제를 처리하여 인위적으로 만든 短葉種을 구분할 수 있는 분자지표(molecular marker)로 사용할 수 있을 것으로 사료되었다.

## 2-2. 種子發芽 個體間的 遺傳的 特性

自家 및 他家交配種의 종자에서 형성된 근경 중 각각 10개체씩 선별, 증식하여 이들 交配方法別 10개체를 대상으로 RAPD에 의한 近緣關係를 분석하기 위하여 12개의 UniP(20-mer)primer 중 4개의 primer에서 多型性을 나타냈는데 그중 10번 primer가 밴드형성이 다양하여 이를 선발하였다. PCR product에 대해 1.5% agarose gel에서 전기영동한 결과 증폭된 DNA단편들의 크기는 400~ 2,300bs사이에서 나타났으며, 多型化 밴드수는 自家交配에서는 10~16개, 他家交配에서는 9~17개로 다양하게 나타났다(Fig. 22).

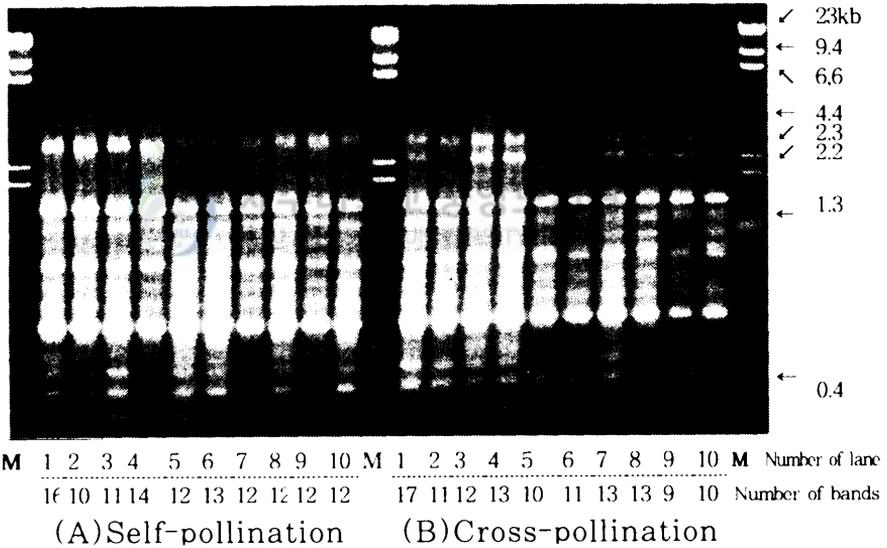


Fig. 22. RAPD profiles from self-pollination and cross pollination of *Cymbidium kanran* using the primers (UniP #10 : GATGTGTTCTTGGAGCCTGT )

전체 유사도는 自家交配에서 0.3810~0.7692, 他家交配에서는 0.5000~0.9000의 범위로 넓게 나타났다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 濟州寒蘭의 品種育成時 自家 및 他家交配에서 발생한 개체간에 다수의 變異를 발견할 수가 있을 것으로 판단되었다.

Table 8. Similarity matrix from self-pollination of *Cymbidium kanran* using Jaccard's coefficient.

Number of lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1.0000									
2	0.5385	0.1000								
3	0.5926	0.3810	1.0000							
4	0.6667	0.5833	0.5600	1.0000						
5	0.5714	0.4545	0.5217	0.6154	1.0000					
6	0.5517	0.4348	0.5000	0.5926	0.5600	1.0000				
7	0.5714	0.5455	0.5217	0.6154	0.5000	0.5600	1.0000			
8	0.7143	0.6364	0.6087	0.7692	0.6667	0.6400	0.6667	1.0000		
9	0.6429	0.6364	0.5217	0.6923	0.5833	0.5600	0.6667	0.7500	1.0000	
10	0.5714	0.4545	0.5217	0.6154	0.5833	0.6400	0.5833	0.6667	0.5833	1.0000

Table 9. Similarity matrix from cross-pollination of *Cymbidium kanran* using Jaccard's coefficient.

Number of lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1.0000									
2	0.6429	0.1000								
3	0.7586	0.6087	1.0000							
4	0.8000	0.6667	0.8800	1.0000						
5	0.7407	0.7619	0.8182	0.7826	1.0000					
6	0.7143	0.5455	0.7826	0.8333	0.6667	1.0000				
7	0.8000	0.7500	0.7200	0.7692	0.7826	0.6667	1.0000			
8	0.8667	0.7500	0.7200	0.7692	0.7826	0.6667	0.8462	1.0000		
9	0.6923	0.5000	0.8571	0.8182	0.7368	0.8000	0.8364	0.6364	1.0000	
10	0.7407	0.6667	0.8182	0.7826	0.9000	0.7619	0.7826	0.7826	0.8421	1.0000

또한 지금까지 PCR 증폭에 의한 다양한 DNA 밴드양상은 近緣種間 類緣關係를 밝히는데 사용하고 있으나(Bellany 等 1996; Dubouzet 等, 1996) 최근 분류학적으로 종내의 변이 탐색에 유용한 방법으로 이용 (Lee와 Kim, 1996; You 等 1997)하고 있어서 이러한 방법을 이용하면 종자발아 개체사이에 變異株를 조기에 탐색할 수 있을 것으로 사료되었다.

### 2-3. 濟州寒蘭의 自生地別 遺傳的 近緣關係

濟州 自生寒蘭의 遺傳的 近緣關係 분석을 위한 시료는 Table 12와 같이 돈네코지역의 표고별 自生寒蘭과 論古岳, 嶺南里, 道順川 上流, 오렌지 장원, 新禮里 河川邊, 선돌 等地에서 채취한 18개 試料와 濟州寒蘭의 기존품종인 仙鶴, 臺灣產 寒蘭, 中國產 寒蘭, 日本產 寒蘭 그리고 春蘭 등 모두 23개를 시험재료로 공시하였다

Table 10. The list of *Cymbidium kanran* used in this study.

No	Natural	No	Natural
1	<i>Cym. kanran</i> (Taiwan)	13	Youmdon(Akgunchon)
2	<i>Cym. kanran</i> (China)	14	Yeongnamri
3	<i>Cym. kanran</i> (Japan)	15	Dosunri
	<i>Cym. kanran</i> (Chejudo)	16	Donneco 200m
4	Nongoak	17	Donneco 300m
5	Nongogyo	18	Donneco 400m
6	Sinraeri	19	Donneco 500m
7	Orangejangoun	20	Donneco 700m
8	Seondol	21	Donneco 800m
9	Suhori	22	Seonhak(仙鶴)
10	Dosun(650m altitude)	23	<i>Cymbidium</i>
11	Dosun(600m altitude)		<i>virescens</i> (春蘭)
12	Dosun(500m altitude)		

RAPD分析을 위하여, primer selection으로 총 20개의 primer중에서 10개의 UBC(University of British Columbia) 10-mer random primer(Table 11)가 多型性を 보였다고 생각되어, 이들을 선발하였고 23개 공시한란의 DNA를 정량하여 PCR(Polymerization Chain Reaction)한 후 分析을 하였다.

Table 11. The list of sequences random primers used in this study.

Primer NO.	Sequences(5' → 3')
UBC 705	GGAGGAAGGG
UBC 706	GGTGGTTGGG
UBC 708	GGGTTGTGGG
UBC 709	CCTCCTCCCT
UBC 713	CCCTCCCTCT
UBC 715	CCACCACCCA
UBC 718	GGGAGAGGGA
UBC 721	CCCTTCCCTC
UBC 722	CCTCTCCCTC
UBC 724	CTCCCTCCTC

1.2% agarose gel에서 전기영동한 RAPD분석 결과는 Fig. 23과 같았다.

증폭된 DNA단편들의 크기는 400~2,000bp 사이에서 나타났으며, 각 primer의 RAPD 양상은 다양성보다 유사성을 많이 보였고, 다형화 밴드의 수는 적었다. 濟州寒蘭의 RAPD分析 결과 10개 primer를 통해

증폭된 총 밴드수는 80개로 나타났고, 각 primer에서 증폭된 밴드수는 3개에서 14개까지 다양했다.

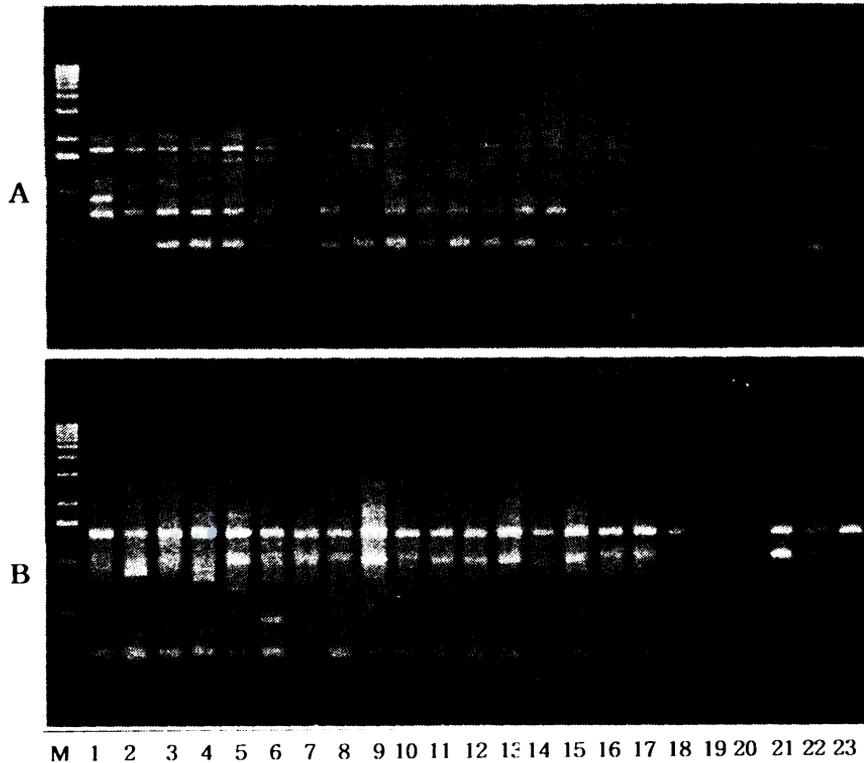


Fig. 23. RAPD profiles obtained from A and B of *Cymbidium kanran* using the primers. (A) UBC 708 , (B) 706 Maker size : 1 Kb DNA ladder

이들 RAPD분석 결과의 유사도를 UPGMA 방법인 SHAN Clustering으로 분석한 결과 Fig. 24와 같은 계통발생도를 얻을 수 있었다.

寒蘭의 系統들은 크게 3그룹으로 분류되었는데 23개 시료들의 전체 유사도는 0.75~0.95의 범위로 비교적 높게 나타났고, 臺灣産 寒蘭은 濟州寒蘭과는 類緣關係가 비교적 멀지만, 中國産 寒蘭과 日本産 寒蘭은

濟州寒蘭과 별 차이가 없었다. 돈네코 지역의 표고별로 自生하는 寒蘭의 경우에는 서로간의 類緣關係가 한라산내 다른 지역의 寒蘭들보다 가깝게 집괴되었으며, 遺傳的으로 homozygous한것으로 사료되었다. 이 결과를 통해 알 수 있는 것은 寒蘭의 類緣關係는 일반적인 형태적 분류나 지역적 분류기준과 차이가 나며, 한라산 自生地 한 곳에서의 寒蘭집단에서는 遺傳的으로 유사하였다.

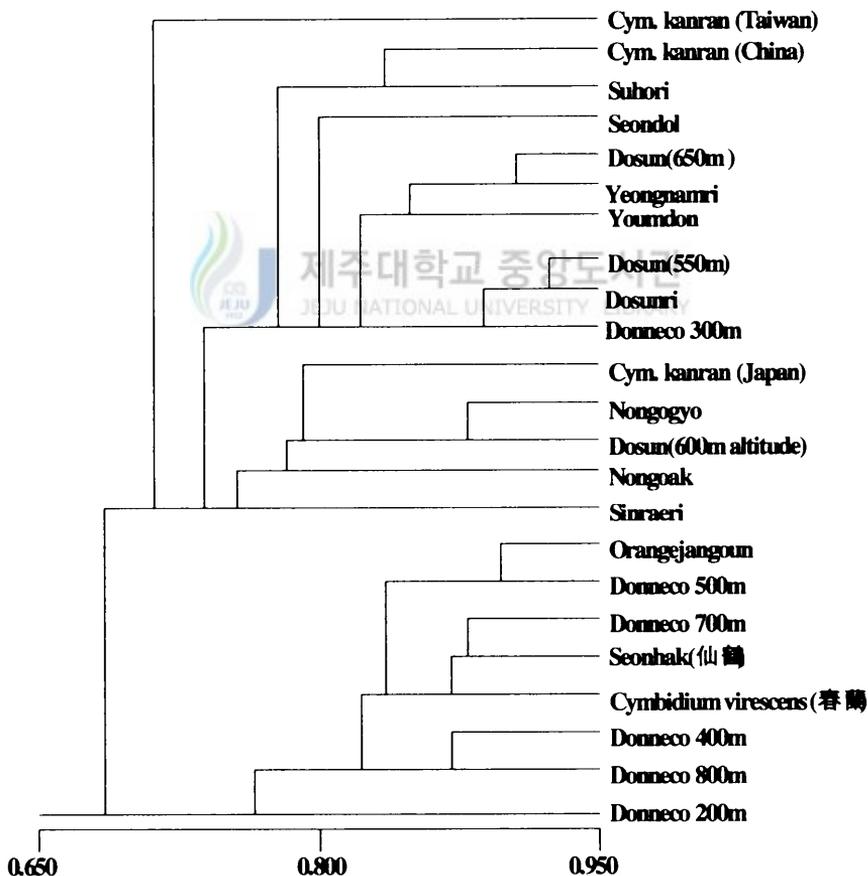


Fig. 24. Dendrogram of genetic relationships between Cheju kanran and natural growth kanran.

## V. 綜 合 考 察

본 시험은 濟州寒蘭의 다량증식을 위한 組織培養技術의 정립과 品種育成에 따른 交配種, 또는 自生種 간의 유연적 近緣關係를 구명하여 育種의 基礎資料로 이용하고자 하였다. 다량증식을 위한 組織培養技術開發은 交配方法과 培養배지에 따른 발아력조사, 종자발아를 促進하기 위하여 置床前 소독 等 전처리 방법을 검토하였으며 濟州寒蘭의 新品種 육성시 이용할 수 있는 遺傳的 近緣關係를 탐색하기 위하여 他家交配에서 획득한 短葉種과 일반종의 近緣關係분석, 自家 및 他家交配에서 발아된 근경개체들 사이 그리고 自生地域間의 近緣關係分析 等の 시험을 수행하였다.

寒蘭의 종자발아를 위해 Kokubu 等(1980)은 MS배지에 몇가지 첨가 물질을 넣은 배지에 培養하였으며, 李 等(1984)은 寒蘭의 종자발아에 MS배지가 좋았고, 崔와 鄭(1992)은 Hyponex 3g/L, peptone 4g/L 배지에 NAA 0.1mg/L, kinetin 0.01mg/L을 첨가한 배지에서 발아가 양호하다고 하였고, 金(1994)은 MS배지가 효과적이라고 보고하여 연구자마다 결과가 다양하였다. 이와 같이 배지에 대한 반응의 차이는 種, 品種, 交配組合에 따른 遺傳的 差異에 기인하는 것으로 여겨지지만 종자의 성숙도 또는 배의 충실도에 따라 배지에 대한 반응이 달라질 수도 있을 것으로 사료되었다.

종자발아 促進을 위해서 Kano(1965)는  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  처리를 함으로서 발아를 促進시킬 수 있다고 하였는데  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  처리는 種皮의 軟化로 인한 물리적 發芽抑制物質의 배출효과를 위해 처리한다고 하였고, Miyoshi와 Mii(1988)은 *Calanthe discolor*의 종자 培養시 超音波처리를 4~16분 처리했을 때 발아율이 무처리에 비해 4~6배 증가된다고 하였

는데 본 시험의 결과는  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  에 침지후 超音波로 15분간 소독하여 파종하였으나 발아에 큰 영향을 미치지 않았다.

한편 蘭 종자발아 促進을 위해서 島野(1976) 또는 澤(1962) 등은 KOH처리를 하면 발아를 促進시킬 수 있다고 하였으며 KOH처리는 種皮의 투수성의 증대와 發芽抑制物質을 용해한다고 하였다. 한편 加古(1968, 1976)는 春蘭의 종자를 파종하기 전에 KOH를 농도별, 시간별로 처리시, 포화용액에서는 15분간, 1.0M에서는 3분, 0.1M에서는 10분간 처리하는 것이 효과적이라고 하였다. 한편 上田(1985)는 春蘭의 성숙 종자를 파종하기 전 0.1M KOH 용액으로 5~10분간 前處理後 충분히 水洗해서 Wilson's 용액에 10~20분간 살균한 다음 水洗해서 파종하는 방법을, 崔와 鄭(1992)은 0.1N KOH에 30분간 처리하거나 超音波로 240분간 처리하면 발아가 양호하고 발아소요일수도 단축된다고 전처리 방법을 제시하였다. 본 시험에서는 KOH 용액과 Wilson's 용액을 혼합하거나 KOH 용액을 처리한 후 Wilson's 용액으로 소독하여 파종하여도 발아가 빠르고 발아율도 높아 파종전 간단한 처리로 종자발아에 효과적일 것으로 생각되었다.

한란의 근경배양시 金 等(1979)은 NAA 5.0mg/L와 BA 0.5mg/L의 단용 또는 NAA 0.1mg/L 혼용처리로 근경생육이 양호하다고 하였다. 또한 金(1986)은 근경생장은 BA 0.5mg/L + NAA 0.5mg/L, shoot 분화는 NAA 2.0mg/L 단용이 효과적이라고 하였으며, 李 等(1984, 1986)은 BA 5.0mg/L와 10.0mg/L의 단용 또는 NAA 0.1mg/L 혼용첨가로 shoot가 발생되었으며, shoot분화는 BA 10mg/L 단용처리에서 효과적이라 보고하였으나 金 等(1988)에 의하면 寒蘭 근경분화를 위하여 BA의 첨가효과가 크지만 발근이나 근경생육에는 효과가 없다고 보고하였다. 이는 근경배양을 위한 cytokinin처리시 배지가 심하게 갈변하

여 정상적인 생육이 저해되고, 植物生長調節物質의 효과가 나타나지 않는 데 이러한 현상은 배양중 식물체가 분비하는 페놀화합물에 의해서 배지내의 유효 무기이온들이 酸化되므로서 발생하는 현상(Constantin 等, 1977; Drew, 1979; Ichihashi 等, 1977; Ishii, 1980)이라고 하였는데, 寒蘭의 경우에는 生長調節物質 중 특히 cytokinin류의 첨가와 그 농도의 증가에 따라 갈변도가 심하게 나타난다. 酸化防止를 위하여 Cattleya의 경정배양시 ascorbic acid를 첨가했을 때 polyphenoloxidase의 활성이 억제된다고 하였으며(市橋와 加古, 1977), Cymbidium屬의 절편배양(Morel, 1960)과 특히 경정배양시(Anderson, 1975) citric acid와 ascorbic acid를 혼용한 용액에 절편을 침지하였을 때 酸化防止에 효과가 있다고 보고하였다.

한편 莖頂배양시 0.5~2%의 PVP(Polyvinylpyrrolidone)처리가 절편의 생존에 필수적이라고 하였으며(Walky, 1972), 절편 끝에서 나오는 자주색 물질의 발생은 0.01% PVP에 의해서 억제되었다고 하였고(Stevenson and Harris, 1980), 東洋蘭(浩德之花)의 근경으로부터 유묘의 증식시 일어나는 배지의 갈변현상도 PVP 첨가배지에서 억제된 것으로 보고(崔 等, 1996)하였는데 본 시험에서도 citric acid와 ascorbic acid도 다소의 갈변억제가 있었으나 PVP 1.0g/L첨가는 배지의 갈변현상이 많이 억제되어 배지의 갈변화가 심한 식물의 배양에 효과가 있을 것으로 사료되었다.

蘭科植物도 다른과 식물의 경우와 같이 조직의 배양으로부터 개체발생까지는 문제가 없으나 경화단계에서 큰 애로를 겪고 있다. 기존의 東洋蘭系統들의 근경배양은 왕성한 근경생장에 비해 shoot의 크기가 작고 많이 발생하지 않으며, 경화단계에서 생존율이 좋지 않았다. 그러나 배양단계에서 여러 개체를 형성시켜 成體를 육성시킬 경우에는 경화단계

에서도 지속적인 생장을 유도시킬 수 있을 뿐만 아니라 생존율도 100%에 도달할 수 있고, 이듬해에 개화까지도 기대할 수 있어 培養苗의 급속 생장과 경화 성공률의 향상이라는 점을 감안할 때, 충실한 묘를 생산하는 것이 중요하다.

충실하고 건강한 묘를 생산하기 위해서 배지에 coconut milk 등 천연 산물을 첨가하면 생육이 좋다고 하는 것은 널리 알려진 사실이다(Jeyanayaghy 等, 1966; Pages, 1971). 쏘과 鄭(1979)은 *Dendrobium nobile* 유묘배양시 사과즙 200g/L, 토마토즙 100g/L, 鄭 等(1984, 1985)은 Hypone배지에 바나나 35g/L과 활성탄 2.0g/L 첨가가 나도풍란(*Aerides japonicum*)의 종자발아와 유묘생육에 좋았고, coconut milk 150g/L 첨가는 *Cymbidium ensifolium*의 근경생육에 효과적이라고 보고하였으며, 李 等(1985)은 Hyponex II 배지에 Passion fruit 과즙의 첨가로 寒蘭 근경의 생육과 분화에 효과적이라 보고한 바 있다. 또한 *Cymbidium*屬 蘭類의 배양에서 바나나즙 100g/L과 감자즙 50g/L을 첨가하여 좋은 결과를 얻었다는 보고도 있는데(Arditti, 1968; 康, 1989), 본 시험의 결과에서도 바나나즙과 감자즙을 혼용처리한 구에서 우량한 묘를 생산할 수 있었다. 한편 기내 육묘 시에 근경을 부착하면 우선적으로 근경이 성장되기 때문에 순화단계에서 묘 손실율을 줄일 수 있는 우량묘를 획득하기 위하여는 근경을 완전히 제거하고 shoot만을 배양하는 것이 효과적이었다.

濟州寒蘭을 他家交配하여 획득한 개체와 植物 왜화제인 uniconazol를 첨가하여 인위적으로 矮性化시킨 개체에 대한 생육특성을 비교한 결과 他家交配에서 自然發生한 短葉種은 초장이 짧고, shoot와 뿌리는 굵었으며 근경도 굵었다. 그러나 人爲적으로 유발한 短葉種은 自然發生 短葉種과 一般型의 중간형태로 나타났다. Uniconazole을 처리하면 地上部

의 생장을 抑制하고 상대적으로 地下部の 생장이 促進된다고 하였는데 (Boe 等, 1973, Dyson, 1972) 地上部보다 地下部쪽으로 동화산물의 이동이 促進되는 경향은 생장억제제 처리에 의하여 동화산물의 분배에 변화가 생기고, 이것이 형태변화로 나타난다고 하였다(Kim과 Suzuki, 1989). 간혹 비정상적인 세포벽의 생성(Reiter 等, 1993), 혹은 세포신장이나 확대에서의 결함(Aeschbacher 等, 1995) 등에 의하여서도 矮性化 突然變異가 나타났다는 보고가 있다. 또한 최근에 토마토에서 분리된 矮性化에 관련된 왜성유전자(Bishop 等, 1996)는 GA가 아닌 식물생장에 영향을 미치는 것으로 알려진 brassinasteroids의 대사에 관련되었을 가능성이 제시되었다(Sakurai 等, 1993). 하지만 矮性化에 관련된 대다수의 突然變異들은 GA의 대사 및 인식과 관련이 있다고 보고되었다(Reiter, 1993).

Kim(1998, 1999)의 보고에 의하면 3년생의 양란심비디움에 GA합성 억제제인 유니코나졸(uniconazole)입제 1g/L를 화분배양토 위에 뿌려 주었을 때 개화가 促進되고 植物體의 초장을 줄일 수 있다고 하였고, 鄭 等(1999)은 *Bletilla striate*의 기내 배양에서 uniconazole 0.2mg/L 처리로 엽장이 7.6mm로 무처리의 85% 정도 생장 억제효과가 높았으나 뿌리인 경우 근장은 차이가 없었고 근수가 많아지며 근경이 증가하는 경향을 보였다고 보고하였다. 본 시험에서의 AD는 약제의 농도차에 따라 왜화정도가 반비례적으로 나타나 한시적인 矮性化 즉, 첨가된 왜화제가 식물체의 GA합성을 잠정적으로 억제하는 현상인 것으로 추정되었다.

自然發生과 短葉種과 인위적으로 誘發시킨 短葉種간의 遺傳的 近緣關係를 구명하기 위하여 10개의 random primer를 사용한 결과 OPA primer 10, 11, 16은 총 32개의 多型性밴드를 나타냈으며 이들의 유사도 지수는 0.75~0.929이었다

RAPD markers에 의한 變異의 구분은 自然的으로 발생한 短葉種과

왜화제를 처리하여 인위적으로 유발시킨 蘭을 구분할 수 있는 좋은 분자 지표(molecular marker)로 사용할 수 있을 것으로 사료되었다.

自家 및 他家交配種의 종자에서 형성된 근경 중 각각 10개체씩 선별하고 증식하여 이들 교배방법별 10개체를 대상으로 RAPD에 의한 近緣關係를 분석한 결과 12개의 URP(20-mer)primer중 #10번 primer가 밴드 형성이 다양하여 이를 선발하였으며 이들의 전체 유사도는 自家交配에서 0.3810~0.7692, 他家交配에서는 0.5000~0.9000 범위로 넓게 나타났다. 이러한 결과를 볼 때 濟州寒蘭의 品種育成에서 自家 및 他家交配에서 발생한 개체간에서는 다수의 變異를 발견할 수가 있을 것으로 사료되었다.

濟州 自生寒蘭의 遺傳的 近緣關係 分析을 위한 공시재료는 돈네코지역의 표고별 寒蘭, 論古岳, 嶺南里, 道順川上流, 오렌지장원, 新禮里 河川邊, 선들 등에서 채취한 自生寒蘭 18개 시료와 濟州寒蘭 재배종인 仙鶴과 臺灣產 寒蘭, 中國產 寒蘭, 日本產 寒蘭 그리고 春蘭을 선발하여 총 23개를 시험재료로 이용하여 RAPD 분석 결과 UBC(University of British Columbia) 10-mer random primer가 多型性を 보였다고 생각되어 이들을 선발하였고 공시된 한란의 계통들은 크게 3그룹으로 분류되었으며, 전체 유사도는 0.75에서 0.95의 범위로 비교적 높게 나타났다. 臺灣產 寒蘭은 濟州寒蘭과는 類緣關係가 비교적 멀었으나, 中國產 寒蘭과 日本產 寒蘭은 濟州寒蘭과 별 차이가 없었다. 돈네코 지역의 표고별 自生寒蘭의 경우에는 서로간의 類緣關係가 한라산내 다른 지역의 한란들보다 가깝게 집괴되었으며, 유전적으로 homozygous하다고 사료되었다. 이 결과를 통해 알 수 있는 것은 寒蘭의 類緣關係는 일반적인 形態的 分類나 地域的 分類基準과 차이가 나며, 한라산 自生地 한 곳에서의 한란 집단에서는 遺傳的으로 유연관계가 깊었다.

지금까지 PCR 증폭에 의한 다양한 DNA 밴드양상에 의한 분류방법은

近緣種間의 類緣關係를 밝히는데 사용하여 왔으며(Bellany 等 1996; Dubouzet 等, 1996) 최근 分類學的으로 불분명하고 미개발된 식물들에 있어서 種內 變異探索에도 시도되어 일부에서는 유용한 方法으로 가치를 인정받고 있다(Lee와 Kim, 1996; You 等 1997). 기존의 分類體系에 비해 집단의 미세한 변이들에 대해서도 구별이 가능한 점에서 RAPD를 이용한 分類方法은 寒蘭의 品種, 種內 變異性을 探索하는데 매우 편리하고 유용한 方法이라 사료되었다.



## VI. 摘 要

1. 寒蘭(*Cymbidium kanran*)의 自家 및 他家交配種子를 置床한 결과 他家交配種子의 平均발아일은 184일인데 비하여 自家交配種子是 201일로 17일 정도 빠른 경향을 보였다. 최초 종자발아개체수는 自家交配種子보다 他家交配종자가 많았으며 파종 1년후의 총발아수도 他家交配種子が 많았다.

한편 종자발아일수가 빠른 배지는 1/2MS배지였으며, 배지에 따른 種子發芽所要日數는 181~190일로 차이가 없었으나 종자 소독방법은 Voltex-mixer를 이용한 것의 종자발아일수가 145일로 자석교반기(Magnetic stirrer)를 이용한 것의 213일보다 68일 정도 빠른 경향이 었다. 배지별 소독방법별 발아개체수에서 초기발아수는 Voltex-mixer를 이용 소독한 후 1/2MS배지에 파종한 처리가 많은 경향이나 파종 1년 후에는 Handling 및 Voltex-mixer를 이용 소독한 후 파종한 1/2MS 배지에서 다소 발아가 많은 경향이였다.

種皮軟化 처리방법별 발아시험에서 Wilson's용액 및 0.1N KOH 혼용처리구가 파종 60일째부터 발아가 시작되었고 120~180일 사이에 가장 많았다.

2. 組織培養液의 배지를 조성하는 固形物質중 食用寒天과 試藥用寒天 그리고 gerlite의 이용성을 검토한 결과 gerlite 2.5g/L가 shoot생장과 경제적인 면에서 유리하였다.

寒蘭의 shoot분화를 위한 抗酸化劑의 처리 결과 Polyvinylpyrrolidone(PVP, M.W. 40,000)이 ascorbic acid, aspartic acid, rutin보다 우수한 것으로 나타났다.

植物生長調節物質 처리에서는 0.1~1.0mg/L의 BA와 0.1mg/L NAA, 1g/L PVP 처리구에서 가장 좋은 생육을 보였으며, BA와 NAA의 농도가 높을수록 배지의 갈변도가 심하여 植物生長調節物質의 작용을 抑制하였다.

따라서 寒蘭의 경우 급속한 개체증식을 위해서는 MS기본배지에 겔라이트(gerlite) 2.5g/L를 첨가하고, BA 0.1~1.0mg/L수준에 NAA 0.1mg/L, PVP 1g/L를 첨가하여 건강한 묘를 확보할 수 있는 것으로 나타났다.

3. 寒蘭 器內育苗에 있어서 바나나즙과 감자즙을 단용 및 혼용 처리한 결과, 바나나즙 100g/L + 감자즙 50g/L 혼용처리한 것이 초장이 5cm 이상 신장되었고 엽수 및 분지수가 많아 전체적으로 생체중이 증가되어 器內育苗用 배지로 바나나즙과 감자즙을 혼용첨가하는 것이 적합한 것으로 사료되었다.

寒蘭培養묘의 器內育苗를 위해 근경부착유무에 따른 시험에서는 근경을 완전히 제거하고 shoot만 培養한 경우 생체중, 엽장, 엽폭, 근장 등 생육이 가장 좋은 결과를 보였으며 벌브직경도 평균 12mm이상으로 5축 이상의 건강한 묘를 생산할 수 있었다.

4. 濟州 寒蘭의 他家交配種子를 받아시켜 얻은 근경배양에 의한 일반종(normal type)과 uniconazole 처리에 의한 인위적 短葉種(artificially induced dwarf type), 그리고 자연발생 短葉種(natural dwarf type)의 생육 특성을 비교한 결과, 자연발생 短葉種은 정상 개체의 길이보다 1/5 가량 짧았고, 벌브의 굵기는 더 굵었으며 근경은 굵고 짧았고, 분지수는 많았다. 인위적 短葉種은 다른 두 종의 중간적인 형질을 나타내었다.

遺傳的 近緣關係를 살펴보기 위하여 이들 寒蘭 genomic DNA를 가지고 RAPD분석을 한 결과 유사도지수는 N과 AD 사이가 0.929로 높았으며, AD와 ND 사이의 유사도지수는 0.75였다. UPGMA 집괴분석 결과, N과 AD가 한 연관군으로 집괴되었다. 이러한 RAPD markers는 自然發生 短葉種과 인위적 短葉種을 구분할 수 있는 좋은 분자지표(molecular marker)로 이용할 수 있을 것으로 사료되었다.

5. 濟州寒蘭의 自家 및 他家交配種子에서 획득한 근경 중 각각 10개체씩 선별하여 이들 개체간의 DNA밴드 패턴을 분석한 결과 DNA단편들의 크기는 0.4~2.3Kbp 사이에 나타났으며 다형화밴드수는 自家交配에서는 10~16개, 他家交配에서는 9~17개로 다양하게 나타났으며 이들의 전체 유사도는 自家交配에서 0.3810~0.7692, 他家交配에서는 0.50~0.90의 범위로 넓게 나타났다.

6. 濟州寒蘭의 遺傳的 近緣關係를 분석하기 위하여 23개의 수집장소별로 DNA 분석을 한 결과 DNA 단편들의 크기는 0.4Kbp~2.0Kbp사이에서 나타났으며 각 primer에서 증폭된 밴드수는 3개에서 14개까지 다양했고 전체 유사도는 0.75~0.95의 범위로 비교적 깊게 나타났다.

## 引用文獻

- Aeschbacher, R.A., M.T. Hauser, K.A. Feldmann, and P.N. Benfey. 1995. The SABRE gene is required for normal cell expansion in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 9 : 330-340
- Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *Bot. Rev.* 33(1) : 1-97.
- Arditti, J. 1968. Germination and growth of orchids on banana fruit tissue and some of its extract. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 36 : 1068-1073.
- Arditti, J., J. A. Jonson, and R. G. Perern. 1982. Culture media which do not require sterilization. *Phalaenopsis* flower stalk node. *Orchid. Rev.* 89 : 49-52
- Arditti, J., J.D. Michaud, and A.P. Oliva. 1981. Seed germination of North American orchids. I Native California and related species of *Calypso*, *Epipactis*, *Goodyera*, and *Plantathera*. *Bot. Gaz.* 142 : 442-453
- Anderson, W.C. 1975. Propagation of *Rhododendron* : Part I, Development of culture medium multiplication of shoots. *Proc. Int'l. Plant Prop. Soc.*, 25, 129.
- Batchelor, S.R. 1981. Orchid culture & Growing media. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 50 : 1318-1324.
- Bellmany, A., F. Vended, and H. Banneret. 1996. Varietal identification in *Cichorium intybus* L, and determination of genetic purity of F<sub>1</sub> hibrid seed samples based on RAPD makers. *Plant Breeding* 115 : 128-132
- Beverly, J.N., R.H. Furneaux, and T.T. Stevenson, 1995. Identification of an agar constituent responsible for hydric control in micropropagation of radiata pine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43, 1.

- Bishop, G.J., K. Harrison, and J.D.G. Jones. 1996. The tomato Dwarf gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrome P450 family. *Plant Cell* 8 : 959-969.
- Bloch, W. 1991. A biochemical Perspective of the polymerase chain reaction. *Biochemistry* 30 : 2735-2747.
- 夫宗休. 1964. 濟州道産 自生植物 目錄(第一報). 韓國藥師會誌 5(2) : 55-59.
- Chen, J. and S. Delaporta. 1993. Urea-based plant DNA miniprep. In : *The Maize Handbook* (Freeling, M. and V. Walbot) 326-627.
- Chen, W. H., T.M. Chen, Y. M. Fu, R.M.Hsi, and W.S.Chen. 1998. Studies on somaclonal variation in *Phalenopsis*. *Plant Cell Reports* 18 : 7-13.
- 崔修玉. 1990. 溫帶産 *Cymbidium*속 種子의 無菌發芽 및 根莖培養에 의한 幼苗의 增殖體系確立과 變異體의 選拔. 慶北大學教 博士學位論文
- 최수옥, 정재동, 김장영. 1987. 동양계 *Cymbidium*속의 급속증식을 위한 배지 개량. 韓園會發表要旨 5(2) : 96-97
- 崔修玉, 鄭載東. 1991. 溫帶系 *Cymbidium*屬 種子의 發芽에 미치는 基本培地 및 前處理方法의 影響. 韓園誌 32(4) : 525-532.
- 崔修玉, 鄭載東. 1993. 溫帶産 *Cymbidium*의 莖頂培養으로부터 根莖形成에 미치는 再要因. 韓國植物組織培養學會誌 20(5) : 247-254.
- 崔修玉, 鄭載東, 李智姬. 1996. 溫帶産 *Cymbidium*의 莖頂培養에 의한 根莖의 形成 및 增殖에 미치는 培地의 效果. 韓國植物組織培養學會誌 23(3) : 167-172
- 최수옥, 정재동, 박재석. 1989. 東洋係 *Cymbidium*속의 生長點培養에 의한 根莖形成 및 植物體 再分化. 韓園會發表要旨 7(1) : 200-201
- 最新園藝大辭典 編集委員會. 1983. 最新 園藝大事典. 第3券 誠文新光. 東京. p 218-230.
- 최지용, 소인섭, 박천호, 광병화. 1998. 韓國春蘭과 다른 *Cymbidium* 간의 交配親和性에 대한 RAPD分析. 韓園科誌 16(3) : 361-363.

- 최종명, 최종진, 정해준, 최종승. 1998. 오리엔탈백합 'Star Gazer'의 분화재배시 uniconazole 處理方法 및 濃度에 따른 生長抑制效果. 韓園誌 39(6) : 776-779
- 최해선, 김경수, 최장경, 이경국, 홍대기, 강원희, 이운수. 1999. Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD)를 이용한 나리 (Lillium)의 品種 區分. 韓園科誌 17(2) : 144-147.
- 全在基, 鄭載東. 1978. 洋蘭 生長點培養에 관한 研究(Ⅲ) 生長調節物質이 Cymbidium 生育에 미치는 影響. 慶北大論文集 24 : 295-303
- 全在基, 鄭載東. 1979. 洋蘭 生長點培養에 관한 研究(Ⅳ) Auxin과 Kinetine의 單用 및 混用處理가 Cymbidium의 生育에 미치는 影響. 慶北大論文集 28 : 269-274
- 全在基, 鄭載東. 1978. 石谷種子の 無菌培養에 관한 研究(Ⅲ) 비타민類, 아미노산 및 果汁이 幼苗의 生長에 미치는 影響. 慶北大論文集 25 : 323-329
- 전홍정. 1993. RAPD 技術을 이용한 호박의 種間 및 品種間 比較分析. 서울 大學校 碩士學位論文. NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY
- 鄭載東. 1979. 風蘭種子の 無菌培養에 관한 研究. 慶北大學校 博士學位論文.
- 鄭載東 全在琪. 1983. 建蘭(*Cymbidium ensifolium*)種子の 無菌培養. (Ⅰ) 基本培地 및 生長調節物質이 Rhizome의 形成과 shoot 發生에 미치는 影響. 韓園誌 24(3) : 236-242
- 鄭載東. 全在琪. 徐正海. 1982. 紫蘭(*Bletilla striata*)種子の 無菌培養에 관한 研究. (Ⅱ) Peptone, sucrose, 한천 濃度 및 培地の pH가 幼苗生長에 미치는 影響. 韓園誌 24(3) : 243-248
- 鄭載東 全在琪, 崔修玉. 1985. 建蘭(*Cymbidium ensifolium*)種子の 無菌培養. (Ⅱ) 培地內 몇 種의 添加物 및 pH, 明또는 暗培養期間이 Rhizome의 生長과 器官分化에 미치는 影響. 韓園誌 26(2) : 186-192
- 鄭載東 全在琪. 金聖洙. 1984. 나도풍란(*Aerides japonicum*)種子の 無菌培養. (Ⅰ) 종자의 발아와 유묘의 생육에 적합한 배지 및 배양조건의 구명. 韓園誌 25(4) : 305-312

- 鄭載東 全在琪. 金聖洙. 1985. 나도풍란(*Aerides japonicum*)種子の 無菌培養. 韓園誌 25(4) : 305-312
- 鄭載東, 全在琪, 沈政洙, 李宗錫. 1985. 寒蘭의 根莖生育에 미치는 各種 添加物質의 影響에 관한 研究. 農振廳 産學協同研究報告書 23
- 정재동, 박윤경, 김홍열, 지선옥, 고재철. 1999. 生長抑制劑處理가 器內의 紫蘭(*Bletilla striata*) 生長에 미치는 影響. 韓園誌 40(4) : 485-488.
- 정재동, 이지희, 지선옥, 김 창길. 1998. 溫帶産 *Cymbidium*속의 莖頂 培養 由來의 根莖으로부터 幼苗 增殖 및 生育에 미치는 培地의 影響. 韓園誌 39(3): 343-349
- 정미영, 정재동, 지선옥. 1998. 새우난초와 해오라비난초 種子の 器內發芽와 幼苗生長에 미치는 培地의 影響. 韓國植物組織培養學會誌 25(3) : 189-194
- Dyson. P.W. 1972. Effect of cycocle(2-chloroethyltrimethyl ammonium chloride) and Alar(N-dimethylaminosuccinamic acid) on the yields of carrots. J. Hort. Sci. 47 : 215-220
- Edwards, K., C. Johnstone, and C.Thompson. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucl.Acids Res. 19(6).1349.
- Ernst, R. 1974. The use of activated charcoal in asymbiotic seedling culture of *Paphiopedilum*. Amer. Orchid. Bull. 43 : 35-38.
- Fridborg, G. and Eriksson, T. 1975. Effects of activated charcoal on growth and morphogenesis in cell culture. Physiol. Plant. 34, 306.
- 福田拓郎. 1968. ツウラン, 칸란의 交配와 無菌播種 In. 圖解 란의 바이오技術. 誠文新光. 東京. pp.84-91.
- Funk, C. and P. Brodelius. 1990. Influence of growth regulator and elicitor on phenyl propanoid metabolism in suspension cultures of *Vanilla planifolia*. Phytochemistry 29 : 845-848
- 韓昶烈. 1973. 蘭. 韓國植物組織培養學會誌. 1(1):40-47

- 韓昶烈. 1982. 植物組織培養, 蘭의 種子無菌과 mericlone 培養. 一潮閣. 68-104
- Hasegawa, A., H.Ohashi and M. Gio. 1985. Effects of BA, rhizome length, mechanical treatment and liquid shaking culture on the shoot formation from rhizome in *Cymbidium faberi* Rolfe. Acta Horticultrae 166 : 25-40.
- Hegarty, C.P. 1995. Observation on the germination of orchid seed. Amer. Orchid Soc. Bull. 24 : 457-464
- 허경옥, 정일광, 한상정. 1998. RAPD를 利用한 韓國産 地方在來種 산달래의 類緣關係分析. 韓園誌 39(3) : 273-277
- Huang, L.C. 1984. Alternative media and method for *Cattleya* propagation by tissue culture. Amer. Orchid. Soc. Bull. 53(2) : 167-170.
- Hu, C.Y. and Wang, P.J. 1983. Meristem, shoot tips and bud culture. In Hand book of plant cell culture. (eds. S. Evans and A. Yamada), pp. 177-227. Macmillan Pub. Co. New York .
- 현명력, 최지용, 서정남, 소인섭, 이종석. 1999. 同位酵素와 RAPD법을 이용한 濟州 自生 새우란, 금새우란, 왕새우란의 近緣關係 分析. 韓園科誌 17(2) : 141-143
- Ichihashi, S. and S. Kako. 1977. Studies on clonal propagation of *Cattleya* through tissue culture method. II. Browning of *Cattleya*. J. Japan Soc. Hort. Sci., 46(3) : 325-330
- Ishii, M. 1980. Studies on the tissue culture *Cattleya* species III. The relationship between seasonal changes of phenolics exudated from pseudobulb tissue and survival rates of explants. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 49(1) : 127-131
- Jaccard, P. 1980. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat. 44 : 223-270.

- Jenczewski, E., Prosperi, J. M. and Ronfort, J. 1999. Differentiation between natural and cultivated populations of *Medicago sativa* (Leguminosae) from Spain: analysis with random amplified polymorphic DNA (RADP) makers and comparison to allozymes. *Molecular Ecology* 8 : 1317-1330
- Jeyanayaghy, S. and A. N. Rao. 1966. Flower and seed development of *Bromheadia finlaysoniana*. *Bull. Torrey. Botan. club.* 93 : 97-103.
- Junghans, H., and M. Metzloff. 1990. A simple and rapid method for the preparation of total plant DNA. *Biotechnique* 8 : 176.
- 加古舞治. 1968. ツウラン種子の発芽に関する研究. In 蘭科植物の種子形成と無菌培養. 鳥潟博高. 誠文新光. 東京. pp 174-237
- 加古舞治. 1976. ラン種子の発芽に関する研究. In 増補. 蘭科植物の種子形成と無菌培養. 鳥潟博高. 誠文新光. 東京. pp 174-237
- Kano, K. 1963. Studies on the media for orchid seed germination. Thesis Kyoto University.
- Kano, K. 1965. Studies on the media for orchid seed germination. *Mem. Fac. Agr. Kagawa Univ.* 20 : 1-68
- 狩野邦雄. 1974. 園藝植物の繁殖への利用. In. 植物組織培養. 朝倉書店. 東京. pp.400-434
- 狩野邦雄. 1976. ラン無菌発芽培養基に関する研究 In 増補. 蘭科植物の種子形成と無菌培養. 誠文新光. 東京. pp.93-152
- 長谷川喜. 今出来光志, 五井正憲. 1984. 東洋系 *Cymbidium* 繁殖に関する研究. *日本園學 秋季發表要旨.* p 360-361
- 康日洙. 1989. 組織培養 技術을 이용한 竹柏蘭의 無菌發芽와 大量繁殖에 관한 研究. 濟州大學校 碩士學位論文.
- Knapp, J. E. and J. M. Chandlee. 1996. RNA/DNA mini-prep from a single sample of orchid tissue. *Biotechniques* 21 : 54-56

- 金叻浩. 1994. 濟州寒蘭의 種子發芽, 幼苗生育 및 同位酵素 特性에 관한 研究. 濟州大學校 博士學位論文.
- 金叻浩, 高泰信. 1994. 濟州寒蘭 種子無菌發芽와 組織培養株 培養基術에 관한 研究 - 濟州寒蘭의 交配組合에 따른 種子の 生理的 特性. 韓園學 發表要誌 12(2) : 348-349
- 金叻浩, 高泰信, 蘇寅燮, 1996. 濟州寒蘭의 交配組合別 種子稔實率 및 培地種類에 따른 根莖形成 程度. 韓園誌 37(1) : 152-157
- 金哲洙. 1986. NAA 및 BA처리가 *Cymbidium kanran* Makino의 shoot와 rhizom 生長에 미치는 明暗 및 生長調節制의 效果. 濟州大學校 碩士學位論文
- 金美先, 李永蘭, 元濟洋, 金在永, 金炳鉉, 殷種旋. 1998. 授粉後 經過日數 및 培地가 심비디움 交配組合의 無菌發芽에 미치는 影響. 韓園科誌 16(2) : 236-238
- 김완순, 이해은, 이정식, 송정섭. 1998. RAPD를 이용한 섬초롱꽃의 種內 變異探索. 韓園誌 39(3) : 367-370
- 金永鎮, 洪永杓, 朴良鄉, 鄭舜京, 金宣永. 1988. 組織培養에 의한 寒蘭 大量 生産에 관한 研究. 農振廳 農試論文集(園藝篇). 30(3) : 77-82
- 金一中, 李宗錫, 廉道義, 盧承文. 1979. 自生蘭科植物의 開發과 園藝花에 따른 繁殖法 確立에 관하여. 1. 野生蘭의 開發과 繁殖. 韓園誌. 20(1) : 94-105
- Kim, H. Y. 1995. Effect of uniconazole treatment on the growth and flowering of *Fuchsia hybrida* 'Corallina'. Acta Hort. 394 : 331-335.
- 金弘烈. 1998. Uniconazole 處理가 심비디움의 生育 및 開花에 미치는 影響. 韓園科誌 16(1) : 40-41
- 金弘烈. 1999. Uniconazole 處理가 심비디움 Pine Clash'Moon Venus'와 Green Sour'A One'의 生長 및 開花에 미치는 影響. 韓園科誌. 17(3) : 344-345
- Kim, H.Y. Abe, H. Watanabe, and Y. Suzuki. 1989. Changes in flower bud development of *Zinnia elegance* Jacq, as influenced by the growth retardant S-07. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64 : 81-89.

- Kim, H.Y. and H. Watanabe, and Y. Suzuki, 1992. Effect of growth retardant uniconazol on the floret formation of *Zinnia elegance* Jacq. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 61 : 603-608.
- Kim, H.Y. and Y. Suzuki, 1989. Changes in assimilated <sup>13</sup>C distribution and soluble acid invertase activity of *Zinnia elegance* induced by uniconazol, an inhibitor of gibberllin biosynthesis. Plant Physiol. 90 : 316-321.
- Knudson, L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seed. Bot. Gaz. 73 : 1-25.
- Knudson, L. 1924. Further observations on nonsymbiotic germination of orchid seed. Bot.Gaz. 77 : 212-219.
- Knudson, L. 1925. Physiological study of the symbiotic germination of orchid seed. Bot.Gaz. 79 : 345-379
- Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. Amer. Orchid. Soc. Bull. 15 : 214-217
- Knudson, L. 1951. Nutrient solution for orchids. Bot. Gas. 112 : 528-532
- 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.
- Ko, M. K., J. Yang, Y.H. Jin, C.H. Lee, and B.J. Oh. 1998. Genetic relationships of *Viola* species evaluated by random amplified polymorphic DNA analysis. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 73 : 601-605.
- 高泰信. 1987. 흑난초(*Bulbophyllum inconspicuam*) 種子の 無菌發芽와 幼苗의 器內培養에 관한 研究. 濟州大學校 碩士學位論文

- Kusumoto, M. 1979. Effects of combinations of growth regulators, and of organic supplements on the growth of *Cattleya* plantlets cultured *in vitro*. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 47(4) : 492-501.
- Kusumoto, M. 1979. Effects of combinations of growth regulators, and of organic supplements on the proliferation and organogenesis of *Cattleya* protocorm like bodies cultured *in vitro*. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 47(4) : 502-510.
- 경윤정, 윤미정, 박천호, 2000. RAPD를 이용한 *Bletilla striata*의 遺傳的 多型性 分析. 韓園科誌 18(2) : 103-106
- Larson, R. A. 1980. Introduction to floriculture. Academic Press. New York. P 133-164
- Larson, R. A. 1985. Growth regulators in floriculture. Hort. Rev. 7 : 339-481
- 이관호, 백기엽, 1996. 東洋蘭 雜種 根莖의 器內 增殖 培養條件, 韓國 育種學會誌 28(2) : 109-115
- 李宗錫, 1982. 韓國自生寒蘭의 特性, 生育環境 및 繁殖에 관한 研究. 高麗大學校 博士學位論文. 145
- 李宗錫, 1986. 濟州寒蘭(*Cymbidium kanran*)의 器官繁殖. 韓國科學技術處 報告書 175-196
- 李宗錫, 1988. 東洋系 *Cymbidium*屬 種間雜種植物의 根莖培養에 관한 研究. 濟州大 亞農研 5 : 49-59
- 李宗錫, 1988. 玉花蘭(東洋系)根莖의 組織培養時 生育과 分化에 미치는 NAA, BA, 溫度處理의 影響. 濟州大 論文集(自然科學篇) 27 : 21-27
- 李宗錫, 1989. 寒蘭의 根莖培養을 위한 效果的인 培地開發, 韓園誌 30(4) : 303-310
- 李宗錫, 1990. 寒蘭組織培養苗의 繼代培養을 위한 效果的인 培地의 開發. 韓園誌 31(3) : 276-283

- 李宗錫. 1991. Albino type 寒蘭의 根莖培養시 植物體 分化에 미치는 BA 및 NAA의 영향. 韓園會發表要誌 9(2)
- 李宗錫, 郭炳華, 李炳基, 鄭載東. 1984. 韓國의 自生寒蘭에 관한 研究. I. 寒蘭의 根莖培養에 관하여. 韓園誌 25(2) : 129-135
- 이종석, 김두연, 이정민. 1998. 줄무늬 변이종 비아란의 分化에 미치는 培地 條件 및 生長調節物質의 影響. 韓園科誌 16(3) p 202
- 李宗錫, 蘇寅燮, 鄭載東. 1985. 寒蘭의 根莖培養에 미치는 各種 添加物質의 影響에 관한 研究. 農振廳 産學協同研究報告書 '85-19. pp1-23
- 李宗錫, 이정민, 소인섭, 강경원. 1999. 韓國自生 지네발란(*Sarcanthus scolopendrifolius*)의 器內培養時 生育에 미치는 培地와 生長調節物質의 影響. 韓園誌 40(6) : 742-746
- 李貞植, 沈慶九. 1986. 濟州道寒蘭 急速增殖 및 蘭類 組織培養 技術向上에 관한 研究. 太平洋文化財團報告書. 4 : 302-312
- 李貞植, 沈慶九, 柳美先, 李宗錫, 金永鎭. 1986. 寒蘭(*Cymbidium kanran*) 無菌培養에 있어서 rhizome의 增殖과 器官形成에 관한 研究. 韓園誌. 27(2) : 174-180
- Lu, Z-X., G.L. Eighard, W.L. Baird, A.G. Abbot, and S. Rajapakse. 1996. Identification of peach rootstock cultivars by RAPD markers. HortScience 31 : 127-129.
- Miyoshi, K. and M. Mii. 1988. Ultrasomic treatment for enhancing seed germination of terrestrial orchid, *Calanthe discolor*, in Asymbiotic Culture. Scientia Horticulturae 35 :1 27-130.
- Morel, G.M. 1960. Producing virus-free cymbidium. Amer. Orchid Soc. Bull. 29 : 495-497
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plantarum. 15 : 473-479.

- Oliva, A. P., J. Arditti. 1984. Seed germination of north American orchids. II. Native California and related species of *Aplectrum*, *Cypripedium* and *Spiranthes*. Bot. Gaz. 145(4) : 495-501
- 長島時子. 1982. ツウラン及びハライオヘテイラーの種子形成. ならびに種子發芽について. 日本園雜 54(1) : 94-105.
- Niemann, D. 1980. Plantlet formation on *Phaphiopedilum* flower stem. Amer. Orchid Soc. Bull. 49(4) : 372-373
- Pages, P. D. 1971. Banana homogenate, coconut water, peptone and auxins as nutrient supplements in the *in vitro* culture of *Dendrobium* and *Phalaenopsis* ovules. Graduate faculty of the Coll. of Agr. Univ. of Phillipines, Degree of Phd.
- 朴春培, 蘇寅燮. 1989. 韓國 自生春蘭(*Cymbidium virescens*)의 組織培養技術開發에 관한 研究. 濟州大 亞農研 6 : 31-40
- 白基燁, 沈杰補. 1987. 溫帶産 *Cymbidium*의 種子 無菌發芽와 形成된 rhizome으로부터 植物體 形成. 韓園誌 28(2) : 185-193
- 白基燁, 安成容, 沈杰補. 1990. 東洋蘭의 開發과 微細繁殖體系確立 III. 培養한 rhizome의 polyphenol 含量, 器官形成의 解剖學的 觀察 및 同位酵素檢定. 韓園誌 31(3) : 263-275
- 白基燁, 沈杰補, 金正株. 1989. 東洋蘭種子の 無菌發芽와 培地 및 生長調節劑가 器官分化에 미치는 影響. 韓園會發表要誌 7(1) : 190-191
- 坂本立彌. 1985. 圖解實技コーナー 繁殖法. VIII. 人工實生法. 盆栽世界 3 月號 增刊 No. 11 新企劃出版局. 34-37. Tokyo, Japan
- Reed, K.C. and D.A.Mann. 1985. Rapid transefer of DNA from agarose gels to nylon membranes. Nucleic Acids Res. 13 : 7207-7221.
- Reid, J.B. 1993. Plant hormone mutants. Plant Growth Regul. 12 : 207-226.
- Rolfe, F.J. 1992. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 1.70. Exeter Software, Setauker, New York, USA.

- Sakurai, A. and S. Fujioka. 1993. The current status of physiology and biochemistry of brassinosteroids. *Plant Growth Regul.* 13 : 147-159.
- Sharma, S.K., I.K. Dawson, and R. Waugh. 1995. Relationships among cultivated and wild lentils revealed by RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 91 : 647-654.
- Sideris, C. P. 1950. A Nutrient solution for germination of orchid seeds. *Bull. Pac. Orch. Soc. Hawaii.* 8(4) : 337-339
- Sneath, J.I. and R.R. Sokal, 1973. Numerical taxanomy. The principles and practice of numerical classification. W. H. Freedom and Company, San Francisco, USA.
- 蘇寅燮. 1985. Virus 無病株 生産을 위한 안개초의 生長點培養에 관한 研究. *濟州大 亞農研* 2 : 141-147
- 蘇寅燮, 李宗錫. 1985. 組織培養技術을 이용한 春蘭의 無菌發芽와 大量繁殖에 관한 研究. *韓園誌* 26(4) : 375-380
- Stevnson, J. H. and R.E. Harris. 1984. Practices and problems. P.337 In: George, E.F. and P.D. Sherrington (eds). *Plant propagation by tissue culture*. Exegetics Limited England.
- Stiles, J.I., C. Lemme, S. Sondur, M.B. Morshidi, and R. Manshad. 1993. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 85 : 697-701.
- 薛鍾湖, 洪庭, 高正恩, 朴天虎, 郭炳華. 1997. *Codiaeum Variegatum* 'Yellow Jade'의 반엽형성에 미치는 광도와 uniconazole 및 Gibberellin의 효과. *韓園誌* 38 : 278-282
- Swain, T. and W. E. Hillis. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. 1. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* 10 : 63.
- 鳥潟博高. 1976. 增補 蘭科植物の種子形成と無菌培養.. 誠文新光. 東京. p324

- Torres, A.M., T. Millan, and J.I. Cubero. 1993. Identifying rose cultivars using random amplified polymorphic DNA makers. *HortScience* 28 : 333-334
- 上田 博. 1985. 東洋系 シンビジウムの 無菌培養. In 増補. / 園藝植物の 器官と組織の培養. 誠文新光. 東京. pp296-312.
- 上田 博, 烏潟博高. 1969. *Cymbidium* 生長點培養における器官形成. (第2報) - 暗培養における生長物質の與える影響について. *日園學雜* 38 : 78-83
- Vacin, E. F. 1950. a. Some problems of germinating *Cymbidium* seeds and growing seedling. *Cymbidium Soc. News.* 5(2) : 8
- Vacin, E. F. 1950. b. Behavior of nutrient solutions used in the asymbiotic germination of orchid seeds. *Bull. Pac. Orch. Soc. Hawaii.* 8(3) : 285-288.
- Vacin, E. and F. Went. 1949. Some pH changes on nutrient solution. *Bot. Gaz.* 110 : 605-613.
- 澤完. 1962. ランの種子の發芽及び實生の生育に関する研究. 名古屋農學研究科 修士論文
- Welsh, J. and M. Mclelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Research* 18 : 7213-7218.
- Wilkie, S.E., P.G. Isaac, and R.J. Slater. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theoretical and Applied Genetics* 86 : 497-504.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18 : 6531-6535.
- Williams, J.G.K., M.K. Homafey., J.A. Rafalski. and S.V. Tingey. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Res.* 13 : 704-740

- Wilson, J.K. 1915. Calcium hypochlorite as a seed sterilizer. Amer. Jour. Bot. 2 : 420-427
- Yamagishi, M. 1995. Detection of section specific random amplified polymorphic DNA(RAPD) makers in Liliium. Theor Appl. Genet. 91 : 800-835.
- Yang, X. and C. Quiros. 1993. Identification and classification of celery cultivars with RAPD makers. The or. Appl. Genet. 86 : 205-212.
- 芮秉佑. 1994. RAPD를 이용한 사과와 품종분류와 품종 判別標識의 選拔. 서울大學校 博士學位論文.
- 유기억, 이우천, 김남수, 김종하, 임학태. 1996. RAPD방법에 의한 금강초롱꽃(*Hanabusaya asiatica*)과 近緣分類群의 比較研究. 韓園誌 37(4) : 324-328



## 감사의 글

먼저, 언제나 애정을 가지고 지켜보면서 오늘의 여기에 있게 하여 주신 소인섭 지도교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 그리고 대학교 신입생부터 지도하여 주시고 논문심사를 하여 주신 서울여대 이종석 교수님께도 진심으로 감사드리오며, 바쁘신 가운데도 세심하게 논문을 바로 잡아 주신 장전익 교수님, 강 훈 교수님, 김광호 박사님께 감사드립니다. 그리고 대학시절부터 지금까지 열정적으로 학문의 가르침을 주시고 많은 조언을 하여주신 한혜룡 교수님, 백자훈 교수님, 문두길 교수님, 박용봉 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

또한, 10년이상 소요된 본 연구를 위하여 여건을 마련하여 주신 전 제주농업시험장 송창훈 장장님, 한국농업전문학교 고일용 학교장님, 제주도농업기술원 김영휘 원장님, 전 농업기술원 한동휴 원장님, 목포 시험장 오용비 장장님, 감귤시험장 정순경 장장님, 그리고 원예작물과 문정수 과장님께도 감사드립니다.

논문이 완성되기까지 시험에 많은 도움을 주신 오병준 박사님, 최지용 박사님, 농업과학기술원 김종범 박사님, 원예연구소 윤무경 연구사님, 성문석, 김정선, 김성룡, 박영철 연구사님, 그리고 논문작성및 원고수정에 도움을 주신 제주대학교 송일상 교수님, 농업기술원 김기택 박사님, 조은숙, 양상호, 김용덕 연구사님, 또한 농업기술원에 근무하는 모든 직원여러분께도 감사드립니다.

끝으로 지금까지 걱정과 아낌없는 사랑으로 키워주신 부모님과 큰형님, 작은형님 내외분, 두 동생과 매제, 처형, 처남 내외분, 그리고 항상 옆에서 사랑으로 내조하여 만학을 할 수 있도록 끝까지 힘이 되어준 아내 김정화와 사랑하는 아들 혁준이, 용욱이, 그리고 친지들 모두와 이 기쁨을 함께 나누고자 하며, 하늘에 계신 조부모님께 이 소서를 드립니다.