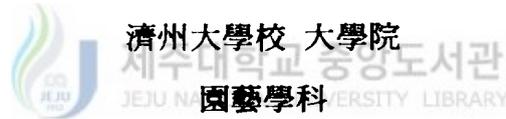


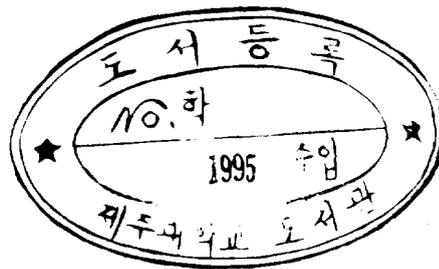
博士學位論文

濟州寒蘭의 種子發芽, 幼苗生育 및
同位酵素 特性에 關한 研究

Studies on Asymbiotic Germination, Plantlet Growth and
Isozyme Variations in Cheju *Cymbidium kanran*



金 耿 浩



1994 年 12 月

濟州寒蘭의 種子發芽, 幼苗生育 및 同位酵素 特性에 關한 研究

指導教授 蘇 寅 燮

金 吹 浩

이 論文을 農學博士 學位論文으로 提出함

1994 年 12 月

金吹浩의 農學博士 學位論文을 認准함



JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

審査委員長 _____
委 員 _____
委 員 _____
委 員 _____
委 員 _____

濟州大學校 大學院

1994 年 12 月

Studies on Asymbiotic Germination, Plantlet Growth and
Isozyme Variations in Cheju *Cymbidium kanran*

Kim, Kwang Ho

(supervised by professor So, In Sup)

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

DEPARTMENT OF HORTICULTURE
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1994. 12.

目 次

Summary

I. 緒 言

II. 研究史

III. 材料 및 方法

1. 寒蘭의 種子發芽와 幼苗生育

1-1. 交配組合에 따른 發芽 特性

1-2. 種子의 無菌發芽

1-3. Shoot 分化와 幼苗生育

1-4. 組織培養 寒蘭의 栽培

2. 寒蘭의 同位酵素 分析

2-1. 濟州自生 寒蘭의 peroxidase 同位酵素 分析과 類緣關係 檢討

2-2. 種子培養 寒蘭의 peroxidase 同位酵素 分析

2-3. 寒蘭과 溫帶産 *Cymbidium* 交雜種의 數種 同位酵素 分析

IV. 結果 및 考察

1. 寒蘭의 種子發芽와 幼苗生育

1-1. 交配組合에 따른 發芽 特性

1-1-1. 種子形成과 稔性

1-1-2. 種子 發芽能力

1-2. 種子의 無菌發芽

1-2-1. 培地의 種類

1-2-2. 明暗培養

1-3. Shoot 分化와 幼苗 生育

1-3-1. 分化培地

1-3-2. 置床切片 部位

1-4. 組織培養 寒蘭의 栽培

1-4-1. 組織培養苗의 硬化用土

1-4-2. 花盆栽培用 盆土

1-4-3. 自生地 栽培

2. 寒蘭의 同位酵素 特性

2-1. 濟州自生 寒蘭의 peroxidase 多形과 類緣關係

2-1-1. Peroxidase 多形

2-1-2. 類緣關係

2-2. 種子培養 寒蘭의 peroxidase 多形

2-2-1. 自家受粉 種子

2-2-2. 他家受粉 種子

2-3. 寒蘭과 溫帶産 *Cymbidium* 交雜種의 生育 및 同位酵素 多形

2-3-1. 寒蘭과 春蘭 交雜種

2-3-2. 寒蘭과 竹栢蘭 交雜種

2-3-3. 寒蘭과 觀音素心 交雜種

V. 綜合考察

VI. 摘 要

VII. 引用文獻

濟州寒蘭의 種子發芽, 幼苗生育 및 同位酵素 特性에 關한 研究

金 晔 浩
(濟州大學校 大學院)

Studies on Asymbiotic Germination, Plantlet Growth and
Isozyme Variations in Cheju *Cymbidium kanran*

Kim, Kwang Ho
(Graduate School, Cheju National University)



Summary

The experiments were carried out to establish production technique of tissue culture plant through asymbiotic germination and to analyze isozyme variations extracted from the natural habitat and cultured *in vitro* of Cheju *Cymbidium kanran*.

1. Studies on asymbiotic germination and plantlet growth

1-1. The pod formation rate of Cheju *Cymbidium kanran* was 75.0% for the self-pollinated flowers and 66.7% for the cross-pollinated flowers. The fertility rate of the seed from self-pollinated flowers was 66.7% and 80.0% for the cross-pollinated flowers.

1-2. Seeds from cross-pollinated flowers took 106 (59~174) days and

those from self-pollination took 164 (68~329) days for germination.

1-3. The rhizome formation under asymbiotic germination conditions after sowing of Cheju *Cymbidium kanran* required 12 to 32 months and greatly varied depending on the kind of medium used and the culture environment. Murashige and Skoog medium was the best. Rhizome formation (0.5cm length) required about 12 months after sowing.

1-4. With regard to light and dark requirement for rhizome formation, dark culture in Murashige and Skoog liquid medium without adding agar was optimal. The rhizome formation rate under this condition was about 40%.

1-5. *In vitro* shoot proliferation from rhizome culture was increased in a medium containing 5g/l hyponex, 2g/l peptone and 100mg/l rutin. When a rhizome (2.0cm length) was cultured in the above medium, shoot regeneration began after 2 months and plantlet of 3cm in height were obtained in 5 months. The shoot regeneration rate was 94%.

1-6. The tip segment of the rhizome was the most effective in plantlets production *in vitro*. The optimal number of rhizome segments in 200ml flask was 7.

1-7. For the hardening of *in vitro* derived plantlets, sphagnum moss, Cheju-scoria (tuff gravel) or bark were the most suitable media. In these media plant survival rate was highest. New roots developed extensively after transplanting into pots with Cheju-scoria or bark.

1-8. When hardened plantlets (10cm high) were transplanted into pots, the mixed culture medium of Cheju-scoria and bark (1:1) or leaf mold were better for plant growth over a 3 years period.

1-9. The survival rate for hardened plantlets of *Cymbidium kanran* after transplantation in natural habitat was about 68% for Sundol (located 490m above sea level on Mt. Halla). The number of shoot was

increased by 1.3. Two years after transplanting plant height however, was not increased.

2. Studies on isozyme variations in *Cymbidium kanran*

2-1. Isozyme peroxidase (PX) from Cheju *Cymbidium kanran* revealed 7 bands by isoelectric focusing. The 45 experimental plants resulted in a total of 18 groups.

2-2. Genetic distance values by calculation of Nei's F-statistics are the highest (86%) for PX-b·c·e band type and PX-b·c·e·f band type. The lowest value (18%) was found for PX-f band type and PX-d band type.

2-3. PX band pattern of self-pollinated *Cymbidium kanran* with asymbiotic germination was constant in the progeny as well as in its female parent plant.

2-4. The PX band pattern of plants resulting from cross-pollination was also observed in the bands of both parent plants.

2-5. The plants regenerated *in vitro* from the rhizome of the hybrid between Cheju *Cymbidium kanran* as a female donor and temperate *Cymbidium* (*C. goeringii*, *C. lancifolium*, *C. gyikuchin* var. *sosin*) as a male showed the characteristics of female or male parent, or the intermediate of both parents depending on the traits.

2-6. AcPH, esterase, MDH, ME and PX isozyme patterns were observed and could be used as a marker for genetic analysis in the isozyme testing.

I. 緒 言

寒蘭 (*Cymbidium kanran*)은 韓國, 日本, 中國, 臺灣 등지의 동북 아시아 지역에 분포되고 있으며, 花色이 우아하고 향기가 그윽하여 예로부터 東洋人들에게 애호되어 왔으며, 濟州寒蘭 (*Cheju Cymbidium kanran*)은 漢拏山에 自生되고 있는 寒蘭과 濟州地域에서 채취되어 재배되고 있는 寒蘭을 일컫으며, 그 自生地는 漢拏山을 동서로 가르는 능선의 남쪽 경사면에만 분포되어 있는데, 행정구역상으로는 西歸浦市 일원과 南濟州郡 지역이며, 분포 高度範圍는 대부분 海拔 300~600m 사이에 위치해 있고⁵⁶⁾, 1967년에 天然紀念物 제191호로 지정 보호되고 있으며, 自生地 이외의 반출이 금지되어 있는 식물이다.

蘭의 번식은 營養繁殖 (分株, 退籤의 再生)이 행하여 지고 있으나, 多量繁殖을 목적으로 種子繁殖이나, 莖頂培養의 방법이 제시되고 있다. 寒蘭을 포함한 溫帶産 *Cymbidium*에 속하는 대부분의 種은 種子播種을 하게 되면 根莖 (rhizome)을 형성하게 되므로 이 根莖으로부터 幼植物體를 형성시켜야 하는 어려움이 있다.⁷⁾ 그래서 최초로 형성된 根莖을 빠른 시일내에 大量增殖시킬 수 있는 방법 및 이 根莖으로부터 幼苗를 능률적으로 증식시킬 수 있는 방법과 組織培養 寒蘭의 실용적인 재배기술이 개발되어야만 수요에 충족할 수 있고 다수의 소비자가 培養寒蘭을 관상할 수 있을 것이다. 그러나 아직까지 寒蘭의 種子培養에 의한 幼苗 增殖方法과 組織培養 寒蘭의 실용적인 재배기술 체계화가 미흡하여 이에 관한 체계적인 연구가 필요하다 하겠다.

蘭種子是 受粉시킨 다음 6개월이 경과하면 발아할 수 있는 능력을 가지게 되고 8~10개월이 지나면 완전히 성숙하는데 種子是 매우 미세하여 受精卵이 수백개의 細胞로 된 未熟胚가 한층의 細胞로 된 種皮에 쌓여 있는 不完全胚와 胚乳만 있거나 胚乳가 전혀 없는 경우도 있다. 이와 같은 種子의 특성때문에 蘭菌과 공생에 의해서만 발아가 가능하므로 자연상태에서는 발아율이 대단히 낮다.⁵⁶⁾ 1922年 Knudson에 의해 人工培地가 개발되어 蘭種

子の 人工發芽가 가능해졌으나 蘭種子는 種皮의 透過性不良, 發芽抑制物質의 존재, 胚의 활력 감퇴, 胚內의 發芽促進 物質의 부족 등의 원인에 의해 발아하기 어렵고 發芽 所要日數도 길다.⁷⁾ 寒蘭도 역시 파종 후 발아하기까지의 기간이 빠르지는 수개월이 소요되며 늦은 경우에는 수년이 걸려서 발아하는 일도 있다. 種子가 발아하게 되면 일단 根莖化되어서 자라고 어느 정도 자란 다음에는 根莖의 끝부분에서 새순을 발생시킨다. 培養容器속에서 꺼낸 寒蘭 幼苗는 외부환경에 적응시켜 自然產 幼苗처럼 재배관리하게 되는데 꽃피우기까지는 보통 4~5년이 소요된다. 이와 같이 寒蘭은 種子發芽에서 開花始까지 장기간이 소요되는데 發芽 效率 增大, 幼苗의 硬化, 開花까지의 실용적 花盆栽培 기술이 지금까지 만족한 결과를 얻지 못하고 있어 더 많은 연구가 이루어져야 하겠다.⁵⁷⁾

寒蘭은 1902年 日本의 牧野에 의해 처음으로 보고⁶⁾된 식물로 식물학적으로는 紅寒蘭 (*Cymbidium kanran* forma *rubescens* Makino), 紫寒蘭 (*Cymbidium kanran* forma *purpurascens* Makino), 靑寒蘭 (*Cymbidium kanran* forma *viridescens* Makino), 更紗寒蘭 (*Cymbidium kanran* forma *purpureo-viridescens* Makino), 大葉寒蘭 (*Cymbidium kanran* Makino var. *latifolium* Makino) 等으로 분류가 된 이래 원예적 품종에 관한 기록^{19,33,34,69)}이 많이 있으며, 우리나라의 自生寒蘭에 대한 원예적인 특징을 구분하여 50품종이 命名⁴⁹⁾ 보고되었으나, 이들에 대한 生化學的 특성에 의한 분류가 미흡한 실정이다.

蛋白質 電氣泳動方法은 식물의 種間이나 屬間의 遺傳的 類緣關係를구명하려는 연구^{61,71,82)}에 이용되고 있으며, 種의 기원을 밝히는 데 중요한 수단이 되고 있다. 벼^{71,82)}를 비롯한 밀^{9,91)}, 감귤^{14,15,67)}, 사과⁶¹⁾, 토마토⁹⁵⁾ 등일반작물의 경우에는 種 및 품종을 구분하는 수단으로서 蛋白質이나 同位酵素의 多形을 비교분석하여 形態學的 분류의 단점을 보완하고자 시도되고 있으며, 蘭類에 대해서는 우리나라에서 自生하는 溫帶產 *Cymbidium* 屬 식물인 春蘭²⁾의 種에 따른 總蛋白質과 同位酵素 多形의 차이점과 東洋蘭⁷⁹⁾에서몇몇 同位酵素의 分析 결과가 보고되었다. 그러나 寒蘭에 있어서 同位酵素를 遺

傳標識로 이용하기 위해서는 더 많은 연구가 요구되고 있다.

따라서 본 연구는 濟州寒蘭 組織培養苗의 産業的 多量生産技法과 培養苗의 栽培法을 확립하기 위하여 交配組合에 따른 發芽特性, 種子の 無菌發芽條件, shoot 分化條件, 組織培養苗의 硬化用土와 花盆栽培用 盆土 등을 검토하였으며, 더불어 濟州寒蘭의 品種育成時 이용할 수 있는 遺傳標識를 탐색하기 위하여 濟州自生 寒蘭과 種子培養 寒蘭의 peroxidase 多形과 寒蘭과 몇가지 溫帶産 *Cymbidium* 交雜種의 生育 및 數種의 同位酵素 多形을 분석하였다.



II. 研究史

植物組織培養은 1902년 Haberlandt²⁰⁾에 의해서 시도되었고 Gautheret¹⁸⁾와 White¹⁰³⁾ 등에 의해 최초로 성공하였다. 그 이후 培養기술의 보급과 발전이 급진적으로 이루어졌는데 1948년 Caplin 와 Steward⁵⁾에 의한 코코넛乳의 이용, 1957년 Skoog 와 Miller³²⁾에 의한 hormone 水準比에 따른 모델시 스템의 확립, 1961年 Miller⁶⁵⁾에 의한 内生 cytokinin類인 zeatin이 발견되어 組織培養의 발전에 큰 공헌을 하였으며, 특히 1960년대초 Wimber¹⁰⁶⁾와 Morel⁶⁶⁾에 의해서 蘭의 生長點 培養에 의한 幼苗의 急速增殖이 가능케 됨에 따라서 組織培養의 산업화에 일대 전환기를 마련하게 되었다.

蘭科 식물은 單子葉植物中에서 가장 진화된 식물일뿐만 아니라 가장 많은 種을 가지고 있으며¹¹⁾, 세계적으로 약 650屬에 2~3萬種이나 존재하고 새로운 屬이나 種이 계속적으로 알려지고 있다.⁴⁷⁾ 이들 중 *Cymbidium*屬은 약 70여種이나 되고, 이들의 자생지는 열대 및 아열대지역이 대부분이며 온대 지방인 우리나라, 日本 및 中國에도 몇몇 種이 자생하고 있다. 형태적으로 보아 온대산 *Cymbidium*은 열대산 *Cymbidium*에 비해 잎이나 꽃이 작고, 花色이나 花形이 다양하지는 않지만 고유의 독특한 향기 및 잎모양을 가지고 있는 것이 많아 예로부터 동양인들에게 애호되어 왔으나 생장이 매우 더디고 번식이 어려워 손쉽게 구하여 재배하기가 어려운 植物이다.⁸⁰⁾ 東洋蘭의 대표적인 屬으로는 *Cymbidium*을 들 수 있는데 이들 중 寒蘭, 春蘭은 기원전(BC 551~479)에 이미 中國에서 孔子가 蘭에 관하여 언급한 기록이 있으며,⁴⁵⁾ 우리나라에서도 高麗시대에 李仁老나 李圭報 등에 의하여 蘭에 대해 언급한 기록들이 있을 정도로 동양인에게는 귀한 觀賞植物로 취급되어 왔고, 오늘날에도 寒蘭을 애호하는 사람들이 많아져 수요가 급증하고 있는 실정이다.⁵²⁾

온대산 *Cymbidium*의 번식은 열대산 *Cymbidium*처럼 生長點 培養을 해야 하나 生長點을 채취하는데는 어려움이 있고 또한 열대산 *Cymbidium*에서

처럼 體細胞胚의 일종인 protocorm이 형성되는 것이 아니고 rhizome化 되며 여기에서 shoot의 발생을 유도하여야 하는 어려움이 있다. 또 온대산 *Cymbidium*에 비해 품종수가 극히 제한되어 있는데 이는 交雜에 의해 종자형성이 잘 안되거나 종자가 형성되더라도 人工栽培에서 發芽率이 극히 저조하며, 發芽된 種子에서 rhizome이 형성된 후 植物體 分化가 잘 되지 않기 때문에 新品種 육성³⁵⁾이나 大量繁殖에 장애요인으로 작용하고 있다. 지금까지 온대산 *Cymbidium*의 組織培養^{29,39,46,57,78,86)}에 관해서는 자료가 비좁을 뿐만 아니라, 또 연구자에 따라 결과에 다소 차이가 있기 때문에 組織培養 기술을 이용한 寒蘭의 大量繁殖 체계의 확립에 대한 더 많은 연구가 필요하다고 하겠다.

蘭의 種子는 극히 미숙한 胚가 얇은 種皮에 쌓여 있는데 胚乳가 없어 자력으로서는 발아가 안되며, 蘭과 共生하는 mycorrhiza가 종자에 침입함으로써 胚가 발아하게 되어 原塊體가 생기는데 原塊體에는 털이 많이 나서 수분과 영양분을 흡수한다. 이와 같이 蘭菌은 蘭의 胚發生과 幼苗의 生長에 필요한 것이지만 蘭의 어느 부위에나 있는 것이 아니고 주로 뿌리나 葉綠素가 없는 根莖內外부에 있다. 그러기 때문에 蘭의 種子在 바람에 의해 전파될 때 낙하한 곳에 蘭菌이 존재하는 기회는 극히 드물다. 그러므로 蘭은 2~3萬의 種으로 나누어져 있지만 한 種의 개체수는 극히 적어서 희귀한 것도 이런 특이한 繁殖樣式 때문일 것이라고 보고되었다.²³⁾

白等⁸¹⁾은 온대산 *Cymbidium*인 寒蘭 (*C. kanran*), 大明蘭 (*C. hosai* var. *hakuran*), 素心 (*C. gykuchin*), 臺灣春蘭 (*C. formosanum*), 中國春蘭 (*C. forrestii*) 및 韓國春蘭 (*C. georingii*) 등의 自家 혹은 他家受粉 種子 크기는 種이나 品種에 따라 差異가 심한데, 길이는 1.0~1.7mm, 幅은 0.15~0.25mm 범위이며, 發芽所要日數도 119~453日 걸리는데, 이는 種이나 交雜 유무에 따라 차이가 심했고 胚가 형성되지 않거나 1個의 種子에서 2個의 胚가 형성되는 것도 관찰되었다고 보고하였으나 寒蘭과 寒蘭간에 交配組合에 따른 種子 形成率과 稔性比率 등이 조사 보고된 결과가 없기 때문에 새로운 品種 育成을 위한 과정으로써의 寒蘭種子 發芽의 生理的 특성에 관한 연구가 필요하다 하겠다.

蘭은 먼저 같이 작은 種子를 무한히 비산시키지만 이것은 거의 발아가 안 되고, 또 인위적으로 조성된 床土에 파종해도 발아가 불량하여 종자의 인공 발아에 대한 여타의 성공사례가 없었다가 1899年 佛蘭西 Bernard가 蘭의 種子는 mycorrhiza와 공생하고 발아에는 蘭菌의 존재가 필요하다는 것을 보고 하였고, 1922年美國 Cornell대학의 식물생리학 교수였던 Knudson이 蘭의 種子發芽에는 蘭菌의 존재없이도 몇 종류의 無機鹽類와 蔗糖만으로도 발아된다는 소위 種子의 無菌發芽法 (asymbiotic germination)을 보고²³⁾하였고 1946年 Knudson^{40,41)}이 無機鹽類와 糖을 넣은 寒天 培地를 만들어 무균발아를 시도하여 Knudson C 培地를 개발하여 열대란의 거의 모든 종자가 발아할 수 있게 된 이래 지금까지 蘭種子 발아를 위한 배지로 사용되고 있다. 그 후 Vacin과 Went⁹⁹⁾와 Murashige와 Skoog (MS)⁶⁸⁾도 蘭種子 발아에 유효한 培地를 개발하였는데, MS 培地는 蘭種子 발아뿐만 아니라 모든 식물 조직배양에 널리 이용되고 있다. Kano³⁵⁾는 복합비료인 Hyponex를 첨가하여 지금까지 無機鹽類를 첨가한 培地에 비하여 간편하면서도 효과적인 배지를 개발하였다.

은대계 *Cymbidium*屬의 종자발아에 관한 다수의 보고^{7,16,29,36,44,57,70,81)}가 있는데 鳥瀉¹³⁾ 및 Kano³⁵⁾는 春蘭 (*C. goeringii*)의 종자무균 발아방법을 찾아 내었으며, 鄭과 全^{29,31)}은 建蘭 (*C. ensifolium*)의 種子를 Hyponex 培地에 peptone 4g/l 을 첨가한 培地에 파종했을 때 발아가 양호하다고 하였으며 특히 寒蘭 種子發芽에 있어서는 Kokubu 等⁴⁴⁾은 MS 培地를, 加古¹⁶⁾는 Tsuchiyua 와 Nitsch micro-element 培地를, 長島⁷⁰⁾는 Hyponex 培地를 사용하였으며, 국내에서도 白 等⁸⁰⁾은 KyotoII 培地, 崔⁷⁾는 Hyponex 培地, 李 等⁵⁵⁾은 MS 培地를 사용하였다. 이렇게 寒蘭의 種子發芽 培地에 관하여 연구자마다 다르게 여러가지 培地가 보고되었으나 실용적인 면에서 더욱 짧은 기간내에 發芽率을 높힐 수 있는 培地 개발에 대해서는 계속적으로 꾸준히 연구되어야 할 것이다.

植物組織培養環境의 중요요인으로는 광 및 온도가 있는데 광의 역할은 形態形成으로 주로 澱粉의 축적을 유도하여 shoot의 形成을 촉진시키는 것으

로 추정되어지고 있다. 1日 光週期の 적당한 일장은 12~16時間 정도이며 光質은 모든 빛이 혼합되어 있는 白色, 赤色 (600nm), 青色 (467nm) 光이 효과적이나 실용적으로는 형광등 또는 백열등과의 혼용이 주로 이용되고 있다. 光度는 培養 초기段階에는 500~3,000 lux, 후기段階에는 3,000~10,000 lux 정도면 된다. 한편 初期培養時 형태형성에 반드시 光이 필요하지는 않고 오히려 暗狀態에서 分化力이 촉진되는 경우가 있다.³²⁾

蘭의 種子 발아도 明暗條件에 따라 양상이 다르게 나타나는데 鄭等³⁰⁾에 의하면 나도風蘭 種子發芽 실험에서 明條件이 發芽數와 苗의 生育에 좋다고 하였고, Yates와 Curtis¹⁰⁹⁾는 *Cattleya*의 경우 暗條件에서는 種子發芽가 거의 없음을 보고한 바 있고, 李와 蘇⁸⁸⁾의 紫蘭種子 발아 실험에서도 暗條件에서 불량하였다고 보고하였다. 그러나 Kohl⁴³⁾은 *Cymbidium* 種子の 발아는 暗狀態에서 오히려 촉진적인 효과를 가진다고 하였고, Knudson⁴²⁾은 열대산 蘭인 *Vanilla*의 종자는 오직 暗狀態下에서만 발아한다고 하였다. 寒蘭과 春蘭이 속해있는 온대산 *Cymbidium*들은 種子が 발아하게 되면 protocorm이 발생하지 않고 蘭菌과 共生하여 根莖이 형성된 후 underground stage를 3~5년 지나 어느 정도 rhizome이 생육된 후에야 식물체를 생산하는 生育習性⁹⁸⁾을 가지고 있기 때문에 種子發芽에는 光의 존재가 오히려 저해됨을 미루어 알 수 있다. 蘭種子の 발아 및 그후 생육에 미치는 明暗의 효과에 관해서 狩野¹⁷⁾는 *Cymbidium*의 種子發芽가 暗狀態에서 양호하였고, 春蘭도 種子發芽時 暗狀態에서 발아를 촉진시켰다고 보고하였다. 이와 같이 蘭科 植物에서 同一種·屬이라 하더라도 각각의 발아와 苗의 생육을 주관하는 요인들이 다르기 때문에 개개의 대상식물에 따른 연구가 필요하게 된다.

蘭類 培養時 shoot 分化와 幼苗生産에 있어서는 寒蘭이나 春蘭과 같은 온대산 *Cymbidium*類는 열대산 *Cymbidium*類와 달리 종자의 發芽率이 지극히 저조할 뿐만 아니라 발아된 개체들마저도 protocorm이 생성되지 않고 그대로 rhizome化하여 新芽나 뿌리의 分化가 잘 이루어지지 않으며, 生長點 培養을 하더라도 根莖으로 分化되고 生長速度도 매우 느린데 寒蘭 역시 개체와 뿌리의 分化가 잘 되지 않는다. 따라서 寒蘭을 비롯한 온대산 *Cymbidium*類

를 大量繁殖하고자 할때는 根莖의 急速増殖과 증식된 根莖으로부터 가능한 다수의 新芽를 分化시키고 뿌리의 발생을 유도하여야 된다.⁹⁷⁾ 根莖의 急速増殖 培養用 培地의 종류로서는 White 培地¹⁰⁴⁾, MS 培地⁶⁸⁾ 및 Hyponex 培地³⁶⁾가 일반적으로 사용되어 왔으며, 寒蘭의 根莖増殖을 위하여 Kokubu 等⁴⁴⁾은 MS 培地에 NAA 2.0mg/l 를, 李 等⁴⁸⁾은 NAA 0.1mg/l 를 첨가한 培地에서 根莖生長이 양호하였다고 보고하였다.

寒蘭의 shoot 分化에 있어서는 Kokubu 等⁴⁴⁾은 MS 培地에 BA 5.0mg/l 첨가한 培地에서, 李 等⁵⁷⁾은 MS 培地에 BA 10.0mg/l 첨가한 培地에서, 鄭 等²⁹⁾은 NAA 1.0mg/l 와 kinetin 0.5mg/l 첨가한 培地에서 양호하였다고 보고함과 더불어 auxin>cytokinin의 수준일 때는 正常苗의 획득이 가능하나 auxin<cytokinin의 수준일 때는 再分化는 가능하나 幼苗의 正常生長이 어렵다고 하였으며, 崔⁷¹⁾는 NAA 0.2mg/l 첨가한 培地에서 shoot 形成率이 높았다고 보고하였으며, *Cymbidium ensifolium*의 경우에는 鄭과 全²⁹⁾은 Hyponex 3g/l, peptone 4g/l 含有培地에서 幼苗生育이 양호하였다고 하였다. 이와 같이 shoot 分化 培地는 *Cymbidium*의 種에 따라 사용培地를 다르게 할 수 있었으며 그에 따른 생육능력도 다르게 나타나기 때문에 寒蘭의 급속증식을 위한 shoot 分化 培地의 改良은 계속 연구되어야 할 것이다.

置床切片部位에 따른 根莖分化 능력에 대해서는 일반적으로 배양재료의 生育段階 (生理的 年齡)에 따라 培養 後 形態形成의 반응이 크게 달라지는 경향이 있는데 일반적으로 어린 조직이 성숙한 조직에 비하여 分化率이 높다. 이러한 점은 *Iris*¹⁰²⁾와 *Gladiolus*¹¹⁰⁾에서 처럼 芽 隣接部의 가장 어린 조직에서만 shoot 형성이 가능하였으며, 木本類인 *Rhododendron*⁸⁵⁾에서도 줄기조직으로부터의 발근은 어린 조직일수록 양호하였다는 보고가 있었는데 이와 같은 현상은 內生物質 즉 可溶性 糖과 不可溶性 糖의 相對的 比, 內生 生長調節物의 보유여부, 分化力을 지닌 세포의 數的差異 等に 기인하는 것으로 판단하였으며, cytokinin의 종류에 따라 반응이 달라지는 것은 內·外生 cytokinin類와의 상호작용에 기인하는 것으로 추정되어졌다고 보고되었다.^{60,74)} 이러한 결과를 적용하여 器內培養에서 shoot 획득 효율성 증대를 위하여 根

莖의 置床部位別 shoot 分化率을 가장 높힐 수 있는 部位 구멍이 필요하다고 하였다.

有機物 添加量이 根莖分化和 幼苗 육성에 관해서는 우리나라 自生寒蘭의 다량증식을 목적으로 종자의 無菌發芽 방법을 통하여 획득한 根莖을 器內에서 培養한 연구결과가 1979年 金等³⁹⁾에 의하여 처음으로 보고된 이래, 根莖의 器內增殖과 식물체 分化에 미치는 auxin 및 cytokinin類의 효과^{28,48,51,59)}나 培地의 종류^{23,48,51,56)} 그리고 培地에 첨가되는 각각 添加物質의 농도^{31,54,57)}에 관한 효과에 대해서는 다수의 연구 결과가 보고된 바 있다. 이러한 연구 결과에 따라 근래에 와서는 寒蘭^{24,44)}을 비롯하여 建蘭²⁹⁾, 報春花^{41,43)}(春蘭), 玉花蘭⁴¹⁾등 온대산 *Cymbidium*類^{36,53,79)}의 器內培養은 組織培養을 전문적으로 실시하고 있는 농가의 수준에서도 이루어지고 있을 정도로 보편화되기에 이르렀다.²²⁾ 그러나 培地에 첨가되는 生長調節物質의 농도에 관해서는 연구자에 따라 다소의 상이한 결과가 보고되어 있는데 이는 根莖의 年齡이나 培養部位, 培養環境, 實驗條件 등에 따라서 다소 다르게 나타난 결과라고 보고되었다. 根莖의 증식 및 식물체의 分化에 미치는 植物生長調節物質의 영향에 관한 연구^{23,25)}와 효과적인 培地의 개발에 관한 연구^{51,55,59)}가 꾸준히 진행되어 왔고 이러한 연구결과들을 토대로 하여 寒蘭의 器內生産은 그리 어렵지 않게 된 것이 사실이다.⁵¹⁾ 그러나 지금까지의 연구결과들은 대부분 器內에서의 根莖生育과 幼植物體 分化에 관하여 집중적인 연구가 진행되어 왔었고 分化된 植物體를 培養器 밖으로 꺼내어 實用的인 재배를 하기 위한 大苗(草長10cm 이상)에 生産에 관한 연구는 미흡한 실정⁵⁷⁾으로 여러가지 培地造成에 따른 shoot 分化和 더불어 器內에서 大苗生産에 관한 연구가 이루어져야 할 것이다.

基本培地에 自然採取 有機物을 첨가하였을 경우 여러 연구자들에 의해 각종 果汁 및 抽出物의 촉진효과가 인정되었는데^{31,32,46,80,81,99)}, 蘭의 발아와 생장에 효과적이라고 보고된 것으로는 코코넛乳, 바나나, 토마토, 사과 및 파파야汁 등이 있다. 狩野¹⁷⁾는 *Dendrobium*과 *Cattleya* 같은 地生蘭에서는 발아시 培地에 사과즙을 첨가했을 때 효과적이었으나, *Papiopedilum*과 같

은 地生蘭에서는 생장을 억제시켰다고 보고하였으며, 王과 邱¹⁰¹⁾는 *Papiopedilum* 과 *Calanthe* 등이 無菌培養時 charcoal을 첨가한 경우 생육에 좋은 효과를 보였다고 하였다. 또한 培地의 酸化와 phenol 물질에 의한 有害作用을 방지하기 위해 사용되는 活性炭 (0.5~3.0%), phenylacetic acid, POH-benzoic acid는 抑制物質을 흡착하여 생장을 간접적으로 촉진시키는 반면 生長調節物質도 흡착하기 때문에 적합한 培地로 판단된 培地에 charcoal을 첨가할 때는 반응이 전혀 달라지는 경우가 있으므로 유의해야 하며, 吸着程度는 IAA가 NAA, kinetin, BA에 비해 심하게 흡착된다. 그의 酸化防止劑로써 rutin (50mg/ℓ) 및 phloroglucinol (150mg/ℓ) 등이 있는데 正常生長 및 shoot 형성에 촉진적인 경우가 있다고 보고되었다.³²⁾ 이러한 점을 활용하여 寒蘭 shoot 分化에 天然果汁 및 酸化防止劑에 관한 연구가 필요하다고 하겠다.

各種의 蘭類는 종류에 따라서 花盆栽培用 盆土도 각각 다른 것으로 보고되고 있는데 Peterson⁸³⁾은 tree-fern fiber, bark, 水苔, perlite 등을 혼합하여 蘭의 盆土로 사용하는 것이 좋다고 하였고, Karen 등³⁷⁾은 幼苗의 생육에 cedar나 sugar pine bark가 매우 양호하였다고 하였으며, Northen⁷³⁾은 모든 *Cymbidium*類를 bark나 tree-fern만으로 재배할 수 있다고 하였다. 열대산 *Cymbidium*類의 盆土로는 대부분이 tree-fern이나 bark, perlite, peatmoss^{3,36)}, 木炭⁷⁵⁾ 등이 있으나 Vogelpoel¹⁰⁰⁾은 *Disa uniflora*의 재배에 江모래만을 사용하면 과습으로 因하여 해롭고 水苔와 혼합하여 사용하는 것이 좋다고 하였으며 Miles⁶⁴⁾는 *Oncidium* 재배시 소나무와 같이 樹脂가 있는 것에 식재하는 것은 좋지 않다고 하였다.

온대산 *Cymbidium*의 盆土로써 水苔나 赤玉土, 黑玉土, 鹿沼土 등을 이용한 많은 기록¹³⁾이 있는데, 町山⁶²⁾은 春蘭의 盆土로써 腐葉과 赤玉土를 혼합하여 이용하면 생육이 좋다고 하였으며, 季⁴⁹⁾는 寒蘭 花盆栽培用 몇가지 盆土 비교실험에서 腐葉이 생육이 양호하였으며 腐葉중에서는 서나무 腐葉이 가장 좋았다고 보고하였다. 그러나 濟州지역에서 腐葉 채취가 용이하지 않아 寒蘭의 産業的 다량생산 재배시에는 濟州지역에서 손쉽게 구할수 있으며 생육면에서 腐葉을 代用할 수 있는 盆土 선발에 관한 연구가 이루어져야 할

것이다.

濟州송이 (scoria)는 多孔質의 硬石으로서 蘭科식물의 花盆栽培用 盆土로 의 이용성이 높아 예로부터 濟州지역에서는 蘭栽培에 송이를 盆土로 많이 이용되어 왔는데, 張等⁷⁷⁾은 많은 量이 매장되어 있는 제주 자연생산 자원인 濟州産 송이에는 無機成分인 Ca^{++} 이 $160mg/\ell$, Mg^{++} 이 $43mg/\ell$ 그리고 K^+ 이 $103mg/\ell$ 가 함유되어 있고 그 물리성도 孔隙率이 70%로 충분한 氣相을 확보할 수 있고 含水率은 33%로 수분을 많이 함유하고 또한 比重도 0.53으로 가볍기 때문에 운반 등 작업이 용이하여 송이培地耕 등 원예용으로 이용성이 크다고 보고하였다. 이러한 결과를 활용하여 濟州송이를 寒蘭의 花盆栽培用 盆土로 개발을 위한 연구가 필요하다고 하겠다.

온대계 *Cymbidium*의 F₁의 遺傳樣式에 관해 岡田⁷⁶⁾은 一莖九華와 일경일화를 교잡했을 때 그 후대는 一莖九華로 표현된다고 하였고, 田原¹²⁾은 寒蘭과 春蘭을 交雜했을때 開花까지의 所要日數는 빠르면 5年, 늦으면 6~7年 정도 소요된다고 하였으며 花型은 兩親의 中間型으로 나타났으며, 赤色花를 花粉親으로 綠色花에 交雜하면 綠色花에 赤筋이 강하게 發現되고 花數는 1~2花, 향기는 優性으로 나타난다고 하였으며, 崔等⁸⁾은 東洋蘭의 種間人工交雜을 통하여 交雜 第1世代에서의 表現型은 花型, 花色 및 草型은 兩親의 中間型이었으며, 향기와 잎의 距齒는 우성이었고, 꽃의 크기에 있어서 雜種強勢의 정도는 交配組合에 따라 차이가 있었으며, 잎무늬는 交配組合에 따라 무늬가 나타나지 않거나 또는 分離現像을 나타내었다고 보고하였다.

酵素의 特異性이 동일하면서도 分子形態가 상이한 蛋白質들을 지칭하는 同位酵素⁶³⁾들은 동물이나 미생물과 더불어 식물에서도 광범위하게 탐지되어 왔다.⁹⁰⁾ 식물체내 同位酵素 분석은 細胞의 發育生理나 耐病性 또는 罹病診斷⁵⁴⁾ 등의 연구에 활용되는 한편, 同位酵素를 遺傳標識로 이용하려는 연구가 많은 식물집단을 대상으로 여러가지 酵素에 대하여 이루어져 왔는데^{67,87,88,89,91,96,106)}, 同位酵素 분석법은 주로 種 또는 그 이하 수준의 分類學的 연구에 유용하다.

同位酵素의 對立因子는 共同優性으로 나타나기 때문에 異型接合 상태인

個體와 同型接合 狀態인 個體와의 구별이 용이하다.¹⁾ Brussels sprout에서는 acid phosphatase (AcPH)⁷²⁾, 토마토에서는 alcohol dehydrogenase⁹⁶⁾, 무우에서는 AcPH와 malate dehydrogenase (MDH)³⁸⁾ 동위효소가 F₁ 種子의 純度 檢定에 이용될 수 있을 것으로 밝혀져 있다.

白等⁷⁹⁾은 營養生長期間이 긴 東洋蘭의 組織培養苗를 開花하기 前에 遺傳 形質을 檢토하기 위한 방법으로 自家 혹은 他家受粉시켜 얻은 根莖으로부터 12가지 同位酵素를 水平形 전분 겔 電氣泳動으로 분석해 본 결과 MDH, 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD), phosphoglucose isomerase (PGI), phosphoglucomutase (PGM) 및 AcPH는 뚜렷한 band 및 활성의 차이를 나타내어 遺傳標識로 이용성이 있다고 하였다.

여러가지 作物^{9,94,107,108)}에서 等電點電氣泳動法이 재래식 電氣泳動法보다 同位酵素 分離能이 우수했다는 결과가 보고되고 있으나 寒蘭에 대해서는 분석한 결과를 찾을 수 없다.

寒蘭은 營養生長期間이 매우 길어 組織培養苗가 開花하기 전에 遺傳標識로 이용할 수 있는 形質探索의 일환으로 同位酵素分析을 수행할 필요가 있다.



III. 材料 및 方法

1. 寒蘭의 種子發芽와 幼苗生産

1-1. 交配組合에 따른 發芽 特性

1-1-1. 種子 形成과 稔性

人工受粉 後 交配組合에 따른 種子 형성과 稔性을 알아 보기 위하여 濟州 寒蘭 (Cheju *Cymbidium kanran* : 漢拏山에 自生되고 있는 寒蘭과 濟州地 域에서 채취되어 栽培되고 있는 寒蘭을 일컫음)의 開花 寒蘭 14株 (Table 1) 를 供試하여, '91年 10月 부터 12月 사이에 供試系統의 開花期에 각각 自家 受粉 및 他家受粉을 시킨 후 12개월 후 特性을 조사하였다.

寒蘭種子の 自家受粉方法은 隣花受粉으로 2番花의 花粉을 1番花 柱頭에 受粉시켰다.

Table 1. Growth characteristics of Cheju *Cymbidium kanran* as experiment materials.

Plant No.	Plant height (cm)	No. of leaves (ea)	No. of shoots (ea)	Blooming period (month)	Flower color
No. 1	53.0	23	6	Oct. - Dec.	green
No. 2	56.5	23	7	Oct. - Dec.	purple
No. 3	33.0	13	5	Oct. - Dec.	purple
No. 4	32.0	19	7	Oct. - Dec.	purple
No. 5	49.0	28	7	Oct. - Dec.	purple
No. 6	43.0	37	9	Oct. - Dec.	green
No. 7	33.0	29	8	Oct. - Dec.	green
No. 8	42.0	14	4	Oct. - Dec.	green
No. 9	39.0	21	6	Oct. - Dec.	green
No. 10	43.0	21	6	Oct. - Dec.	pink
No. 11	46.0	25	8	Oct. - Dec.	pink
No. 12	46.0	28	10	Oct. - Dec.	red
No. 13	45.0	23	7	Oct. - Dec.	red
No. 14	45.0	21	7	Oct. - Dec.	red

1-1-2. 種子 發芽能力

交配組合에 따른 種子들의 발아능력을 알아보기 위해서 '92年 11월부터 '93年 1月 사이에 寒蘭 꼬투리의 표면을 alcohol로 소독한 다음 無菌箱子에서 裂開하여 種子를 試驗管에 넣고 0.1N KOH로 소독한 후 꼬투리 1個當 100ml flask 20개에 種子를 과중하였다.

播種用 培地로는 MS 培地에 寒天이 첨가 되지 않은 液體 靜置培養 방법으로 발아시켰다. 발아기간 중에는 暗條件에서 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 를 유지하여 주었다. 種子發芽 특성을 種子 꼬투리의 형성상태, 형성된 種子 꼬투리의 稔性有無, 發芽時 (0.01mm 정도 크기의 肉眼 관찰이 가능한 시기) 까지의 所要日數 및 發芽數를 과중 6개월 및 12개월 후 2회 조사하였다.

1-2. 種子的 無菌發芽

1-2-1. 培地の 種類

濟州寒蘭 '仙鶴' 과 '赤一文' 품종을 受粉시킨 後 12개월된 種子를 '89年 11월에 실험 1-1-2의 방법으로 100ml flask에 처리별 10個 flask씩 320個 flask에 다음과 같은 培地에 과중하였다.

- | | |
|----------------------------|--------------------|
| ① Murashige and Skoog (MS) | ⑤ Vacin and Went |
| ② Kyoto | ⑥ $\frac{3}{4}$ MS |
| ③ Knudson C | ⑦ $\frac{1}{2}$ MS |
| ④ White | ⑧ $\frac{1}{4}$ MS |

* $\frac{3}{4}$ MS, $\frac{1}{2}$ MS, $\frac{1}{4}$ MS 는 MS 培地の 無機鹽類를 75, 50, 25%로 되게 量을 조절한 培地임

모든 과중용 培地에는 sucrose 30g/l, peptone 2g/l 을, 固體培地에는 agar 8g/l 을 첨가하였고 pH는 5.5로 조정하였다. 培養溫度는 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 을 유지하였으며 暗培養하였다. 종자발아 (0.01mm 크기) 후 根莖形成 (0.5cm 크기) 이 10% 될 때까지의 所要日數 (個月)와 과중 후 3년까지 根莖形成率 (根莖形成 flask/置床 flask $\times 100$)을 조사하였다.

1-2-2. 明暗培養

明 또는 暗培養이 종자발아와 根莖形成에 미치는 영향을 알아보기 위해서 MS, Kyoto, Knudson C, White, Vacin and Went 등 8種의 培地에, 明培養은 1日 16時間 1,000 lux 밝기로 照明하였으며 그의 실험방법은 실험 1-2-1과 같은 방법으로 처리하여 조사하였다.

1-3. Shoot 分化和 幼苗 生産

1-3-1. 分化 培地

寒蘭의 根莖分화를 용이하게 하여 幼苗 생산을 위한 효과적인 培地를 선발코자 실험 1-2-1에서 種子가 발아되어 형성된 根莖을 사용하여 증식된 根莖을 2cm 크기로 切斷하여 '91年 11月 200ml flask (培地 50ml)에 5個씩 置床하고 처리당 10반복으로 실험을 수행하였다. 培地造成은 Hyponex (N6.5-P6-K19)를 기본으로 하여 pepetone (BACTO-peptone "DIFCO" certified), rutin (Quercetin-3-β-D-rutinoside ; SIGMA)을 다음과 같이 농도로 단용 및 혼용 (60處理)하였다.

Hyponex (g/l)	0, 1, 3, 5, 7, 9
Peptone (g/l)	0, 1, 2, 3, 4
Rutin (mg/l)	0, 100

分化培地の 조성은 sucrose 30g/l, agar 8g/l, NAA 0.2mg/l, BA 5.0mg/l 를 첨가하였고 pH는 5.3, 培養溫度는 23±2℃을 유지하였으며 1일 16시간 1,000lux의 밝기로 明培養하여 5개월 후에 shoot 分化率, 草長, 生體重 등 생육특성을 조사하였다.

1-3-2. 置床切片 部位

1-2-1에서 종자가 발아되어 6cm 크기로 자란 根莖을 先端部, 中間部, 基部로 구분하여 2cm 크기로 절단하여 '91年 11月에 200ml flask (培地 50ml)에 切片 根莖數를 3개, 5개, 7개, 9개씩 置床하였다.

分化用 培地는 Hyponex 5g/ℓ, peptone 2g/ℓ, sucrose 30g/ℓ, agar 8g/ℓ, NAA 0.2mg/ℓ, BA 5.0mg/ℓ 에 activated charcoal 0.5g/ℓ 을 첨가하여 조성한 培地에서 培養하여 5個月까지 總分化個體數, shoot, 뿌리發生所要日數를 조사하였으며 草長, 根長 等の 생육은 12個月 後에 조사하였다.

1-4. 組織培養 寒蘭의 栽培

1-4-1. 組織培養苗의 硬化用土

寒蘭 組織培養苗의 硬化에 알맞는 用土를 선발코자 根莖培養에 의하여 생산된 草長 12~14cm 크기의 組織培養苗를 '90年 3月에 직경 18cm 크기의 화분에 5株씩 심었다.

硬化用土의 종류는 水苔 (sphagnum moss), vermiculite, perlite, 自生地 腐葉, bark, 濟州송이 (scoria), 濟州송이 + bark (1:1), 濟州송이 + 腐葉 (1:1) 등 8종류를 供試하여 재배온도 15~25℃, 습도 75~85%로 관리하였으며 시비는 Hyponex (N6.5-P4.5-K19, 일수화학제품) 1,000배액을 4月에서 10月 사이 月 2회 시비하여 移植 1年 후 生存率 및 草長, 葉數, 生體重 等を 조사하였다.

1-4-2. 花盆栽培用 盆土

寒蘭 組織培養苗의 花盆栽培를 위한 알맞는 盆土를 선발코자 硬化過程을 마친 草長 10~12cm 크기의 組織培養苗를 '91年 3月에 직경 12cm 蘭盆에 3株씩 심었다.

盆土 종류로는 自生地 腐葉, 日向土 (Hiuga soil), 日本 Claybest, pearlclay, 濟州송이 (scoria), 濟州송이 + bark (1:1), 濟州송이 + bark (2:1), 濟州송이 + bark (3:1), 日向土 + bark (1:1), 日向土 + bark (2:1), 日向土 + Hydroball (1:1), 日向土 + Hydroball (2:1) 등 12種類를 供試하여 재배온도 15~25℃, 습도 75~85%의 조건에서 재배하였으며 1年마다 生存率과 草長, 葉數, 生體重 等を 조사하였다.

1-4-3. 白生地 栽培

寒蘭 組織培養苗의 白生地 재배를 위하여 組織培養苗 1年生 (草長 10±1cm, 葉數 5±1個)을 李⁴⁹⁾가 寒蘭의 白生地 환경을 조사한 지점인 한라산 선돌 (海拔 490m 地點 : 南濟州郡 南元邑) 지역에 '92年 3월에 200株 移植 하여 1年마다 生存率, 草長, 葉數 等を 조사하였다.

2. 寒蘭의 同位酵素 分析

2-1. 濟州白生 寒蘭의 peroxidase 同位酵素 分析과 類緣關係 檢討

1) 分析對象 植物

濟州寒蘭 品種으로 보고된 15品種과 濟州道農村振興院에서 수집하여 보존하고 있으나 아직 품종명이 부여되지 않은 30系統 (農振院의 寒蘭母株 관리 번호로 標記, 예 : Nong. 1) 등 45系統의 잎을 분석하였다. 충분히 성숙한 건전한 1년생 葉 (15~20cm)을 供試하였다.

2) 試料造製와 酵素의 抽出

葉 5g을 乳鉢에서 液體 窒素를 加하면서 곱게 磨碎한 후 증류수 5ml을 넣고 17,000×g에서 30분간 遠心分離하여 얻은 上澄液을 -40℃에서 冷凍保管 하였다가 等電點電氣泳動 시료로 사용하였다.

Table 2. Mixture ratio of stock solution for slab gels.

Stock solution	Gel mixture (5.5%)	
1. Acryl-bis (30%T, 3%C)	29.1-0.9g/100ml	4.6ml
2. Distilled water		23ml
3. Ampholyte		0.8ml
4. TEMED	0.2ml/19.8ml	0.75ml
5. Ammonium persulfate	1g/5ml	0.3~0.53ml
Total		30ml

3) 等電點電氣泳動

폴리아크릴라마이드 겔 等電點電氣泳動 (PAGIF)은 Osterman⁷⁷⁾ 및 Stegmann⁸⁴⁾의 방법을 일부 변형하여 수행하였다. 겔은 총부피 30ml (Table 2)을 기준으로 할 때 polyacrylamide 5.5ml에 ampholytes로서 Pharmacia제의 Pharmalytes를 0.8ml 첨가하여 pH 범위를 3~10으로 조절하였다.

電氣泳動은 7cm×22cm×0.75mm 규격의 水平型 電氣泳動裝置를 이용하였다. 陰極에 0.1M ethanolamine을, 陽極에는 0.04M aspartic acid를 적신 electrode strip을 사용하였다. 陰極으로 부터 약 1cm 떨어진 곳에 electrode strip 조각을 일렬로 배열하고, 20 μ l의 sample을 滴加한 다음 100V에서 1시간 電氣泳動 시킨 후 200~500V에서 약 3시간 전기영동시켰다.^{107,108)}

4) Peroxidase 染色

염색은 農村振興廳 遺傳工學研究所 標準染色法¹⁰⁷⁾에 준하였다. 0.1M acetate buffer (pH 4.5) 100ml와 3-amino 9-ethylcarbazole 0.01g을 녹인 dimethyl formamide 2ml를 혼합하고 여기에 1M CaCl₂ 1ml와 H₂O₂ 100 μ l를 넣은 용액에서 약 40분간 염색하였다. 염색 후에는 겔을 5% acetic acid에 固定한 후 band 특성을 조사하였다.

5) 類緣關係檢討

PX多形을 pH가 낮은 곳에서 높은 곳으로 차례로 a, b, c, d, e, f, g 등 7개의 文字를 부여하여 band의 位置를 표시하였다.

PX 表現型에 따른 寒蘭 groups 間에는 band數를 이용한 Nei's F-statistics 計算式 [$F=(2m \times y) / (mx+my)$]으로 genetic distance values를 산출했으며 이를 기초로 dendrogram을 작성하여 類緣關係를 검토하였다.

2-2. 種子培養 寒蘭의 peroxidase 同位酵素 分析

濟州 寒蘭 開花株를 自家受粉 및 他家受粉시킨 종자를 無菌培養하여 플라스크內에서 草長이 10cm 정도된 組織培養苗의 葉을 대상으로 분석하였다. 酵素의 抽出, 폴리아크릴라마이드 겔의 준비, 等電點電氣泳動 및 同位酵素 염색방법은 실험 2-1 과 같았다.

2-3. 寒蘭과 溫帶産 *Cymbidium* 交雜種의 數種 同位酵素 分析

1) 分析對象 植物體

濟州寒蘭, 春蘭, 竹栢蘭, 觀音素心の 根莖과 濟州寒蘭을 母親 (♀)으로 하여 春蘭, 竹栢蘭, 觀音素心を 花粉親 (♂)으로 한 人工交雜 種子로부터 얻은 根莖을 供試하였다.

2) 試料調製와 酵素 抽出

분석대상 7種의 根莖을 수돗물로 깨끗이 씻은 다음 蒸溜水로 세척하고 나서 종이수건으로 물기를 닦아 냈다. 그 다음 4℃에서 마쇄한 후 冷凍高速 遠心分離機에서 17,000×g으로 30分間 遠心分離하여 上澄液을 채취하여 -40℃냉동고에 보관하였다가 電氣泳動 試料로 사용하였다.

3) 等電點電氣泳動

LKB Co.의 겔 (pH 3.5~9.5)에 cation buffer (1M NaOH)와 anion buffer (1M phosphate)를 사용하여 等電點電氣泳動을 실시하였다. 電流는 最初 200V에서 20分, 400V에서 20分, 800V에서 30分, 1200V에서 1時間 동안으로 하여 분리하였다.

4) 同位酵素 染色

Acid phosphatase (AcPH) : 50mM sodium acetate (pH 5.5) 100ml, 1 MgCl₂ 1ml, fast black K salt 100ml, 1% β-naphthyl acid phosphate 3ml 로 조성된 染色液으로 30℃ 暗條件에서 發色시켰다.

Esterase : 1.2ml acetone에 α-naphthyl acetate 50mg을 녹인 다음 100mM tris-HCl (pH 7.2) 120ml, fast blue RR salt 85mg을 첨가한 染色液으로 30℃ 暗條件에서 發色시켰다.

Malate dehydrogenase (MDH) : 1M tris-HCl (pH 8.8) 12ml, 蒸溜水 100ml, 10mM β-nicotinamide adenine dinucleotide (β-NAD⁺) 16ml, 10mM phenazine methosulate (PMS) 1.6ml, 10mM nitro blue tetrazolium (NBT) 8ml 및 2M D.L-malic acid (NaOH를 첨가하여 pH 7.0으로 중화시킨 것) 6ml를 混合하여 30℃ 暗條件에서 發色시켰다.

Malic enzyme (ME) : 100mM tris-HCl (pH 8.4) 5ml, 2M D.L-malic

acid (NaOH를 첨가하여 pH 7.0으로 중화시킨 것) 0.6ml, MgCl₂ 5.1mg, β -nicotinamide adenine+dinucleotide phosphate (β -NADP⁺) 5ml, NBT 2.4ml, PMS 1ml에 1% 따뜻한 liquid agar 6ml로 조성된 染色液으로 30℃ 暗條件에서 發色시켰다.

Peroxidase (PX) : 0.03% H₂O₂ 25ml, 蒸溜水 100ml, benzidine solution (benzidine 1g, acetic acid 9ml, 증류수 40ml 混合液) 25ml로 조성된 染色液으로 30℃ 暗條件에서 發色시켰다.

Phosphoglucumutase (PGM) : β -NADP⁺ 15ml, methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) 20ml, 1M tris-HCl (pH 8.0) 5ml, 0.5M MgCl₂ 25ml, 18mM fructose-6-phosphate 5ml, 10mM PMS 1ml 및 蒸溜水 110ml의 혼합액에 사용 직전 glucose-6-phosphate dehydrogenase 50 unit를 첨가하여 30℃ 暗條件에서 發色시켰다.

Phosphoglucose isomerase (PGI) : β -NADP⁺ 50ml, 1M tris-HCl (pH 8.0) 5ml, 0.5M MgCl₂ 25ml, 18mM fructose-6-phosphate 5ml, 10ml PMS 1ml 및 蒸溜水 110ml의 混合液에 사용직전 glucose-6-phosphate dehydrogenase 50 unit를 첨가하여 30℃ 暗條件에서 發色시켰다.

Superoxide dismutase (SOD) : 0.5M tris-HCl (pH 8.5) 10ml, NBT 20mg, PMS 5mg, 蒸溜水 90ml 및 octanol 2 ml로 造成된 染色液에 gel을 넣고 明條件에서 發色시켰다.

IV. 結果 및 考察

1. 寒蘭의 種子發芽와 幼苗生育

1-1. 交配組合에 따른 發芽 特性

1-1-1. 種子形成과 稔性

寒蘭 交配組合에 따른 人工受粉 後 종자 꼬투리 형성과 稔性 有無를 알아 보기 위하여 開花寒蘭 14株 (Table 1)를 交配材料로 사용하여 실험해 본 결과는 Table 3, Table 4에서 보는 바와 같이 寒蘭 開花株의 交配 組合에 따른 종자의 生理的 特性인 種子 꼬투리 형성을 (Fig. 1)은 自家受粉 종자가 75.0%로 他家受粉 種자 66.7% 보다 높았으나 稔性比率은 他家受粉 種자가 80.0%로 自家受粉 種자 66.7% 보다 높은 경향을 보였다.

Table 3. Pod formation and fertility of artificially cross and self-pollinated parents in *C. kanran*.

Cross - pollination			Self - pollination		
Combination (♀ × ♂)	Pod for- mation	Ferti- lity	Parents	Pod for- mation	Ferti- lity
No. 1×No. 3	-	×	No. 1 ⊗	+	○
No. 1×No. 4	+	○	No. 2 ⊗	-	×
No. 1×No. 5	+	○	No. 4 ⊗	+	×
No. 2×No. 9	-	×	No. 5 ⊗	+	○
No. 2×No. 11	-	×	No. 6 ⊗	+	○
No. 4×No. 1	+	×	No. 7 ⊗	+	○
No. 5×No. 1	+	○	No. 8 ⊗	+	○
No. 6×No. 12	-	×	No. 10 ⊗	+	×
No. 7×No. 10	+	○	No. 11 ⊗	-	×
No. 8×No. 5	+	○	No. 12 ⊗	+	×
No. 10×No. 7	+	×	No. 13 ⊗	-	×
No. 11×No. 2	+	○	No. 14 ⊗	+	○
No. 12×No. 6	+	○			
No. 13×No. 14	-	×			
No. 14×No. 13	+	○			

Symbols : + : Favorable - : Defective
 ○ : Fertile × : Sterile

Table 4. Pod formation rate and fertility rate in artificially cross and self-pollinated *C. kanran*.

	Cross-pollination	Self-pollination
Pod formation rate	66.7%	75.0%
Fertility rate	80.0%	66.7%



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

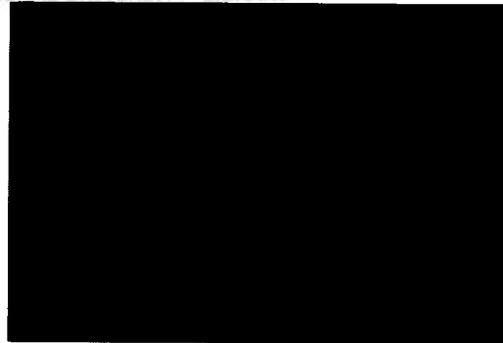


Fig. 1. Pod formation and asymbiotic germination in *C. kanran*.

1-1-2. 種子 發芽能力

交配組合別로 채취된 寒蘭種子 (실험 1-1-1에서 채취된 종자)들의 발아 능력을 알아보면 Table 5에서 보는 바와 같이 自家 및 他家受粉된 種子發芽 (0.01mm 크기, Fig. 1)의 所要日數는 系統 및 交配組合에 따라 59日에서 329일로 큰 차가 있었으며 평균적으로는 他家受粉 種자가 106日로 自家受粉 種子 164日보다 발아가 빠른 경향이였다.

Table 5. Effect of artificial pollination on seed germination in *C. kanran*.

Parents	Initial germination after sowing (days)	No. of germinated seeds		
		6 months after sowing (ea)	6 to 12 months after sowing (ea)	total (ea)
Cross-pollinated seed (♀ × ♂)				
No. 1×No. 4	59	568	—	568
No. 1×No. 5	59	442	—	442
No. 5×No. 1	68	241	111	352
No. 7×No. 10	68	171	—	171
No. 8×No. 5	174	4	41	45
No. 11×No. 2	165	42	123	165
No. 12×No. 6	142	102	8	110
No. 14×No. 13	113	41	112	153
Average	106	201	49	250
Self-pollinated seed				
No. 1⊗	77	28	29	57
No. 5⊗	68	818	20	838
No. 6⊗	81	38	380	418
No. 7⊗	329	—	1	1
No. 8⊗	312	—	13	13
No. 14⊗	114	60	285	345
Average	164	157	121	278

또한 自家 및 他家受粉된 種子發芽의 發芽個體數도 Fig. 2에서 보는 바와 같이 系統 및 交配組合에 따라 1個에서 838個로 매우 큰 차를 보였는데 이는 白等²¹⁾이 온대산 *Cymbidium*의 發芽所要日數가 119~453일로 種이나 交雜 有無에 따라 차이가 심했다는 보고와 유사하였다.

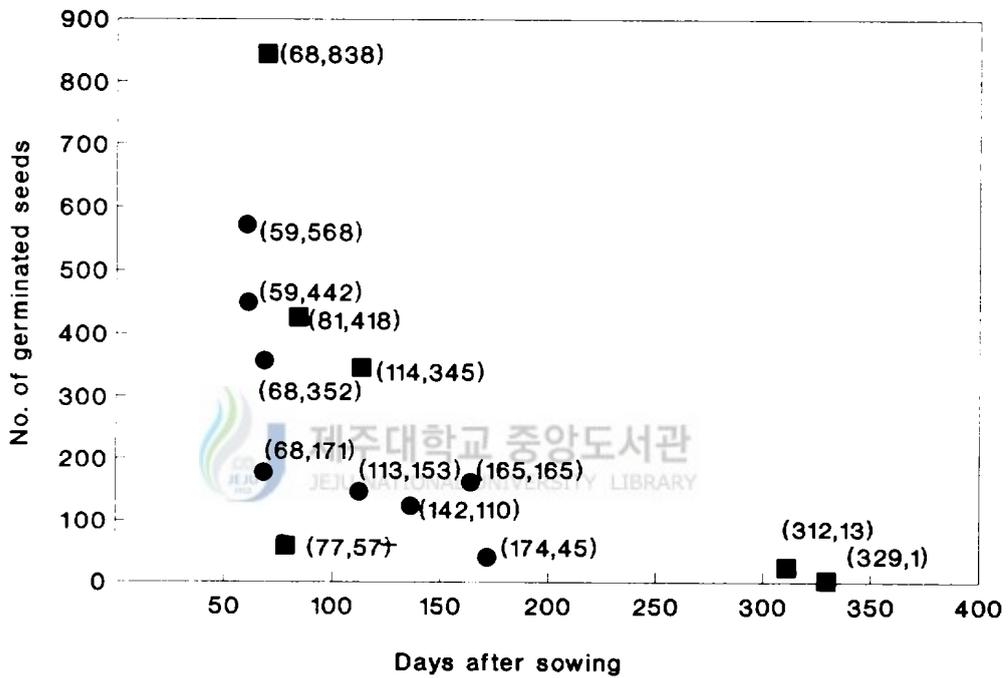


Fig. 2. Date of initial germination and number of total germinated seeds in artificially cross and self-pollinated *C. kanran*.

■ Self pollinated ● Cross pollinated

특히 Fig. 3에서 보여주는 바와 같이 供試寒蘭 No. 1과 No. 5의 각각 自家受粉 種子의 無菌發芽數가 57개와 838개로 크게 차이를 보였으나, 이들 個體를 雌雄을 交替하여 즉 No. 1 (♀)×No. 5 (♂)와 No. 5 (♀)×No. 1 (♂)으로 他家交雜을 시켜서 얻은 種子의 無菌發芽數는 각각 422個와 352個로 큰 차이가 없음을 보여주고 있다. 이와같이 交配組合에 따른 發芽能力의 차이는 交配에 따른 種子의 生理的 特性으로 예측되나 금후 더욱 연구되어야 할 과제라고 할 수 있겠다.

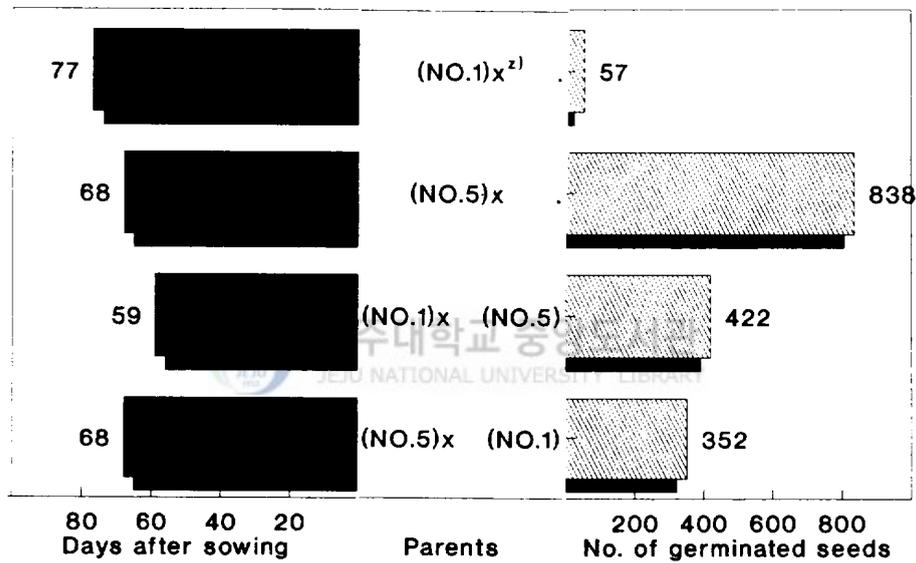


Fig. 3. Date of initial germination and number on total germinated seeds in four seed lots obtained from artificially self and cross-pollination of two *C. kanran* strains.

²¹ See Table 1.

1-2. 種子의 無菌發芽

1-2-1. 培地의 種類

種子 播種 後 짧은 기간내에 根莖形成을 촉진시킬 수 있는 培地의 종류를 알아보기 위하여 濟州寒蘭 ‘仙鶴’ 과 ‘赤一文’ 品種을 他家受粉시켜서 12個月 된 종자를 파종한 결과는 Fig. 4 및 Fig. 5에서 보는 바와 같다.

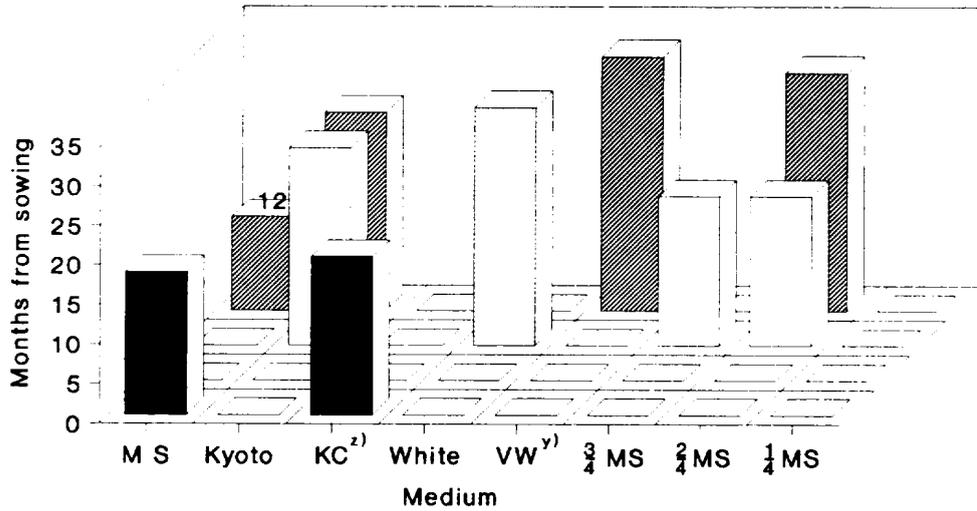


Fig. 4. The date of rhizome formation from seeds obtained by artificial cross-pollination of 'Seonhak' × 'Jeokilmun' *C. kanran* as affected by various culture media.

2) KC : Knudson C , y) VW : Vacin-Went
 ■ Light-solid medium ▨ Light-liquid medium
 □ Dark-solid medium ▩ Dark-liquid medium

無菌發芽 後 根莖形成을 높힐 수 있는 적합한 배지는 使用培地의 종류, 培養環境에 따라 根莖形成 所要日數가 파종 後 12個月에서 32個月로 큰 차가 있었으며 이들 중 MS 培地가 파종 12個月 後 0.5cm 크기 根莖形成이 이루어져 가장 양호함을 보였다. 寒蘭의 種子發芽用 培地는 加古¹⁶⁾의 경우 Tsuchiyua and Nitsch micro-element 培地를, 長島⁷⁰⁾는 Hyponex 培地를 사

용하였으며, 국내에서도 白等⁸⁰⁾은 Kyoto II 培地, 崔⁷⁾는 Hyponex 培地를 사용하여 연구자마다 사용하는 배지의 종류가 서로 달랐으나 짧은 기간내에 根莖을 형성시키기 위해서 日本에서는 Kokubu 等⁴¹⁾이, 국내에서는 李 等⁵⁷⁾이 MS 培地가 우수하였다는 보고한 바 있었는데 본 시험결과와 같은 경향을 보였다. 이와 같이 種子 無菌發芽培地 中 가장 우수한 결과를 보인 MS 培地는 NO₃ 와 NH₄⁺상태의 질소 급원이 공시한 타 培地보다 높은 조성에 기인하지 않는가 생각되는데 이는 특히 李⁴⁹⁾의 自生地 실생조사에서도 나타난 바와 같이 서어나무, 붉가시나무, 종가시나무 等の 腐葉이 퇴적된 곳에 自生寒蘭의 분포가 많았음과 一致한다고 볼 수 있다. 즉 腐葉에 의한 多量의 질소원 含有條件은 그만큼 ammonium과 nitrate 이온의 토양 중 유리조건이 좋음을 시사하는데 지금까지 寒蘭의 種子發芽에 대한 MS培地の 적용성은 검토된 바 없으므로 他培地와의 osmotic value 나 부가적인 특정 영양소와의 연관관계는 추후 연구되어야겠다.

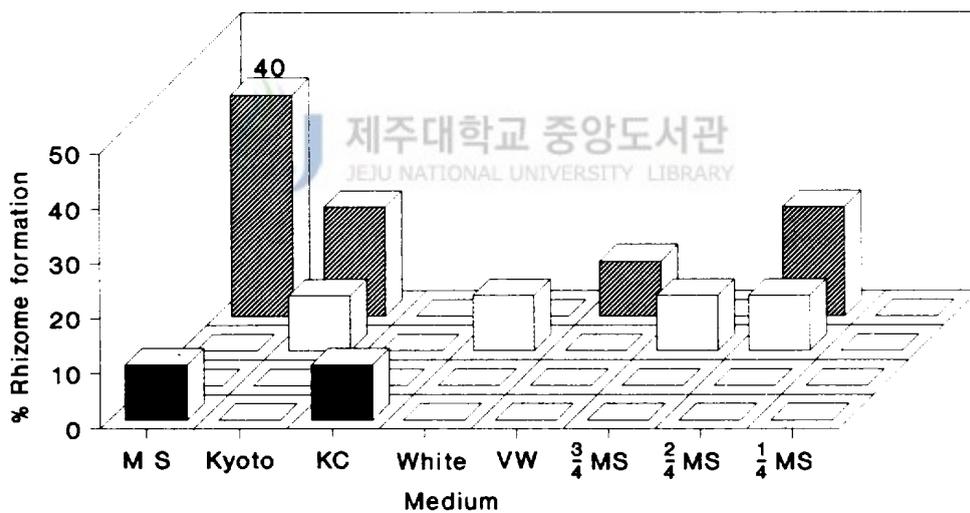


Fig. 5. The rate of rhizome formation from seeds obtained by artificial cross-pollination of 'Seonhak'×'Jeokilmun' *C. kanran* as affected by various culture media. See Fig. 4 for detail explanation.

1-2-2. 明暗培養

寒蘭種子 無菌發芽 및 根莖形成 기간중의 光環境 (明·暗培養)에 따른 發芽 및 根莖形成能力은 培地의 종류, 培地物理性 (固·液體培地)에 따라 차이가 있었는데 Fig. 6에서 보는 바와 같이 MS 培地에 寒天이 첨가되지 않은 液體培地에 과중하는 것이 置床 flask 數의 40% 정도가 根莖形成 (0.5cm 크기)이 이루어져 가장 양호하였다.

鄭 等³⁰⁾은 나도風蘭 種子發芽時 明條件이 發芽數와 苗의 생육에 좋다고 하였고, 李와 蘇³⁶⁾는 紫蘭 種子發芽時 暗條件이 불량한 결과를 가지는 것으로 보고한 결과와 상반된다. 그러나 Kohl⁴³⁾은 *Cymbidium* 종자의 발아는 暗狀態에서 오히려 촉진적인 효과를 가진다고 하였고, Knudson⁴²⁾은 *Vanilla*의 種子는 오직 暗狀態下에서만 발아한다고 한바 있는데 寒蘭 種子培養의 경우에는 暗培養이 우수한 것으로 인정되었다.

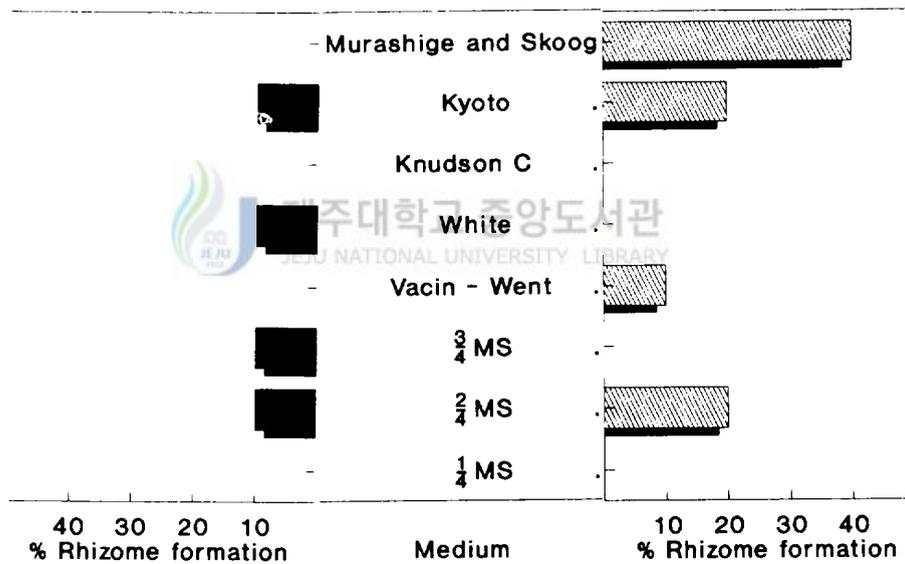


Fig. 6. The rete of rhizome formation from seeds obtained by artificial cross-pollination of 'Seonhak'×'Jeokilmun' *C. kanran* as affected by various culture media under dark condition.

■ Solid medium ▨ Liquid medium

1-3. Shoot 分化와 幼苗 生育

1-3-1. 分化培地

寒蘭의 根莖 分化를 용이하게 하여 幼苗 生産을 단기간에 피할수 있는 효과적인 培地를 선발코자 2cm 크기 根莖을 置床하여 실험한 결과 Table 6과 Fig. 8에서 보는 바와 같이 Hyponex, peptone, rutin의 첨가농도에 따른 shoot 分化는 전혀 分化가 안되는 것에서 부터 94%까지 分化되어 처리간 큰 차가 있었으며 이들 중 단기간에 幼苗生産을 피할 수 있는 根莖分化를 위한 효과적인 培地는 Hyponex 5g/l, peptone 2g/l, rutin 100mg/l 培地에서 培養했을 때 置床 2個月 後부터 shoot의 分化가 시작되어 5個月이 되면 草長 3cm 크기의 幼苗 (Fig. 7)를 얻을 수 있었으며 分化率은 94%로 높힐 수 있었다. 이는 鄭과 全²⁹⁾이 *Cymbidium ensifolium*에서 Hyponex 3g/l, peptone 4g/l, 培地에서 幼苗生育이 양호하였다는 보고와 비슷한 경향을 나타냈다.



Fig. 7. In vitro shoot proliferation from rhizome by redifferentiation. Rhizome derived from seeds obtained by artificial cross-pollination of 'Seonhak' × 'Jeokilmun' *C. kanran*.

Table 6. Effect of Hyponex, peptone and rutin in culture medium on shoot formation from rhizome derived from seeds obtained by artificial cross-pollination of 'Seonhak' × 'Jeokilmun' *C. kanran*.

Hyponex (g/l)		0	1	3	5	7	9																						
Peptone (g/l)		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4													
No. of shoots	R0 ^{z)}	0	0	0	0	18	18	18	15	15	9	16	24	25	28	26	34	31	25	17	8	24	27	25	13	0	0	0	0
	R100 ^{y)}	0	0	0	0	17	12	12	18	16	16	23	29	34	39	33	38	47	34	27	15	22	26	24	21	0	0	0	0
%	R0	0	0	0	0	36	36	36	30	30	18	32	48	50	56	52	68	62	50	34	16	48	54	50	26	0	0	0	0
Shooting	R100	0	0	0	0	34	24	24	36	32	46	58	68	78	66	76	94	68	54	30	44	52	48	42	0	0	0	0	0
Date of shooting (month)	R0	-	-	-	-	4	4	4	4	4	3	3	3	4	3	3	2	2	3	4	3	4	3	3	4	-	-	-	-
	R100	-	-	-	-	4	4	4	4	4	3	3	2	3	3	2	2	2	3	4	3	4	3	3	3	-	-	-	-

^{z)} Without rutin ^{y)} With 100 mg/l rutin

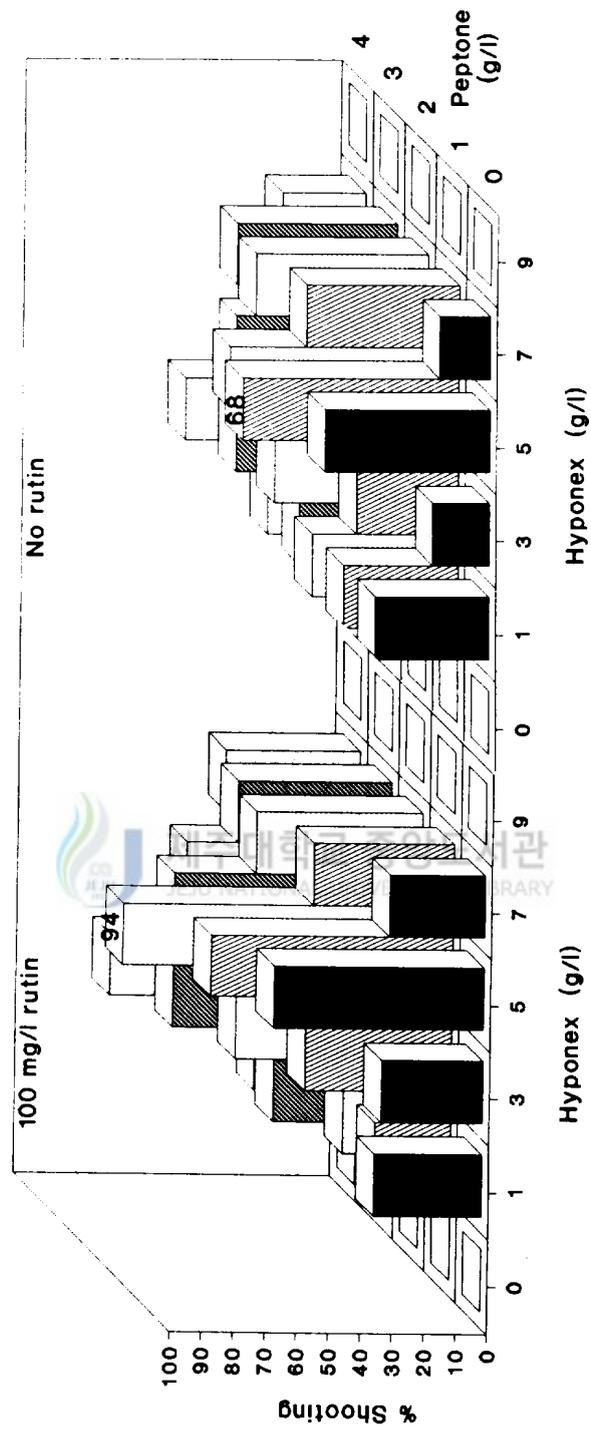


Fig. 8. Percent shooting in rhizome culture as affected by different concentrations of Hyponex, peptone and rutin in culture medium. See Fig. 7 for the origin of the rhizome.

또한 培養 5個月 後 처리별 寒蘭根莖 分化株의 地上部 生育상황을 살펴보면 Table 7에서 보는 바와 같이 草長은 2.0~4.0cm, 葉數는 2.8~4.3個 범위 이었으며 Hyponex 3g/ℓ, peptone 3g/ℓ 培地와 Hyponex 5g/ℓ, peptone 2g/ℓ 培地에서 草長 4.0cm, 葉數 3.9個로 우수하였다.

Table 7. Effects of Hyponex and peptone in culture medium on plant height and number of leaves of seedlings derived from rhizome. See Fig. 7 for the origin of the rhizome.

Hypo- nex (g/ℓ)	Pep- tone (g/ℓ)	Plant height (cm)	No. of leaves (ea)	Hypo- nex (g/ℓ)	Pep- tone (g/ℓ)	Plant height (cm)	No. of leaves (ea)
1	0	2.3	3.6	5	0	3.4	4.1
	1	2.0	3.1		1	3.8	4.3
	2	2.0	3.4		2	4.0	3.9
	3	2.5	4.0		3	3.4	3.8
	4	2.6	3.8		4	3.0	3.8
3	0	2.5	3.8	7	0	2.9	2.8
	1	3.0	3.9		1	2.8	3.2
	2	3.8	4.1		2	2.9	3.8
	3	4.0	3.9		3	2.5	3.5
	4	2.9	3.9		4	2.0	3.2

寒蘭根莖 分化 幼苗生産을 위한 Hyponex, peptone 처리농도에 따른 培養 5個月 後 地下部 生育상황과 生體重은 Table 8에서 보는 바와 같이 根長은 0.0~1.7cm, 根數는 0.0~1.9個, 生體重은 0.2~0.5g 범위이었으며 地上部 生育이 양호하였던 Hyponex 5g/l, peptone 2g/l 培地에서 根長 0.7cm, 根數 1.9個, 生體重 0.4g으로 地下部 生育도 양호하였으나 Hyponex 3g/l, peptone 3g/l 培地에서는 地下部 生育이 다소 불량하였다. 따라서 幼苗生産을 위해서는 Hyponex 5g/l, peptone 2g/l 培地가 양호한 것으로 인정되었다.

Table 8. Effects of Hyponex and peptone in culture medium on root growth and fresh weight of seedlings derived from rhizome. See Fig. 7 for the origin of the rhizome.

Hypo- nex (g/l)	Pep- tone (g/l)	Length of root (cm)	No. of roots (ea)	Fresh weight (g)	Hypo- nex (g/l)	Pep- tone (g/l)	Length of root (cm)	No. of roots (ea)	Fresh weight (g)
1	0	0.8	1.2	0.4	5	0	0.5	1.0	0.4
	1	1.7	1.4	0.3		1	0.5	1.7	0.5
	2	1.5	1.1	0.4		2	0.7	1.9	0.4
	3	0.8	1.5	0.3		3	0.9	0.8	0.4
	4	0.8	1.0	0.2		4	0.2	0.4	0.3
3	0	0.8	0.9	0.2	7	0	0.5	0.5	0.3
	1	1.1	1.7	0.3		1	0.5	0.6	0.3
	2	0.6	0.7	0.4		2	0.3	0.5	0.3
	3	0.4	0.3	0.4		3	0.3	0.3	0.2
	4	0.9	0.9	0.4		4	0.0	0.0	0.2

1-3-2. 置床切片 部位

根莖分化 幼苗生産을 높이기 위하여 種子發芽 後 형성된 6cm 정도의 根莖을 2cm 크기로 先端部, 中間部, 基部로 구분 切斷하여 分化能力을 알아본 결과 Table 9에서 보는 바와 같이 先端部에서 shoot 分化數가 31.0個로 가장 많았으며 shoot 發生 所要日數 133.1日, root 發生 所要日數 140.1日로 中間部와 基部보다 짧게 나타났기 때문에 先端部를 置床하는 것이 가장 양호한 것으로 인정되었다.

Table 9. Effect of the position of segment in rhizome on the redifferentiation of the segment. See Fig. 7 for the origin of the rhizome.

Position in rhizome	No. of shootings (ea)	Duration of shooting (days)	Duration of rooting (days)
Tip	31.0±2.5 ²⁾	133.1±9.1	140.1± 8.7
Middle	21.0±3.7	132.5±5.8	140.5± 9.7
Base	22.0±1.6	136.3±6.8	141.8±11.6
Average	25.7	134.0	138.8

²⁾ $\bar{X} \pm SE$

Table 10. Effect of the position of segment in rhizome on the growth of seedlings redifferentiated. See Fig. 7 for the origin of the rhizome.

Position in rhizome	Plant height (cm)	No. of leaves (ea)	Length of root (cm)	No. of roots (ea)
Tip	6.3±2.8 ²⁾	3.6±0.5	0.7±0.4	2.7±0.5
Middle	6.1±1.7	3.8±0.2	0.8±0.3	2.8±0.1
Base	4.8±0.7	3.4±0.7	0.6±0.3	2.1±0.2
Average	5.7	3.6	0.7	2.5

²⁾ See Table 9.

根莖의 置床部位에 따른 幼苗生育狀況은 Table 10 에서 보는 바와 같이 先端部가 양호하였으며, 寒蘭根莖의 置床切片 部位別 및 置床 切片數에 따른 培養 12個月 後 shoot 分化 幼苗生産에 미치는 영향은 Fig. 9에서 보는 바와 같이 置床切片 부위에서는 先端部가, 切片 置床數에서는 200ml flask에 7個 置床했을 때가 우수한 경향이였다.

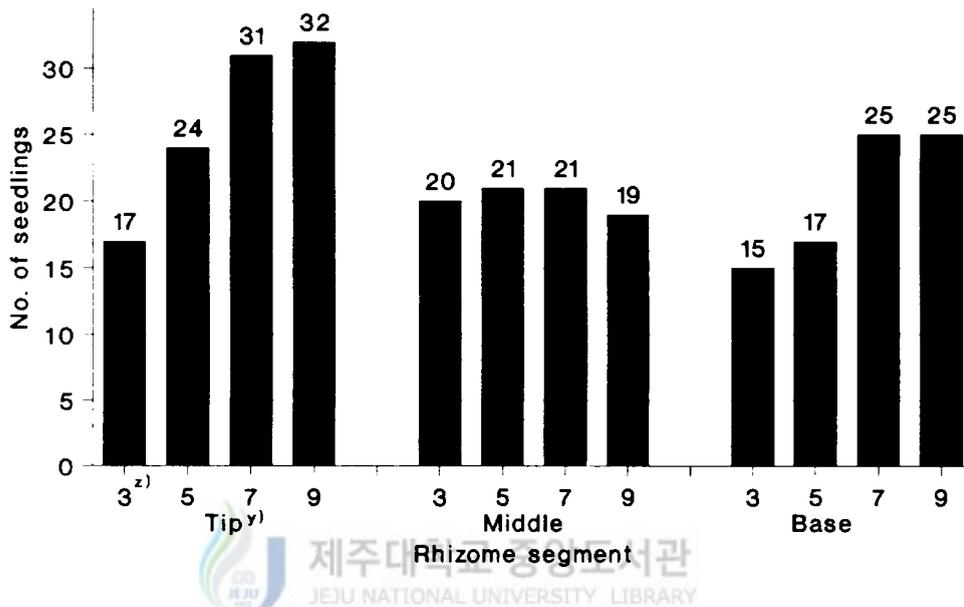


Fig. 9. Number of seedlings produced per 200ml flask as affected by the number of rhizome segments planted per flask and the position of segments in rhizome. See Fig. 7 for the origin of the rhizome.

^{z)} No. of segments per 200ml flask

^{y)} Position of segments in rhizome

寒蘭根莖의 置床切片 部位別 培養 12個月 後 크기별 幼苗 생산량은 Fig. 10에서 보는 바와 같이 先端部에서 31個로 中間部 21個, 基部 25個 보다 많았으며, 이들 중 flask 밖으로 꺼낼 수 있는 草長 10cm 크기 이상의 大苗 생산능력도 根莖 中間部 置床時 33.3%, 基部 4%에 비하여 先端部 置床時는 38.7%으로 가장 많이 生産되어 先端部가 幼苗數 및 大苗生産을 높힐 수 있

었다. 이는 어린 조직이 성숙한 組織에 비해 分化率이 높다는 다수의 연구 결과^(8),102,110)와 일치되었는데 이와 같은 현상은 內生物質 즉 可溶性糖과 不可溶性糖의 相對的 比, 內生生長 調節物質의 보유유무, 分化力을 지닌 세포의 數的 差異 等에 기인하는 것으로 추정되었으며^(60,74) 한편 種子發芽에서 形成된 일반 東洋蘭의 根莖을 置床하게 되면 1次的으로 다수의 tiller를 形成하여 培地속으로 生長하게 되는데 이것들이 용기의 밑부분과 맞닿게 되면 대개의 경우 先端部는 自然적으로 개체가 分化되는 경향이 있다. 따라서 個體 生産을 목적으로 한 根莖의 培養에서는 그 부위별로 구분하였을 때 先端部 組織이 이미 個體를 分化하였거나 혹은 個體分化의 과정중에 있을 확률이 높으므로 根莖 先端部の 個體發生率이 높다는 사실은 오히려 당연한 결과라고 볼 수 있다.

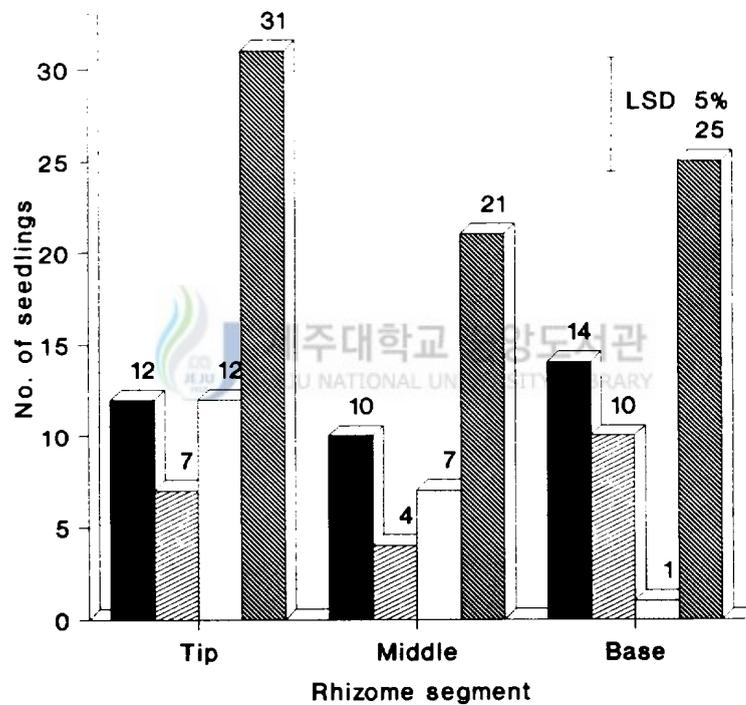


Fig. 10. Distribution of seedlings by plant height produced by tissue-culture for 12 months as affected by the position of segment in rhizome. See Fig. 7 for the origin of the rhizome.

■ Below 5cm ▨ 5 - 10cm
 □ Over 10cm ▩ Total plant

1-4. 組織培養 寒蘭의 栽培

1-4-1. 組織培養 苗의 硬化用土

寒蘭組織培養 苗의 硬化用 用土를 선발코자 器內培養하여 생산된 草長 15cm 크기의 組織培養 苗를 재료로 하여 실험을 수행한 결과는 Table 11에서 보는 바와 같이 生存率은 93~100% 범위로 큰 차가 없었으며, 草長은 盆植할 당시의 生育狀態보다 모든 硬化用土에서 1.9~0.4cm 減少되었으며, 簇數는 모든 硬化用土에서 0.3~0.7個 增加되는 경향을 보였으며, 이들 중에서 地上部 生育량을 가름할 수 있는 簇數의 生育量은 濟州송이가 이용되는 硬化用土도 기준에 주로 많이 사용되는 水苔나 bark의 生育量과 크게 차이가 없었다.

Table 11. Effects of various hardening media on the aboveground growth of *C. kanran* plantlet *in vitro* cultured.

Hardening media	Survival rate (%)	Plant height (cm)	No. of shoots (ea)
Sphagnum moss	100	13.4 $\Delta 1.5^{2)}$	2.3 0.7 ²⁾ a ^{y)}
Bark	100	14.2 $\Delta 0.7$	2.3 0.7 a
Vermiculite	100	13.1 $\Delta 1.8$	2.3 0.7 a
Perlite	100	13.0 $\Delta 1.9$	2.1 0.5 ab
Leaf mold	100	13.7 $\Delta 1.2$	1.9 0.3 b
Scoria (tuff gravel)	100	13.7 $\Delta 1.2$	2.1 0.5 ab
Scoria+Bark	100	14.5 $\Delta 0.4$	2.3 0.7 a
Scoria+Leaf mold	93	13.8 $\Delta 1.1$	2.1 0.5 ab

²⁾ Changes during hardening ; Δ indicates decrease.

^{y)} Mean separation in columns by Duncan's multiple range test, 5% level.

또한 硬化用土가 寒蘭組織培養苗의 地下部 生育과 生體重에 미치는 영향은 Table 12에서 보는 바와 같이 硬化를 위하여 器內에서 꺼내어 移植할 당시의 生育상태보다 根長은 모든 硬化用土에서 2.3~1.0cm 減少되었으며, 根數는 bark와 濟州송이+bark 硬化用土에서 각각 0.6個, 0.1個가 增加되었고 그의 硬化用土는 1.0~0.2個 減少 되었으나, 生體重은 腐葉이 들어있는 硬化用土에서만 減少되었고 그의 用土에서는 0.14~0.34個 增加되는 傾向을 보였는데, 이들 중에서 地下部の 生育量을 가름할 수 있는 根數의 生育量을 보면 bark, 濟州scoria+bark, 水苔 順으로 良好하였다.

Table 12. Effects of various hardening media on the underground growth of *C. kanran* plantlet *in vitro* cultured.

Hardening media	Length of root (cm)		No. of roots (ea)		Fresh weight (g)	
	Mean	Δ	Mean	Δ	Mean	Δ
Sphagnum moss	9.9	Δ1.9 ²⁾	7.3 bc ²⁾	Δ0.3 ²⁾	3.54	0.31 ²⁾
Bark	9.5	Δ2.3	8.2 a	0.6	3.50	0.27
Vermiculite	10.8	Δ1.0	7.3 bc	Δ0.3	3.57	0.34
Perlite	10.4	Δ1.4	7.4 bc	Δ0.2	3.40	0.17
Leaf mold	10.2	Δ1.6	7.4 bc	Δ0.2	3.17	Δ0.06
Scoria	9.8	Δ2.0	6.6 d	Δ1.0	3.40	0.17
Scoria+Bark	9.6	Δ2.2	7.7 ab	0.1	3.37	0.14
Scoria+Leaf mold	9.6	Δ2.2	6.9 cd	Δ0.7	3.00	Δ0.23

^{2), y)} See Table 11.

특히 組織培養苗가 自然環境에 적응하여 생육할 수 있다고 판단되는 新根發生狀況은 Fig. 11에서 보는 바와 같이 新根長을 12個月 後에 조사한 결과 bark에서 1.9cm, 水苔에서 1.6cm, 濟州송이에서 1.1cm로 양호한 경향을 보였으나 水苔는 移植 6個月 後보다 0.5cm 감소하였으며, 新根數도 濟州송이 1.1個, bark 0.9個, 水苔 0.5個로 다른 硬化用土보다 新根發生量이 많은 경향이었는데, 이들의 결과를 요약하면 寒蘭 組織培養苗의 硬化用土는 bark, 水苔, 濟州송이 등을 이용하는 것이 유리한 것으로 인정되었다. 濟州송이는 多孔質의 硬石으로서 粒子의 크기별로 사용할 경우 蘭科植物의 植栽材料의 利用性이 높아 예로부터 濟州地域에서는 自然生産資源인 송이를 蘭栽培에 많이 利用하여 왔으며, 또한 寒蘭 組織培養苗의 硬化用土로 이용시에도 多孔質이면서도 어느정도 比重을 가진 硬石과 用土의 연질성을 높여주는 bark와 혼합되면 移植된 幼苗뿌리에 下重을 주게 되어 灌水時 苗의 쓰러짐을 방지할 수 있었던 것이 效果를 본 것인지 또는 송이자체가 지닌 無機成分²⁷⁾의 부가적인 이용 때문인지 앞으로 이에 대한 연구도 수행되어야 하겠다.

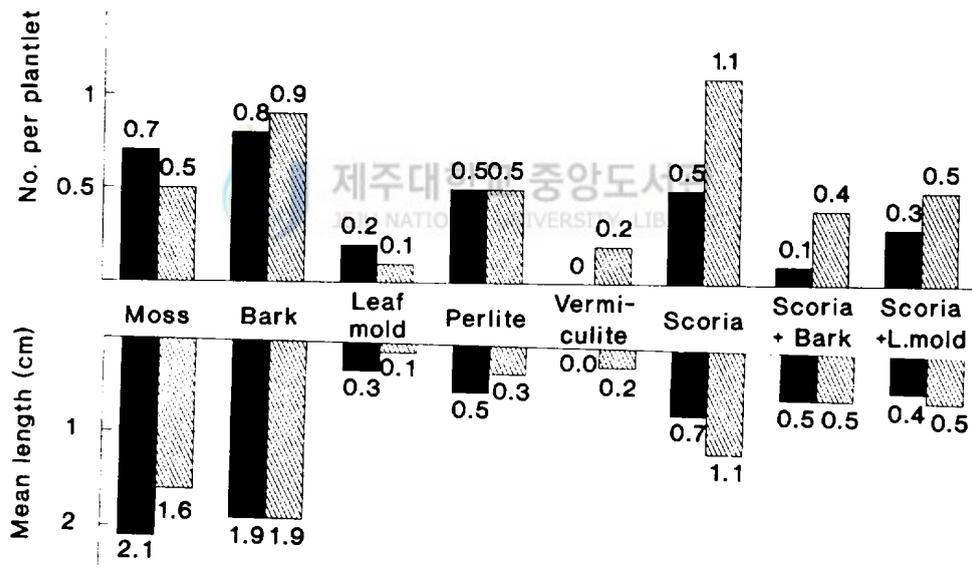


Fig. 11. Number and mean length of new roots of *C. kanran* plantlet *in vitro* cultured as affected by various hardening media.

■ After 6 month ▨ After 12 month

1-4-2. 花盆栽培用 盆土

硬化가 완료된 寒蘭組織培養苗 (草長 10cm 크기)를 蘭盆에 옮겨 심어서 花盆栽培를 위한 盆土 실험 (Fig. 14)을 실시한 결과는 花盆栽培 3年 後 生存率은 Fig. 12에서 보는 바와 같이 日向土+bark (1:1)와 日向土+Hydroball (1:1) 混合用土가 97%, 日向土 (Hiuga soil), pearlclay, 濟州scoria (송이)+ bark (2:1) 93% 順으로 양호하였다.

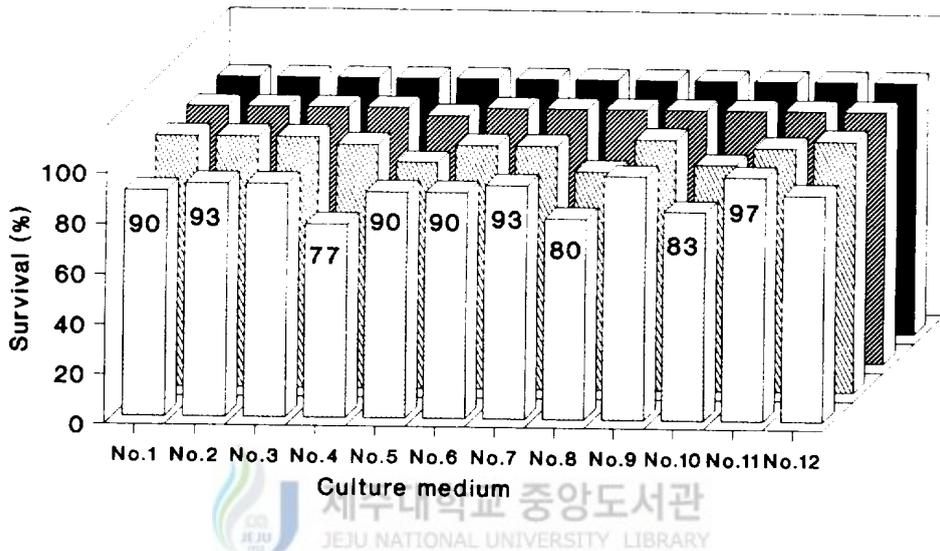


Fig. 12. Survival rate of *C. kanran* plant *in vitro* cultured and hardened after transplanting to various culture media in pot.

After 3 years After 2 years
 After 1 year On pot-planting

No. 1. Leaf mold	No. 7. Scoria+Bark (2:1)
No. 2. Hiuga soil	No. 8. " (3:1)
No. 3. Claybest	No. 9. Hiuga soil+Bark (1:1)
No. 4. Pearlclay	No. 10. " (2:1)
No. 5. Scoria(tuff gravel)	No. 11. Hiuga soil+Hydroball (1:1)
No. 6. Scora+Bark (1:1)	No. 12. " (2:1)

寒蘭組織培養苗의 花盆栽培用 盆土 선택을 위한 몇몇 盆土에 따른 花盆栽培 3年 後 草長의 生育量은 Fig. 13 및 Fig. 15에서 보는 바와 같이 腐葉 12.0cm, 濟州송이+bark (1:1) 9.0cm, 濟州송이+bark (3:1) 6.1cm 順으로 증가하였다.

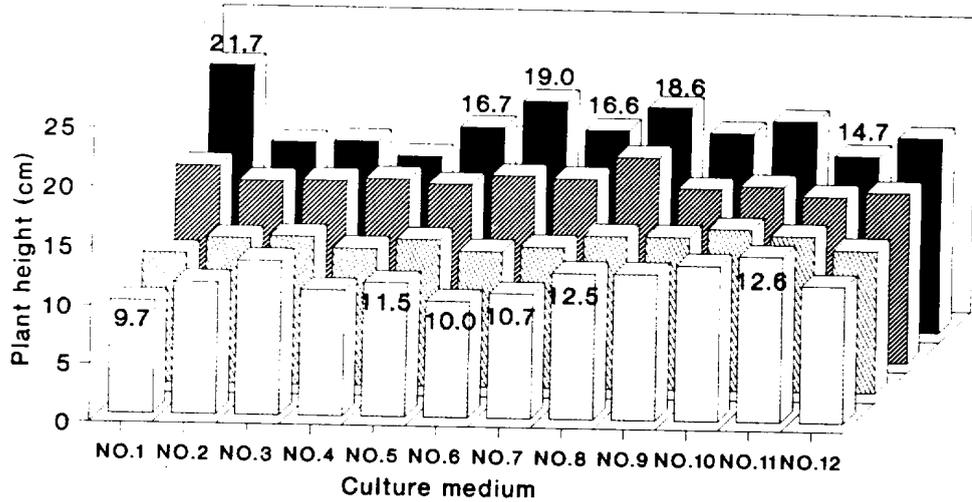


Fig. 13. Plant height of *C. kanran* plant *in vitro* cultured and hardened after transplanting to various culture media in pot.

On pot-planting
 After 1 year

After 2 years
 After 3 years

No. 1. Leaf mold	No. 5 Scoria	No. 9. Hiuga soil+Bark (1:1)
No. 2. Hiuga soil	No. 6 Scoria+Bark(1:1)	No. 10. " (2:1)
No. 3. Claybest	No. 7 " (2:1)	No. 11. Hiuga+Hydroball (1:1)
No. 4. Pearlclay	No. 8 " (3:1)	No. 12. " (2:1)

또한 地上部 生育特性은 Table 13에서 보는 바와 같이 葉數는 盆植 당시의 6.3~11.1個에서 花盆栽培 3年 後 8.3~11.0個로 크게 증가되지 않았지만 이들 중 日向土+Hydroball (2:1)이 3.1個, 濟州송이 2.9個 順으로 증가되었으며, 莖數는 1.7~3.0個에서 3.3~4.2個로 증가되었는데 이들 盆土 中에서는 腐葉이 2.5個, 濟州송이+bark (1:1) 2.1個 順으로 증가하였다.

Table 13. Effects of various culture media in pot on the number of leaves and shoots in *C. kanran* plants *in vitro* cultured and hardened.

Culture medium	No. of leaves (ea)				No. of shoots (ea)			
	Years after				transplanting			
	0	2	3		0	2	3	
Leaf mold	11.1	11.2	11.0	$\Delta 0.1^{2)}$	1.7	3.6	4.2	$2.5^{2)}$ a ^{y)}
Hiuga soil	9.0	10.1	9.2	0.2	2.5	3.4	3.8	1.3 bcd
Claybest	8.3	9.3	8.3	0.0	2.5	3.1	3.4	0.9 cd
Pearlclay	6.8	7.8	8.3	1.5	1.9	2.7	3.0	1.1 cd
Scoria	6.3	10.3	9.2	2.9	2.0	3.2	3.3	1.3 bcd
Scoria+Bark (1:1)	8.8	9.2	10.7	1.9	2.0	2.9	4.1	2.1 ab
" (2:1)	7.8	9.1	9.7	1.9	2.0	3.0	3.5	1.5 bc
" (3:1)	9.4	10.1	10.3	0.9	2.5	3.4	3.5	1.0 cd
Hiuga+Bark (1:1)	7.8	8.4	9.7	1.9	2.8	3.1	3.3	0.5 d
" (2:1)	8.8	9.6	9.6	1.6	3.0	3.3	3.5	0.5 cd
Hiuga soil+Hydroball (1:1)	9.6	9.4	9.9	0.3	3.0	3.3	3.5	0.5 d
" (2:1)	7.9	8.9	11.0	3.1	2.7	3.0	4.0	1.3 bcd

²⁾ Changes for 3 years ; Δ indicates decrease.

^{y)} See Table 11.

寒蘭組織培養苗의 花盆栽培用 盆土 選拔을 위한 몇몇 盆土에 따른 盆植 1年生의 1年間의 地下部 生育特性은 Table 14에서 보는 바와 같이 根長은 4.1~5.8cm에서 1年 後 6.9~10.7cm로 증가되었으며 이들 중 claybest 5.1cm,日向土+bark (1:1) 5.0cm 順으로 증가하였고, 根數는 5.7~8.3個에서 1年 後 5.7~8.9個가 되었으며 이들 중에서는 濟州송이+bark (3:1) 1.7個, 腐葉 1.6個 順으로 증가되었다.

Table 14. Effects of various culture media in pot on root growth and fresh weight of whole plant *C. kanran* plants *in vitro* cultured and hardened.

Culture medium	Length of root (cm)			No. of roots (ea)			Fresh weight (g)		
	Years		3.8 ^{z)}	after		1.6 ^{z)}	transplanting		3.9 ^{y)} ab ^{y)}
	1	2		1	2		1	2	
Leaf mold	4.3	8.1	3.8 ^{z)}	7.3	8.9	1.6 ^{z)}	1.5	5.4	3.9 ^{y)} ab ^{y)}
Hiuga soil	5.2	6.9	1.7	8.3	8.2	△0.1	1.7	4.6	2.9 cd
Claybest	5.6	10.7	5.1	7.0	8.0	1.0	1.6	4.6	3.0 cd
Pearlclay	4.9	9.5	4.6	6.0	7.5	1.5	1.4	4.1	2.7 d
Scoria	5.5	10.1	4.6	7.0	7.5	0.5	1.5	4.0	2.5 d
Scoria-Bark (1:1)	4.3	8.5	4.2	6.2	6.8	0.6	1.3	5.7	4.4 a
" (2:1)	4.1	8.0	3.9	7.3	6.8	△0.5	1.5	4.5	3.0 cd
" (3:1)	5.5	7.9	2.4	7.2	8.9	1.7	1.6	5.2	3.6 b
Hiuga-Bark (1:1)	5.3	10.3	5.0	6.4	7.6	1.2	1.5	4.9	3.4 bc
" (2:1)	5.7	9.4	3.7	7.2	7.9	0.7	2.0	4.6	2.6 d
Hiuga soil+Hydroball (1:1)	5.4	10.1	4.7	6.6	8.1	1.5	2.0	4.9	2.9 cd
" (2:1)	5.8	10.5	4.7	5.7	5.7	0.0	2.1	3.9	1.8 e

^{z)} Changes for one year of the second after transplanting; △ indicates decrease.

^{y)} See Table 11.

硬化가 완료된 寒蘭 組織培養苗의 花盆栽培用 盆土 선발을 위하여 腐葉, 濟州송이, Bark 等으로 단용 및 혼합 盆土를 조성하여 實驗한 결과는 花盆栽培 3年 後 生育量으로 보면 腐葉과 濟州송이 + bark (1:1) 혼합용토가 양호하였다. 이는 Peterson⁸³⁾이 tree-fern fiber, bark, 水苔, perlite 等を 混合하여 蘭의 植栽材料로 사용하는 것이 좋다고 하였고, Karen 等³⁷⁾은 幼苗의 生育에 cedar나 sugar pine bark가 매우 양호하였다고 하였으며, Northen⁷³⁾은 모든 *Cymbidium*類를 bark나 tree-fern만으로 재배할 수 있다고 하였고, 町山⁵²⁾은 春蘭의 盆土로서 腐葉과 赤玉土를 混合하여 利用하면 生育成績이 좋다고 하는 등, 東洋蘭의 植栽材料로서 水苔나 赤玉土, 黑玉土, 鹿沼土 等の 이용에 대한 많은 연구와 유사한 결과를 얻었다.

또한 李⁴⁹⁾는 寒蘭 盆植栽培 시험에서 서나무의 腐葉이 가장 좋았다는 보고를 하였고 각종의 蘭類는 종류·재배방식 等에 따라서 盆土 종류별 生育 성적이 다소 차가 있음이 보고⁸³⁾되었는데, 본 실험에서는 濟州地域에 많이 산재되어 있는 賦存資源인 濟州송이도 寒蘭 組織培養苗의 花盆栽培用 盆土로 이용성이 크다고 관찰되었으며 금후 濟州송이를 盆土로 사용시 物理性 및 化學性 等에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

1-4-3. 自生地 栽培

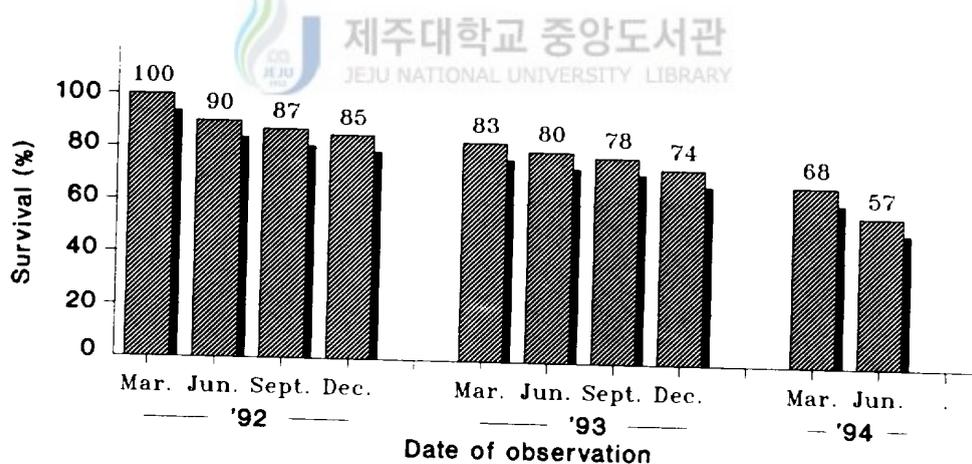


Fig. 14. Changes in survival rate of the plants *in vitro* cultured after transplanting to the natural habitat of *C. kanran* at Sundol (490m above sea level) on the southern part of Mt. Halla.



Fig. 15. Photograph showing growth responses to various culture media in pot of *C. kanran* plant *in vitro* cultured.

Pot. 1. Leaf mold

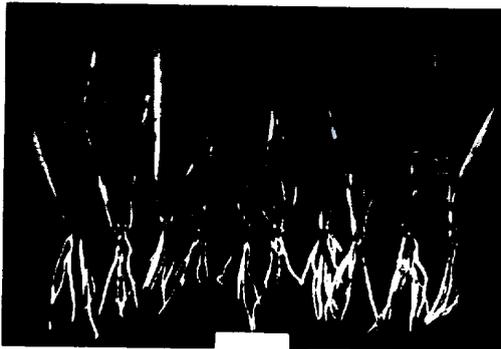
Pot. 2. Hiuga soil

Pot. 5. Cheju-scoria

Pot. 6. Cheju-scoria + Bark (1:1)

Pot. 7. " (2:1)

Pot. 8. " (3:1)



교 중앙도서관
UNIVERSITY LIBRARY

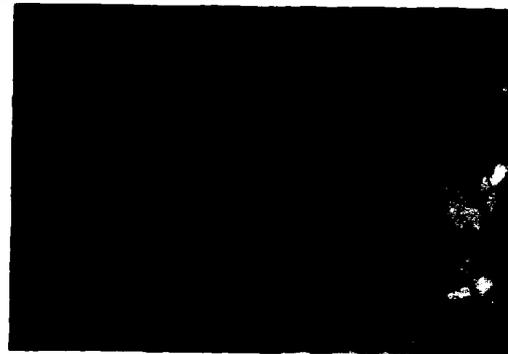


Fig. 16. Photograph showing *C. kanran* plant *in vitro* cultured after growing at natural habitat for two years.

寒蘭組織培養苗의 自生地 재배를 위하여 硬化가 완료된 組織培養苗 1年生 (草長 10 ± 1 cm, 葉數 5 ± 1 個)을 李¹⁹⁾가 寒蘭의 自生地로 환경을 조사한 지점인 漢拏山 선돌지역 (海拔 490m 地點 : 南濟州郡 南元邑)을 선정 3월에 200株 이식하여 실험(Fig. 16)한 결과, 이식 후 재배기간에 따른 生存率은 Fig. 14에서 보는 바와 같이 매년 11~17% 정도 減少되고 있으며, 草長도 Fig. 17에서 보는 바와 같이 移植 당시 10.2cm에서 2年後 9.5cm로 생육이 미미하였지만, 莖數는 이식 당시 2.2個에서 3.5個로 1.3個 增加되는 생육상황을 보였다.

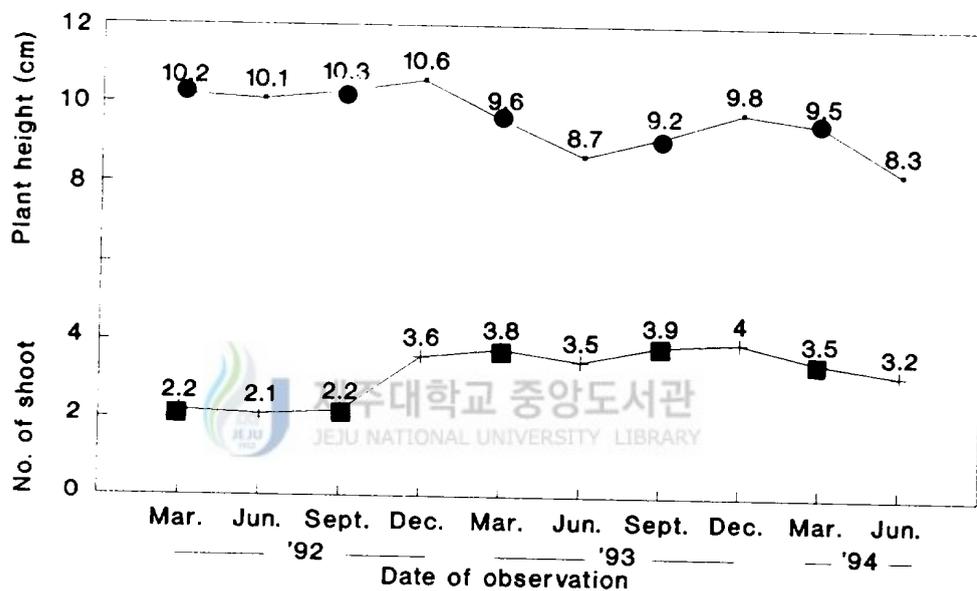


Fig. 17. Changes in plant height and number of shoots of *C. kanran* plant *in vitro* cultured after transplanting to the natural habitat at Sundol (490 m above sea level) on the southern part of Mt. Halla.

● Plant height (cm) ■ No. of shoot

2. 寒蘭의 同位酵素 特性

2-1. 濟州自生 寒蘭의 peroxidase 多形과 類緣關係

2-1-1. Peroxidase 多形

等電點電氣泳動에서 peroxidase (PX) 同位酵素들은 pH 4~6.5 범위에서 분명하게 관찰되었는데 상대적 위치를 구별하기 위하여 pH가 낮은곳에서 높은곳의 band에 차례로 a, b, c, d, e, f, g 등의 문자를 부여하였다. 분석한 45株 寒蘭의 PX 表現型은 同位酵素數와 상대적 위치에 의해 18가지型으로 구분되었다. (Fig. 18)



- | | |
|----------|---------------|
| 1:PX-d | 10:PX-a·c·e |
| 2:PX-f | 11:PX-a·c·f |
| 3:PX-g | 12:PX-b·c·e |
| 4:PX-b·e | 13:PX-b·c·f |
| 5:PX-b·f | 14:PX-b·e·f |
| 6:PX-b·g | 15:PX-c·f·g |
| 7:PX-c·f | 16:PX-a·c·e·f |
| 8:PX-d·f | 17:PX-b·c·e·f |
| 9:PX-d·g | 18:PX-b·c·e·g |

Fig. 18. Peroxidase profiles of Cheju *C. kanran*. PX-a represents the band migrated to the anode fastest. Bands included in each group are represented on the right side.

각 PX 表現型에 속하는 品種 또는 系統名은 Table 15에 나타냈다. 農 21, 農 9, 草戀, 仙鶴, 丹心, 설문대, 春雪, 農 31 등은 각기 고유한 PX 表現型을 가지고 있었으며, 農 27과 農 34, 農 25와 農 29, 長劍과 蕙雨, 農 23과 農 4 등 각쌍들은 동일 表現型을 나타냈다. 3個 이상이 포함된 것은 第 2型에 農 10, 農 15, 農 24, 農 32, 農 33, 農 36 등이, 第 3型에 漢南, 赤一文, 農 12가 第 5型에 農 22, 農 28, 農 30, 農 35 등이 第 7型에 農 1, 農 19, 農 20, 農 37, 農 39, 農 41, 秋一品 등이 第 11型에 農 42, 水岳, 紫鶴, 灰心, 雀舌, 郡鶴 등이 第 14型에 農 2, 農 3, 農 16 등이었다.

Table 15. Classification of 45 Cheju *C. kanran* strains according to peroxidase profiles.

Group No. of PX profile	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PX - a									
PX - b				0	0	0			
PX - c							0		
Compo- sition	0							0	0
PX - d				0					
PX - e									
PX - f		0			0		0	0	0
PX - g			0			0			0
No. of bands	1	1	1	2	2	2	2	2	2
Strains	Nong. 27 ²⁾ Nong. 34	Nong. 10 Nong. 15 Nong. 24	Hanam (漢南) Jeokil- mun	Nong. 21	Nong. 22 Nong. 28 Nong. 30 Nong. 35	Nong. 9	Nong. 1 Nong. 19 Nong. 20 Nong. 37 Nong. 39 Nong. 41 Chuilpum (秋一品)	Choyeon (草戀)	Seonhak (仙鶴)
No. of plants	2	6	3	1	4	1	7	1	1

To be continued.

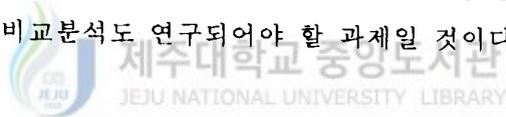
Table 15. Being continued.

Group No. of PX profile	10	11	12	13	14	15	16	17	18	No. of plants
PX - a	0	0					0			3
PX - b			0	0	0			0	0	8
PX - c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
PX - d										3
PX - e	0		0		0		0	0	0	7
PX - f		0		0	0	0	0	0	0	10
PX - g						0				5
No. of bands	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4
Strains	Dansim (丹心)	Nong. 42 Suak (水岳) Jahak (紫葛) Hoesim (灰心) Jakseol(雀舌) Gunhak (郡葛)	Nong. 25 Nong. 29 SeoImun- dae (실문대)	Nong. 2 Nong. 3 Nong. 16	Chun- seol (春雪)	Janggeom (長劍) Haewu (薏雨)	Nong. 23 Nong. 4	Nong. 31		
No. of plants	1	6	2	1	3	1	2	2	1	45

* Strains with name of Nong. No. are parent plants of Cheju C. Kanran for breeding at Cheju Provincial Rural Development Administration.

2-1-2. 類緣關係

PX 表現型에 따라 類別된 寒蘭 18集團 間에 Nei's F-statistics 計算式으로 산출한 遺傳類緣値는 Fig. 19에서 보는 바와 같이 18%에서 86%로 集團 間에 차이를 보였다. 그중 PX-b·c·e band를 가지는 第 12型에 속하는 農 25, 農 29와 PX-b·c·e·f band를 가지는 第 17型에 속하는 農 23, 農 4 그리고 PX-a·c·e band를 가지는 第 10型에 속하는 丹心과 PX-a·c·e·f band를 가지는 第 16型에 속하는 長劍, 蕙雨 등의 集團 사이에는 86%로 가장 높게 나타났다. PX-d band를 가지는 第 1型에 속하는 農 27, 農 34, PX-g band를 가지는 第 3型에 속하는 漢南, 赤一文, 農 12, PX-b·g band를 가지는 第 6型에 속하는 農 9, PX-d·f band를 가지는 第 8型에 속하는 草戀과 PX-d·g band를 가지는 第 9型에 속하는 仙鶴 등 4品種 4系統 集團들은 그외 다른 11品種 26系統들로 구성되는 集團들과는 遺傳類緣値는 18%로 가장 낮게 나타났다. 이러한 同位酵素 分析에 의한 類緣關係는 이들 그룹간에 近緣値를 고려하여 交配組合의 按配에 따른 새로운 寒蘭 品種의 육성에 활용될 수 있을 것으로 예측되어진다. 또한 금후에 여러가지 同位酵素의 分析에 의한 集團의 구분과 생육특성의 多變量 分析法에 의한 集團의 구분과의 비교분석도 연구되어야 할 과제일 것이다.



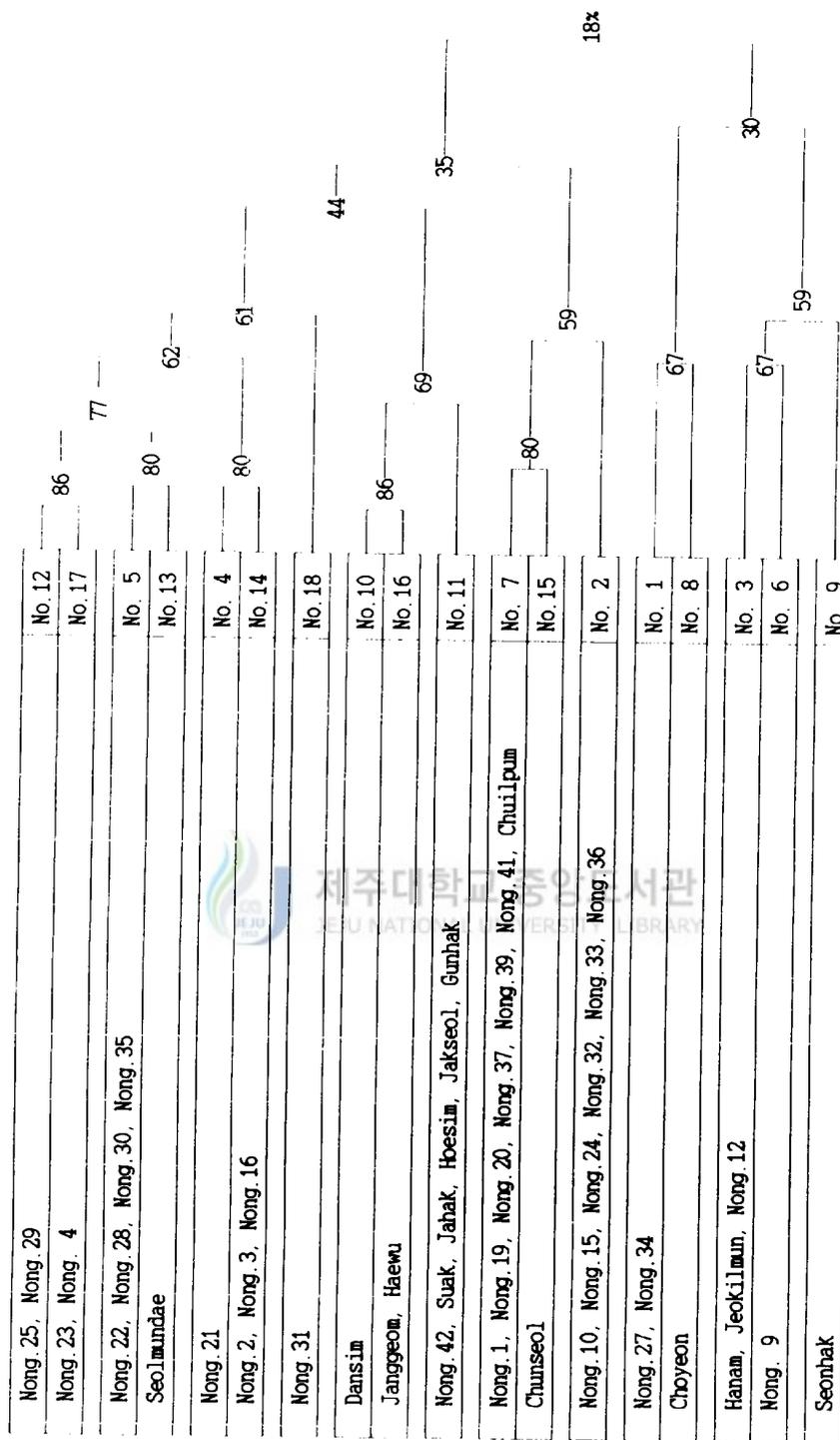


Fig. 19. Dendrogram of 45 Cheju *C. kanran* strains obtained from the analysis by Nei's F-statistics on peroxidase profiles.

2-2. 種子培養 寒蘭의 Peroxidase band 多形

2-2-1. 自家受粉 種子



紫鶴과 丹心 두 品種을
自家受粉시켜 얻은 種子
를 無菌發芽시켜 生産된
組織培養苗 内の PX 同位
酵素 band 表現型은 모두
각각 그 母株인 紫鶴, 丹心
의 PX 同位酵素 band 表現
型和 同一하였다. (Fig. 20.)

Fig. 20. Peroxidase profiles of plantlets obtained by the asymbiotic culture of seeds derived from artificial self-pollination of 'Jahak' and 'Dansim' *C. kanran*.

2-2-2. 他家受粉 種子



仙鶴 (♀) × 紫鶴 (♂) 品
種을 交配하여 얻은 種子
를 無菌發芽시켜 生産된
組織培養苗 内の PX 同位
酵素 band 表現型은 兩親
의 PX 同位酵素 band를
共有하고 있었다. (Fig. 21.)

Fig. 21. Peroxidase profiles of plantlets obtained by the asymbiotic culture of seeds derived from artificial cross-pollination of 'Jahak' and 'Seonhak' *C. kanran* and their parent plants.

또한 他家受粉된 寒蘭에 달린 1個의 꼬투리에서 얻어진 종자를 몇개의 플라스크에 나누어 播種하여 器內 培養한 후 生産된 10cm 크기의 組織培養苗 잎의 PX 同位酵素 band 表現型은 同一 플라스크內的 各 株間이나 여러개 플라스크 내에 播種되어 배양된 植物體 間에도 同一하게 나타났다. (Fig. 22)

同位酵素的 對立因子는 共同優性으로 작용하기 때문에 異型接合 상태인 개체와 同型接合 상태인 개체와의 구별이 용이하며 brussels sprout 에서는

AcPH⁷²⁾, 토마토에서는 alcohol dehydrogenase⁹⁶⁾, 무우에서는 AcPH와 MDH³⁸⁾ 同位酵素가 F₁의 種子의 純度 檢定에 이용되고 있다. 이 실험에서 同一 꼬투리 안의 종자를 여러개의 플라스크에 培養해도 PX 表現型이 같게 나타나는 것으로 미루어 種子培養寒蘭의 交配組合에 대한 遺傳標識로 PX 同位酵素가 이용될 수 있을 것으로 생각되었다.

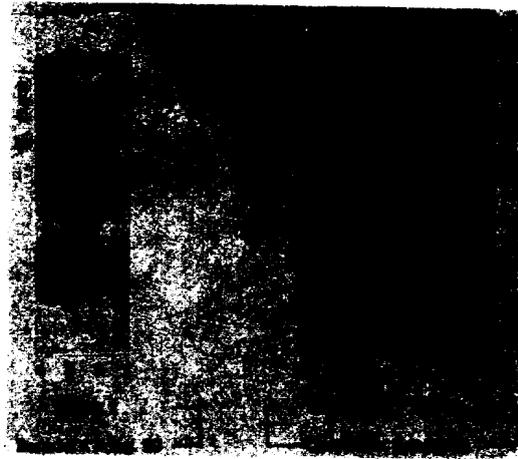
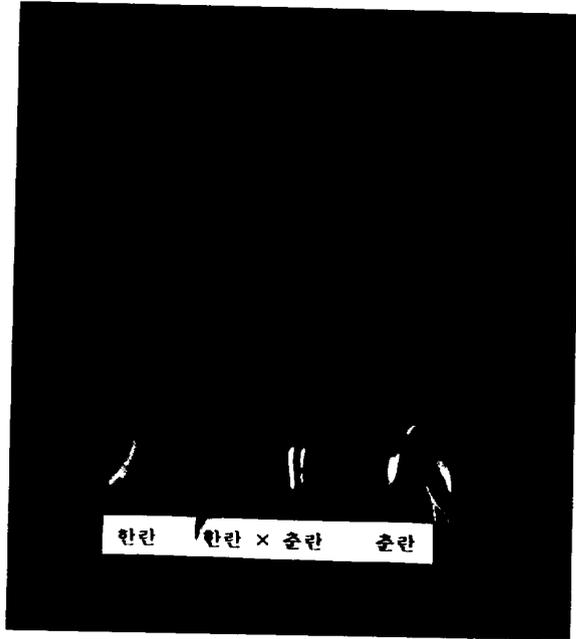


Fig. 22. Peroxidase profiles of plantlets obtained by the asymbiotic culture of seeds derived from artificial cross-pollination of 'Dansim × Nong. 29' and 'Choyeon × Janggeom' *C. kanran*.

2-3. 寒蘭과 溫帶産 *Cymbidium* 交雜種의 生育 및 同位酵素 多形

2-3-1. 寒蘭과 春蘭 交雜種



寒蘭을 母本으로 春蘭을 交配하여 器內에서 6個月間 培養한 식물체 生育狀況은 Fig. 23에서 보여 주는 바와 같이 葉폭과 葉장이 寒蘭과 春蘭의 中間 크기와 폭을 가지고 있으며 특히 春蘭의 대표적인 구별방법인 3줄의 葉맥과 잎의 거치가 거의 없고 寒蘭에 가까운 葉형을 나타내었다. 이 결과는 田原¹²⁾과 崔等⁸⁾이 온대산 *Cymbidium* 交

Fig. 23. Growth characteristic of the hybrid (center) of *C. kanran* (♀, left) × *C. goeringii* (♂, right).

雜種 1세대에서 表現型은 일부형질이 兩親의 中間型으로 나타났다는 보고와 일치하였다.

寒蘭을 母本으로 春蘭을 교배하여 器內 培養한 植物體의 同位酵素 band pattern은 Fig. 24-1, Fig. 24-2에서 보는 바와 같이 AcPH 同位酵素 band 發現은 寒蘭에서는 10個, 春蘭에서는 12個, 寒蘭과 春蘭의 交雜種에서는 9個가 發現되었으며, 그 중 6個의 band가 다같이 共有되고 있었다. Estrase 同位酵素 band는 寒蘭에서는 8個, 春蘭에서는 1個, 寒蘭과 春蘭의 交雜種에서는 3個가 發現되었으며, 그 중 1個의 band가 다같이 共有되고 있었다. MDH 同位酵素가 發現되는 band數는 寒蘭에서는 6個, 春蘭에서는 9個, 寒蘭과 春蘭의 交雜種에서는 9個였으며, 그 중 5個의 band가 다같이 共有되고 있었다. ME 同位酵素 band 發現은 寒蘭에서는 3個, 春蘭에서는 3個, 寒蘭과 春

蘭의 交雜種에서는 1個였으며, 그 중 1個의 band가 다같이 共有되고 있었다. PX 同位酵素는 寒蘭에서는 8個, 春蘭에서는 8個, 寒蘭과 春蘭의 交雜種에서는 7個의 band가 發現되었으며, 그 중 3個의 band가 다같이 共有되고 있었다. PGM 同位酵素 band는 寒蘭에서는 2個, 春蘭에서는 3個, 寒蘭과 春蘭의 交雜種에서는 1個가 發現되었으며, 그중 1個의 band가 다같이 共有되고 있었다. PGI 同位酵素 band는 寒蘭에서는 2個, 春蘭에서는 3個, 寒蘭과 春蘭의 交雜種에서는 2個가 發現되었으며, 그 중 2個의 band가 다같이 共有되고 있었다. SOD 同位酵素 band는 寒蘭에서는 9개, 春蘭에서는 7개, 寒蘭과 春蘭의 交雜種에서는 6개가 發現되었으며, 그 중 2개의 band가 다같이 共有되고 있다.

이상의 寒蘭과 春蘭의 根莖이나 서로의 交雜種의 根莖을 이용한 同位酵素 檢定 결과 AcPH, estrase, MDH, ME 및 PX 同位酵素 band가 선명하게 發現되어 遺傳標識로 이용할 수 있을 것으로 생각되었다. 酵素의 종류에 따라 band의 차이가 명확하게 나타나는 것과 不確實하거나 band가 나타나지 않은 酵素도 존재하였다. 이는 白等⁷⁹⁾이 培養한 根莖에 대한 12가지의 同位酵素를 분석한 결과 MDH, 6-PGD, PGI, PGM 및 AcPH가 遺傳標識로 이용이 가능하다고 한 結果와 AcPH와 MDH 2種은 일치하였으며 estrase, ME 및 PX 3種은 遺傳標識로 이용될 수 있음이 본 연구에서 추가적으로 밝혀졌다.



Fig. 24-1. Zymograms and their schematic illustrations for acid phosphatase (AcPH), esterase, malate dehydrogenase (MDH) and malic enzyme (ME) enzyme systems.

Channel 1, *C. kanran* : channel 2, *C. kanran* (♀) × *C. goeringii* (♂)
: channel 3, *C. goeringii*.



Fig. 24-2. Zymograms and their schematic illustrations for peroxidase (PX), phosphoglucomutase (PGM), phosphoglucose isomerase (PGI), superoxide dismutase (SOD) enzyme systems.

Channel 1, *C. kanran* : channel 2, *C. kanran* (♀) × *C. goeringii* (♂) : channel 3, *C. goeringii*.

2-3-2. 寒蘭과 竹栢蘭 交雜種

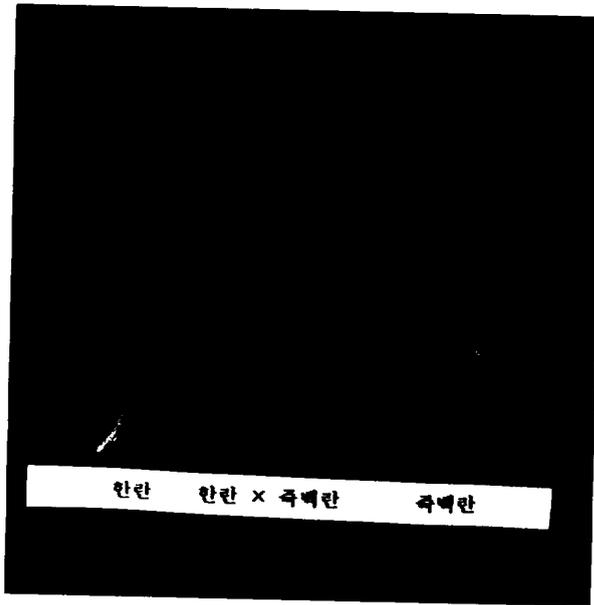


Fig. 25. Growth characteristic of the hybrid (center) of *C. karran* (♀, left) × *C. lancifolium* (♂, right)

寒蘭을 母本으로 竹栢蘭을 交配하여 器內에서 6個月間 培養한 식물체 生育狀況은 Fig. 25에서 보여 주는 바와 같이 寒蘭과 竹栢蘭 中間형태의 초장과 엽폭을 나타내며, 이 결과는 田原¹²⁾과 崔等⁸⁾이 溫帶産 *Cymbidium* 交雜 1世代에서 表現型은 일부 형질이 兩親의 中間型으로 나타났다는 보고와 일치하였으며, 交雜種들의 경우에는 器內에서 開花한 결과를 보

전데 寒蘭의 향기가 삽입됨을 볼 수 있었으며 특히 산반무늬를 띄우는 현상은 種間 交雜에 의해 자연적인 變異發生이 유도되지 않았나 보겠다. 또한 비록 器內이기는 하지만 3~5월에 화경이 竹栢蘭의 형태로 출현하며 1葉당 2個의 녹색꽃이 開花하였는데 寒蘭과같이 다수의 花芽는 발생하지 않았다.

寒蘭을 母本으로 竹栢蘭을 交配하여 器內 培養한 植物體의 同位酵素 band pattern은 Fig. 26-1, Fig. 26-2에서 보는 바와 같이 AcPH 同位酵素 band 發現은 寒蘭에서는 10個, 竹栢蘭에서는 6個, 寒蘭과 竹栢蘭의 交雜種에서는 9個가 發現되었으며, 그 중 2個의 band가 다같이 共有되고 있었다. Estrase 同位酵素 band는 寒蘭에서는 8個, 竹栢蘭에서는 12個, 寒蘭과 竹栢蘭의 交雜種에서는 8個가 發現되었으며, 그 중 6個의 band가 다같이 共有되고 있었다. MDH 同位酵素가 發現되는 band數는 寒蘭에서는 6個, 竹栢蘭

에서는 8個, 寒蘭과 竹栢蘭의 交雜種에서는 5個였으며, 그 중 1個의 band가 다같이 共有되고 있었다. ME 同位酵素 band 發現은 寒蘭에서는 3個, 竹栢蘭에서는 5個, 寒蘭과 竹栢蘭의 交雜種에서는 5個가 發現되었으며, 그 중 1個의 band가 다같이 共有되고 있었다. PX 同位酵素는 寒蘭에서는 8個, 竹栢蘭에서는 8個, 寒蘭과 竹栢蘭의 交雜種에서는 5個의 band가 發現되었으며, 그 중 4個의 band가 다같이 共有되고 있었다. PGM 同位酵素 band는 寒蘭에서는 2個, 竹栢蘭에서는 1個, 寒蘭과 竹栢蘭의 交雜種에서는 2個가 發現되었으며, 그 중 1個의 band가 다같이 共有되고 있었다. PGI 同位酵素 band는 寒蘭에서는 2個, 竹栢蘭에서는 3個, 寒蘭과 竹栢蘭의 交雜種에서는 3個가 發現되었으며, 그 중 2個의 band가 다같이 共有되고 있었다. SOD 同位酵素 band는 寒蘭에서는 9개, 竹栢蘭에서는 6개, 寒蘭과 竹栢蘭의 交雜種에서는 10개가 發現되었으며, 그 중 3개의 band가 다같이 共有되고 있었다.

이상의 寒蘭과 竹栢蘭의 根莖이나 서로의 交雜種의 根莖을 이용한 同位酵素 檢定 결과 AcPH, estrase, MDH, ME 및 PX 同位酵素 band가 선명하게 發現되어 遺傳標識로 이용할 수 있을 것으로 생각되었다. 酵素의 종류에 따라 band의 차이가 명확하게 나타나는 것과 불확실하거나 band가 나타나지 않은 酵素도 존재하였다. 이는 白等⁷⁹⁾이 培養한 根莖 12가지의 同位酵素를 분석한 결과 MDH, 6-PGD, PGI, PGM 및 AcPH가 遺傳標識로 이용이 가능하다고 한 결과와 AcPH, MDH, 2種은 일치하였으며 estrase, ME 및 PX 3種은 遺傳標識로 이용할 수 있음이 본 연구에서 추가적으로 밝혀졌다.

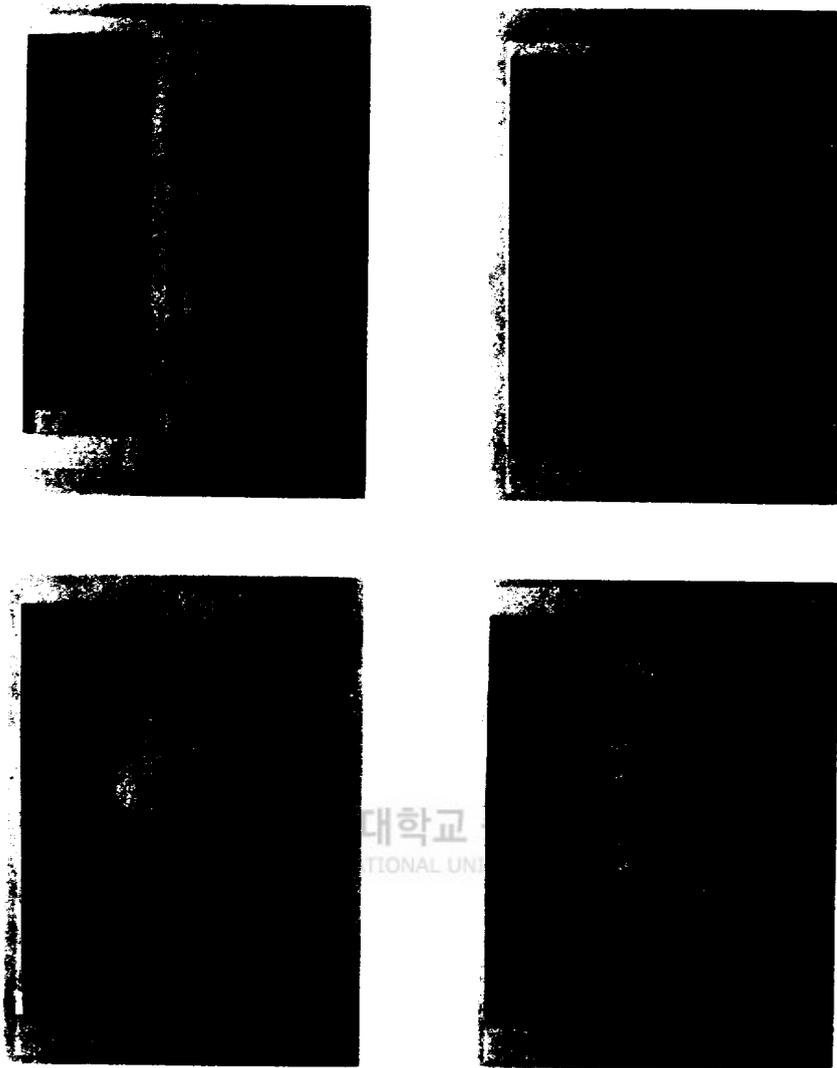


Fig. 26-1. Zymograms and their schematic illustrations for acid phosphatase (AcPH), esterase, malate dehydrogenase (MDH) and malic enzyme (ME) enzyme systems.

Channel 1, *C. kanran* : channel 2, *C. kanran* (♀) × *C. Lancifolium* (♂) : channel 3, *C. Lancifolium*.

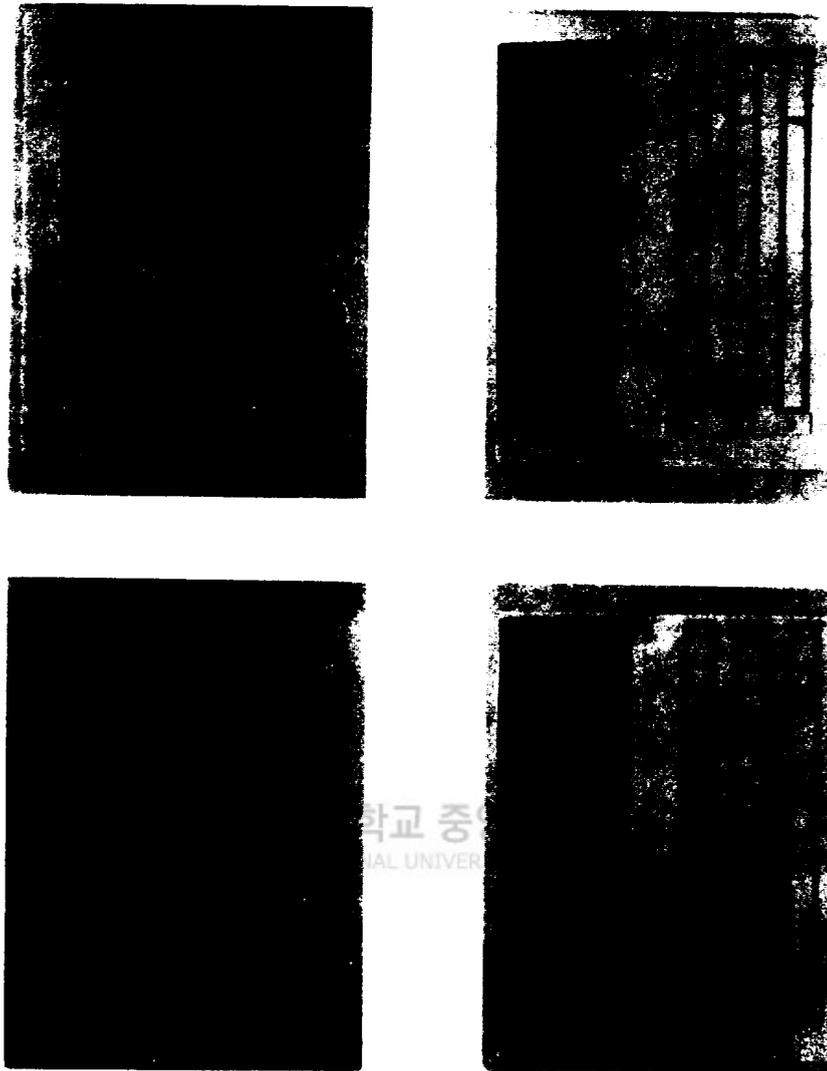
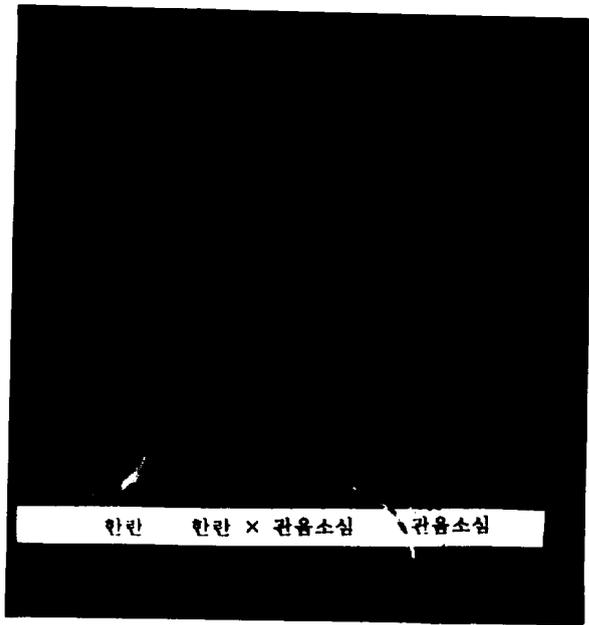


Fig. 26-2. Zymograms and their schematic illustrations for peroxidase (PX), phosphoglucomutase (PGM), phosphoglucose isomerase (PGI), superoxide dismutase (SOD) enzyme systems.

Channel 1, *C. kanran* : channel 2, *C. kanran* (♀) × *C. Lancifolium* (♂) : channel 3, *C. Lancifolium*.

2-3-3. 寒蘭 × 觀音素心



寒蘭을 母本으로 觀音素心을 交配하여 器內에서 6개월간 培養한 植物體 生育 狀況은 Fig. 27에서 보여 주는 바와 같이 초형, 엽폭, 엽장 모두 寒蘭과 觀音素心の 中間형태를 나타내지만 잎두께와 윤택도는 觀音素心に 가까왔으며 成鉢에서는 寒蘭과 같은 다수의 花數와 화형을 가지며 향기가 있고 生育 速度가 빠르며 新鉢의 發

Fig. 27. Growth characteristic of the hybrid (center) of *C. kanran* (♀, left) × *C. gyikuchin* var. *sosin* (♂, right). 제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY 월등히 많았다. 또한 開花期는 觀音素心과 寒蘭의 開花期의 中間시기인 8~10月 사이였는데, 이 결과는 田原¹²⁾과 崔 等⁸⁾이 온대산 *Cymbidium* 交雜 1世代에서 表現型은 일부 형질이 兩親의 中間型으로 나타났다는 보고와 일치하였으며, 이상에서 관찰한 3種의 種間雜種은 현상의 증거가 강하게 나타나므로 앞으로 種間 雜種 작출을 위한 많은 시도가 이루어져야겠고, 본 시험과 반대적인 처리 즉 寒蘭을 花盆親으로 했을때의 雜種形을 작출하여 遺傳분리현상을 체계화할 수 있는 연구가 요망된다 하겠다.

寒蘭을 母本으로 觀音素心을 交配하여 器內 培養한 植物體의 同位酵素 band pattern은 Fig. 28-1, Fig. 28-2에서 보는 바와 같이 AcPH 同位酵素 band 發現은 寒蘭에서는 10個, 觀音素心에서는 7個, 寒蘭과 觀音素心の 交

雜種에서는 8個가 發現되었으며, 그 중 4個의 band가 다같이 共有되고 있었다. Estrase 同位酵素는 寒蘭에서는 8個, 觀音素心에서는 12個, 寒蘭과 觀音素心の 交雜種에서는 5個가 發現되었으며, 그 중 4個의 band가 다같이 共有되고 있었다. MDH 同位酵素가 發現되는 band數는 寒蘭에서는 6個, 觀音素心에서는 10個, 寒蘭과 觀音素心の 交雜種에서는 6個였으며, 그 중 2個의 band가 다같이 共有되고 있었다. ME 同位酵素 band 發現은 寒蘭에서는 3個, 觀音素心에서는 4個, 寒蘭과 觀音素心の 交雜種에서는 2個였으며, 그 중 2個의 band가 다같이 共有되고 있었다. PX 同位酵素는 寒蘭에서는 8個, 觀音素心에서는 6個, 寒蘭과 觀音素心の 交雜種에서는 4個의 band가 發現되었으며, 그 중 4個의 band가 다같이 共有되고 있었다. PGM 同位酵素 band는 寒蘭에서는 2個, 觀音素心에서는 2個, 寒蘭과 觀音素心の 交雜種에서는 1個가 發現되었으며, 그 중 1個의 band가 다같이 共有되고 있었다. PGI 同位酵素 band는 寒蘭에서는 2個, 觀音素心에서는 4個, 寒蘭과 觀音素心の 交雜種에서는 1個가 發現되었으며, 그 중 1個의 band가 다같이 共有되고 있었다. 그 중 2個의 band가 다같이 共有되고 있었다. SOD 同位酵素 band는 寒蘭에서는 9개, 觀音素心에서는 6개, 寒蘭과 觀音素心の 交雜種에서는 7개가 發現되었으며, 그 중 2개의 band가 다같이 共有되고 있었다.

이상의 寒蘭과 觀音素心の 根莖이 서로의 交雜種의 根莖을 이용한 同位酵素 檢정 결과 AcPH, estrase, MDH, ME 및 PX 同位酵素band가 선명하게 發現되어 遺傳標識로 이용할 수 있을 것으로 생각되었다. 酵素의 종류에 따라 band의 차이가 명확하게 나타나는 것과 불확실하거나 band가 나타나지 않은 酵素도 존재하였다. 이는 白等⁷⁹⁾이 培養한 根莖에 대한 12가지의 同位酵素를 분석한 결과 MDH, 6-PGD, PGI, PGM 및 AcPH가 遺傳標識로 이용이 가능하다고 한 결과와 AcPH, MDH, 2種은 一致하였으며 estrase, ME 및 PX 3種은 遺傳標識로 이용할 수 있음이 본 연구에서 추가적으로 밝혀졌다.

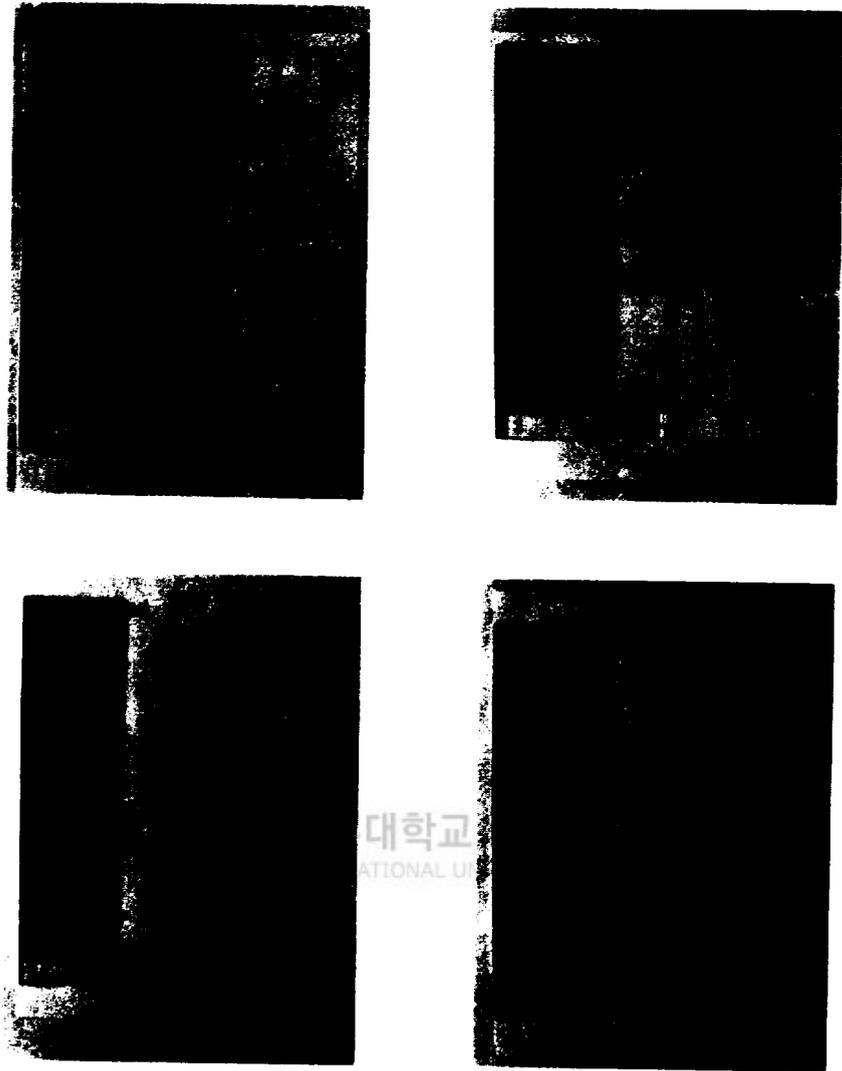


Fig. 28-1. Zymograms and their schematic illustrations for acid phosphatase (AcPH), esterase, malate dehydrogenase (MDH), and malic enzyme (ME), enzyme systems.

Channel 1, *C. kanran* : channel 2, *C. kanran* (♀) × *C. gyikuchin* var. *sosin* (♂) : channel 3, *C. gyikuchin* var. *sosin*.

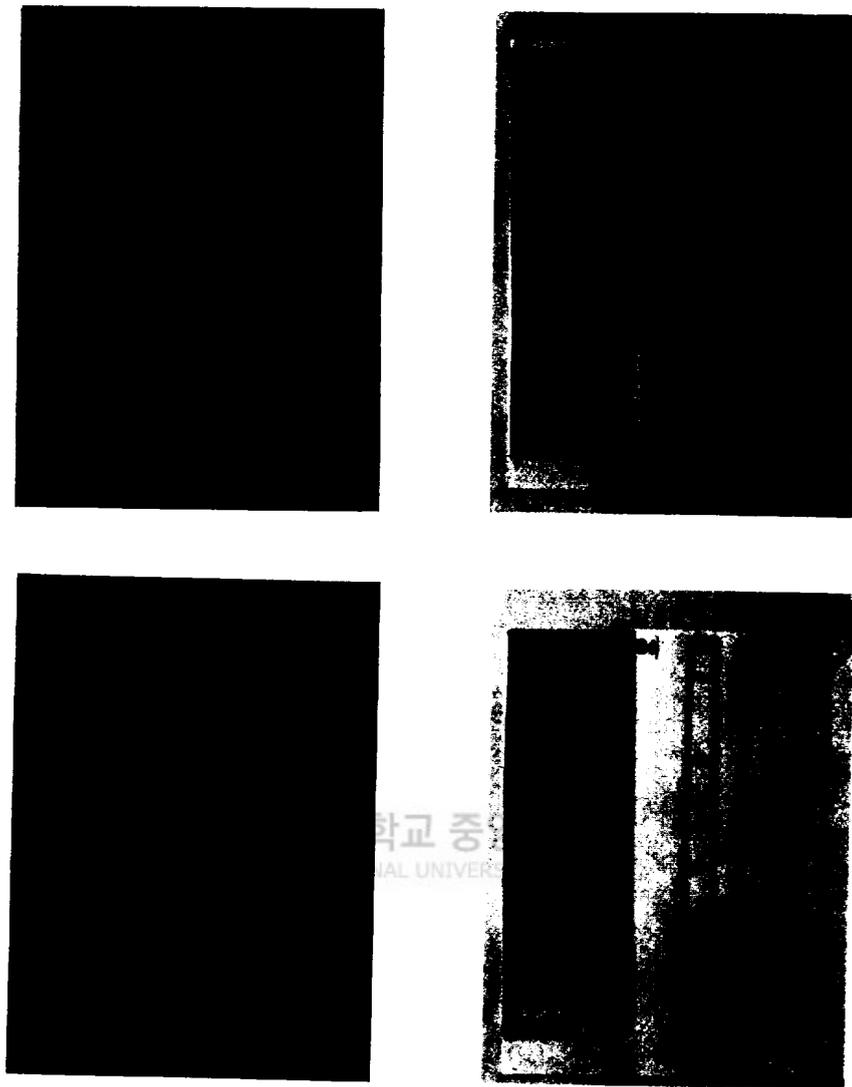


Fig. 28-2. Zymograms and their schematic illustrations for peroxidase (PX), phosphoglucomutase (PGM), phosphoglucose isomerase (PGI), superoxide dismutase (SOD) enzyme systems.

Channel 1, *C. kanran* : channel 2, *C. kanran* (♀) × *C. gyikuchin* var. *sosin* (♂) : channel 3, *C. gyikuchin* var. *sosin*.

V. 綜合考察

본 연구는 濟州寒蘭 組織培養苗의 産業的 多量生産技法과 培養苗의 栽培法을 확립하기 위하여 交配組合에 따른 發芽特性, 種子의 無菌發芽條件, shoot 分化條件, 組織培養苗의 硬化用土와 花盆栽培用 盆土 등을 검토하였으며, 더불어 濟州寒蘭의 新品種育成時 이용할 수 있는 遺傳標識를 탐색하기 위하여 濟州白生 寒蘭과 種子培養 寒蘭의 peroxidase 多形과 寒蘭×溫帶産 *Cymbidium* 交雜種의 生育 및 數種의 同位酵素 多形을 분석 실험을 수행하였다.

寒蘭의 종자 無菌發芽株 生産을 위한 交配組合에 따른 종자의 生理的 特性은 他家受粉이 自家受粉보다 종자 莢 形成率 (66.7%)은 낮았으나, 稔性比率 (80.0%)이 높아 번식재료로 이용되는 종자생산이 용이하였으며, 채종하여 파종하였을 때도 종자 無菌發芽는 他家受粉種자가 106日로 白等⁸¹⁾이 온 대신 *Cymbidium* 發芽所要日數가 119~453日이라고 보고한 것 보다는 발아가 빨리 진행되었으며, 器內 種子無菌培養에 있어서 종자 播種 後 짧은 기간내에 無菌發芽를 시킨 다음 根莖形成 (0.5cm 크기)을 높힐수 있는 배양기 술로는 Murashige and Skoog (MS) 培地에나 寒天을 넣지 않은 液體培地에 파종하여 暗培養하는 것이 파종 12個月 後 파종 flask數의 40%가 발아되어 가장 양호한 결과를 얻었는데, 이는 日本에서 Kokube 等⁴⁴⁾이, 국내에서는 李 等³⁶⁾의 연구결과와 일치하였다. 이 실험결과로 번식이 기본이 되는 根莖形成에 가장 양호한 使用培地種類, 培地物理性 및 光環境이 구명되었다.

增殖된 根莖 (2cm 크기)을 置床하여 단기간에 shoot를 分化시켜 幼苗 (草長 3cm 크기) 生産을 꾀할 수 있는 기법을 실험한 결과는 Hyponex 5g/l + peptone 2g/l + rutin 100mg/l 培地에 pH 5.3로 조정하여 23±2℃ 온도를 유지하면서 5個月 동안 明培養 (1,000lux 16시간 照明/1日)하면, 草長 3cm 크기의 幼苗를 94% 얻을수 있는 培地가 구명되었는데, 이는 鄭과 全^{29,31)}이 *Cymbidium ensifolium*에서 Hyponex 3g/l, peptone 4g/l 培地에서 양호하였다는 보고와 유사하였다. 또한 根莖分化와 幼苗生産을 높힐 수 있

는 根莖의 置床切片 部位는 先端部였으며, 200ml flask의 置床切片數는 7個가 効果적이었고, 置床 12個月後에 根莖 分化數는 先端部 31個에 比하여 中間部 21個, 基部 25個 였는데, 이들 中 flask 밖으로 꺼낼수 있는 草長 10cm 크기 이상의 幼苗 生産능력은 根莖 中間部 置床時 Shoot 分化數의 33.3%, 基部 4%에 比하여 先端部 置床時는 38.7%의 幼苗가 生産되었는데, 이는 어린 組織이 성숙한 組織에 比하여 分化率이 높다는 다수의 연구결과^{85,102,110)}와 일치하였으며, 이와 같은 현상은 內生物質과 分化力을 지닌 細胞의 數的差異 等에 기인하는 것으로 추정되었다.^{90,74)}

組織培養 寒蘭의 실용적인 재배기술을 확립하기 위하여 器內에서 培養된 組織培養苗를 외부환경에서 재배 하기 위해서는 우선 組織培養苗의 硬化用土를 선발해야 하는데 본 실험에서는 여러가지 用土를 사용하여 1年 재배해본 결과는 水苔, 濟州송이 (scoria) 및 bark가 적합하였으며, 다음 단계인 硬化가 完了된 寒蘭 組織培養苗 (草長 10cm 크기)의 花盆栽培用 盆土 선발에서도 自生地 腐葉과 濟州송이 + bark (1:1) 混合盆土가 生育이 양호하였는데, 이는 Peterson⁸³⁾이 蘭의 盆土로 水苔, bark가, Northen⁷³⁾은 *Cymbidium*類는 bark가, 李⁴⁹⁾는 寒蘭의 盆土로서 서나무 腐葉이 양호했다는 보고와 유사하였으며, 이 결과로 濟州地域의 賦存資源인 濟州송이의 산업적 이용 측면도 있을 것으로 사료되었으며, 더 나아가서 寒蘭 組織培養株의 自生地 栽培를 위하여 自生地인 漢拏山 선돌지역 (海拔 490m 地點 : 南濟州郡 南元邑)에 이식한 것이 移植 2年 後 生存率이 68%이며 鱗數가 증가되는 것을 보면 自生地 復元도 가능할 것으로 예측되어지고 있다.

새로운 濟州特産 한란품종 育種基礎를 위하여 濟州自生寒蘭과 組織培養寒蘭을 供試하여 等電點電氣泳動法에 의한 peroxidase (PX) band pattern을 보면 7個의 band가 發現되었다. 供試된 自生寒蘭 45株는 系統에 따라 1個에서 4個의 band를 가지고 있었으며, 그 表現型은 18 groups로 구분되었다. 구분된 각 group 間에 Nei's F-statistics 計算式에 의한 genetic distance values는 PX-b·c·e型과 PX-b·c·e·f 型과 같이 近緣值가 89%로 높게 나타내는 group이 있는가 하면 PX-f 型과 PX-d 型처럼 近緣值가 18

%로 나타나는 group이 있었는데 이들 그룹간에 近緣值를 고려한 交配組合의 按配에 따른 새로운 濟州特産 寒蘭 품종의 육성에 활용할 수 있을 것으로 예측되었다. 또한 自家受粉種子로 배양된 寒蘭의 同位酵素 PX band pattern은 母株와 種子 培養株 間에 동일한 형태를 보였으나, 他家受粉種子로 배양된 寒蘭의 PX band pattern은 父親이 發現하는band 와 母親이 發現하는 band를 共有하고 있는 것이 밝혀졌다.

寒蘭과 몇가지 溫帶産 *Cymbidium*과의 交雜種에 대한 식물체 및 同位酵素 특성을 알아보기 위하여 寒蘭을 母本 (우)으로 하고 春蘭, 竹栢蘭, 觀音素心 등을 花粉親으로 한 각각의 交配 種子를 器內 培養한 식물체는 일부 형질에 있어서 兩親形質의 中間形을 나타내는 경향을 보여주었는데, 이 결과는 H原¹²⁾와 崔 等⁵⁾이 온대산 *Cymbidium* 交雜 1世代에서 表現型은 일부 형질이 兩親의 中間型으로 나타났다는 보고와 일치되는 경향이였다. 또한 他家受粉에서 얻은 根莖의 同位酵素 表現型은 兩親이 가지고 있는 band를 받아 兩親과는 다른 새로운 band型이나 활성에 뚜렷한 차이가 있어 白 等⁷⁹⁾의 培養 rhizome의 同位酵素 검정 연구에서 韓國春蘭, 濟州寒蘭, 濟州寒蘭×韓國春蘭 間에 band 樣相과 활성을 비교하여 보고한 결과와 유사한 경향이였다. 白 等⁷⁹⁾은 水平形 전분 겔 電氣泳動으로 酵素系를 분석하여 6-PGD (6-phosphogluconate dehydrogenase), AcPH, MDH, PGI 및 PGM 등 5酵素系가 遺傳標識로 이용될 수 있다고 보고하였는데 等電點 電氣泳動法을 이용한 본 연구에서 6-PGD는 분석대상에 포함되지 않았으며 PGI와 PGM은 band pattern이 뚜렷하지 않았다. 그러나 esterase, ME 및 PX등 3酵素系가 추가로 遺傳標識로 이용할 수 있음을 알아냈다. 따라서 본 연구에서 遺傳標識로 이용할 수 있는 것으로 확인된 酵素系는 AcPH, esterase, MDH, ME 및 PX등 5종류이다.

VI. 摘 要

濟州寒蘭 組織培養苗의 產業的 多量生産技法과 培養苗의 栽培法을 확립하기 위하여 交配組合에 따른 發芽特性, 種子의 無菌發芽條件, shoot 分化條件, 組織培養苗의 硬化用土와 花盆栽培用 盆土 등을 검토하였으며, 더불어 濟州寒蘭의 品種育成時 이용할 수 있는 遺傳標識를 탐색하기 위하여 濟州白生 寒蘭과 種子培養 寒蘭의 peroxidase 多形과 寒蘭×溫帶産 *Cymbidium* 교잡種의 生育 및 數種의 同位酵素 多形 분석에 관한 실험한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 寒蘭의 種子發芽와 幼苗生育

1-1. 寒蘭 開花株의 交配組合에 따른 種子의 生理的 特性인 種子 꼬투리 形成率은 自家受粉 種자가 75.0%로 他家受粉 種子 66.7% 보다 높았으나, 性比率은 他家受粉 種자가 80.0%로 自家受粉 種子 66.7% 보다 높은 경향을 보였다.

1-2. 種子 發芽의 所要日數는 他家受粉 種자가 59~174日 (평균 106日)이었으며, 自家受粉 種자는 77~329日 (평균 164日)이었다.

1-3. 寒蘭種子 파종 후 짧은 기간내에 無菌發芽를 시켜 根莖形成 (0.5cm 크기)을 높힐 수 있는 적합한 培地는 使用培地의 종류, 培養環境에 따라 根莖形成 所要日數가 파종 後 12個月에서 32個月로 큰 차가 있었으며 이들 중 Murashige and Shoog 培地에서 파종 12個月 後 0.5cm크기 根莖形成이 이루어져 가장 양호하였다.

1-4. 種子 無菌發芽를 시켜 根莖形成 기간중의 明·暗培養에 따른 發芽 根莖形成能力은 培地의 種類, 培地 物理性 (固·液體培地)에 따라 발아가 되지 않는 培地도 있었으며, Murashige and Shoog 培地에 寒天이 첨가되지는 液體 培地에 파종하여 暗培養 하는 것이 置床 flask 數의 40% 정도가 莖形成이 이루어져 가장 양호하였다.

1-5. 寒蘭의 根莖分化를 용이하게 하여 幼苗生産을 단기간에 꾀할 수 있는 효과적인 방법은 種子 無菌發芽 後 形成된 2cm 크기 根莖을 Hyponex g/l, peptone 2g/l, rutin 100mg/l, 培地에서 培養했을 때 置床 2個月 後 부터 shoot 分化가 시작되었고 4個月이 되면 草長 3cm 크기의 幼苗를 얻을 수 있었으며, 置床 根莖數에 대한 分化率을 94%로 높힐 수 있어 가장 우수하였다.

1-6. 根莖분화와 幼苗生産을 높힐 수 있는 根莖의 置床切片 部位는 先端部였으며, 200ml flask의 置床切片數는 7個가 효과적이었고, 置床 12個月 後 에 根莖 分化數는 先端部 31個에 비하여 中間部 21個, 基部 25個 였는데, 이들 중 flask 밖으로 꺼낼수 있는 草長 10cm 크기 이상의 幼苗 生産능력은 莖의 中間部 置床時 shoot 分化數의 33.3%, 基部 4%에 비하여 先端部 置床時는 38.7%의 幼苗가 생산되었다.

1-7. 寒蘭 組織培養苗의 硬化用土를 선별하기 위하여 水苔, 濟州송이 (scoria), bark, 腐葉 등을 用土로 사용한 결과는 移植 12個月 後 生存率이 水苔, 濟州송이, bark에서 높았으며 新根數도 각각 0.5個, 1.1個, 0.9個 發生되어 硬化처리에 적합한 용토라고 인정되었다.

1-8. 硬化가 완료된 寒蘭 組織培養苗 (草長 10cm 크기)의 花盆栽培用 盆土를 선별하기 위하여 自生地 腐葉, 濟州송이, bark 등을 단용 및 혼합으로 조성하여 사용한 결과는 花盆栽培 3年 後 生育量을 보면 自生地 腐葉과 濟州scoria+bark (1:1) 混合盆土가 양호하였다.

1-9. 寒蘭 組織培養苗의 自生地 재배를 위하여 自生地인 漢拏山 선돌지역 (海拔 490m 地點 : 南濟州郡 南元邑)에 이식한 결과 移植 2年 後 生存率은 68%이었으며, 草長은 生長量이 거의 없었으나, 莖數는 1.3個 정도 증가되었다.

2. 寒蘭의 同位酵素 特性

2-1. 濟州地域에서 재배되고 있는 濟州自生 寒蘭 30株와 濟州寒蘭 품종으로 보고된 15品種을 等電點電氣泳動法으로 peroxidase (PX)를 분석한 결

과는 7개의 band가 관찰되었는데, band의 위치와 數에 따라 18가지 表現型으로 구분되었다.

2-2. PX 表現型에 따른 寒蘭 18 groups間에 Nei's F-statistics 計算式에 의한 genetic distance values는 PX-b·c·e 型和 PX-b·c·e·f 型和 같이 近緣值가 86%로 높게 나타내는 group이 있는가 하면, PX-f 型和 PX-d 型처럼 近緣值가 18%로 낮게 나타내는 group도 있었다.

2-3. 自家受粉 種子 無菌發芽 培養 寒蘭들의 同位酵素 PX band pattern은 서로 같았으며, 또한 母株과 同一하였다.

2-4. 他家受粉 種子 無菌發芽 培養 寒蘭들의 同位酵素 PX band pattern은 서로 같았으며, 父親의 band와 母親의 band를 共有하고 있었다.

2-5. 寒蘭을 母本으로 온대산 *Cymbidium*인 春蘭, 竹栢蘭, 觀音素心을 각각 交配하여 器內 培養한 식물체는 형질에 따라 母本 또는 父本과 같거나 兩親의 中間形을 나타내는 경향이였다.

2-6. 寒蘭과 몇가지 온대산 *Cymbidium* 交雜種 間的 根莖을 이용한 同位酵素 분석 결과 AcPII, estrase, MDH, ME 및 PX 등 5酵素系가 遺傳分析을 위한 標識로 이용될 수 있음이 확인되었다.



VII. 引用文獻

1. Arus, P. 1983. Genetic purity of commercial seed lots. p.415-423. In : Tanksley S.D and T.J. Orton (eds.). Isozyme in plant genetics and breeding. Part A. Elsevier, Amsterdam.
2. 朴在石, 鄭載東, 鄭珉燮. 1990. 韓國春蘭의 自生地域間 同位酵素 band pattern의 變異. 韓國誌. 31 (2) : 176-183.
3. Batchelor, S.R. 1981. Orchid culture & Growing media. Amer. Orchid Soc. Bull. 50 : 1318-1324.
4. Burgeff, H. 1909. Die Wurzelpilze der Orchideen ihre Kultur und ihr Leben in der Pflanzen. G. Fischer Verlag. Jana. 220 pp.
5. Caplin, S.M. and F.C. Steward. 1948. Effect of coconut milk on growth of explants from carrot root. Sci. 108 : 655.
6. Chittenden, F.J. 1956. Dictionary of gardening. Vol. II. Oxford at the Clarendon Press. pp. 610-612.
7. 崔修玉. 1990. 溫帶系 *Cymbidium* 屬 種子의 無菌發芽 및 莖頂培養에 의한 幼苗의 增殖體系 確立과 變異體의 選拔. 慶北大 大學院 博士學位論文. 99 pp.
8. 崔修玉, 鄭載東. 1992. 溫帶産 *Cymbidium* 屬에 있어서 第1代 雜種의 表現型. 韓國誌. 33 (4) : 351-355.
9. Chojecki, A. J. S. and M. D. Gale. 1982. Genetic control of glucose phosphate isomerase in wheat and related species. J.Hered. 49 (3) : 337-347.
10. Collier, M. 1980. Orchids in hydroponics. Amer. Orchid Soc. Bull. 49 : 851-854.
11. Dillon, G. 1976. Eisenslaedts orchids. Horticulture. Feb. pp. 40-55.
12. 田原望武. 1984. 칸란·슌란根物語. In : 칸란. 誠文堂新

- 光社. pp. 156-161.
13. 鳥瀉博高. 1976. 増補 蘭科植物の種子形成と無菌培養. 誠文堂新光社. 東京. 324 pp.
 14. Esen, A. and R.K. Soost. 1976. Peroxidase polymorphism in *Citrus*. J. Hered. 67 : 199-203.
 15. Esen, A. and R.W. Scora. 1977. Amylase polymorphism in *Citrus* and some related genera. Amer. J. Bot. 64 : 305-309.
 16. 加古舜治. 1976. シュンラン種子の發芽に関する研究. pp. 174-237. In 鳥瀉博高 (eds.). 蘭科植物の種子形成と無菌培養. 誠文堂新光社. 東京.
 17. 狩野邦雄. 1976. ラソの無菌發芽時培養に関する研究. pp. 95-152. In 鳥瀉博高 (eds.). 蘭科植物の種子形成と無菌培養. 誠文堂新光社. 東京.
 18. Gautheret, R. J. 1932. Surla culture el' extremités de racines. C.R. Soc. Biol. 109 : 1236-1238.
 19. 黒崎陽人. 1974. 東洋蘭. 泰文館. 東京. 392 pp.
 20. Haberlandt, G. 1902. Kulturversuche mit isolierten pflanzenzellen. Sitzungsber Math-Naturwiss. Kl. Kais. Akad. Wiss. Wien. 11 : 69.
 21. 韓昶烈. 1973. 蘭. 韓國植物組織培養學會誌. 1 (1) : 40-47.
 22. 韓旻哲, 李宗錫, 金承炫. 1988. 濟州道内 組織培養室의 實態 및 改善方案에 關한 研究. 濟州大 亞農研. 5 : 61-77.
 23. 長谷川喜. 今出來光志, 五井正憲. 1984. 東洋系シンビジウムの繁殖に關する研究. 日本園藝學會 秋季發表要旨. pp. 360-361.
 24. 長谷川喜. 1987. 東洋系シンビジウムの繁殖に關する研究. 香川大學 農學部紀要 50 : pp. 108-116.
 25. Hasegawa, A. and G. Masanori. 1987. Rhizome from in *Cymbidium goeringii* Reichenbach *fl.* and *Cymbidium kanran* Makino in shoot-tip culture. J. Japan Soc. Hort. Sci. 56 (1) : 70-78.
 26. Head, C., M. Webb and L. Winn. 1980. *Miltoniopsis phalaenopsis*. Amer. Orchid Soc. Bull. 49 : 956-959.

27. 張田益, 金容德. 1993. 송이培地耕에서 養液供給方法이 딸기의 收量과 品質에 미치는 影響. 濟州大 亞農研. 10 : 83-101.
28. 鄭載東, 全在琪, 金聖洙, 李宗錫. 1985. 自生寒蘭 (*Cymbidium kanaran*) 의 rhizome 生長과 器官分化. 韓國誌. 26 (3) : 281-288.
29. 鄭載東, 全在琪. 1983. 建蘭 (*Cymbidium ensifolium*) 種子의 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. 韓國誌. 24 (3) : 236-242.
30. 鄭載東, 全在琪, 金聖洙. 1984. 나도풍란 (*Aerides japonicum*) 種子의 發芽와 幼苗 生長에 適合한 培地 및 培養條件의 究明. 韓國誌. 25 (4) : 305-312.
31. 鄭載東, 全在琪, 崔修玉. 1985. 建蘭 種子의 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. 韓國誌. 26 (2) : 186-192.
32. 鄭載東. 1985. 植物組織培養을 利用한 園藝作物의 急速繁殖. 韓國誌. 26 (4) : 410-428.
33. ガーデソシリーズ. 1979. 東洋ラン. 試文堂新光社. 東京. 199 pp.
34. ガーデンライフ. 1989. 카소란. 試文堂新光社. 東京. 246 pp.
35. Kano, K. 1965. Studies on the media for orchid seed germination. Mem. Fac. Agr. Kagawa Univ. 20 : 1-68.
36. Kano, K. 1971. Seed germination of oriental *Cymbidium* and their shoot-tip culture. Pro. 6th World Orchid Conference. pp.133-142. Halsted Press. Sydney, Australia.
37. Karen, F. Sr. J., R.C. Fodor and J.L. Haynick. 1975. The Suitability of certain barks as growth media for orchids. Amer. Orchid Soc. Bull. 44 : 51-54.
38. Kim, H.J. and H.G. Park. 1984. Application of electrophoresis in testing the genetic purity of F₁ hybrid seed of *Raphaus satives*. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 25 : 256-262.

39. 金一中, 李宗錫, 康道義, 盧承文. 1979. 自生蘭科植物의 開發과 花卉園藝化에 따른 繁殖法 確立에 關한 研究. I. 自生蘭의 開發과 繁殖. 韓國誌. 20 (1) : 94-105.
40. Knudson, L. 1924. Further observations on nonsymbiotic germination of orchid seeds. Bot. Gaz. 77 : 212-219.
41. Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. Amer. Orchid. Soc. Bull. 15 : 214-217.
42. Knudson, L. 1950. Germination of seeds of *Vanilla*. Amer. J. Bot. 37 : 241-247.
43. Kohl, H.C. 1962. Notes on the development of *Cymbidium* from seed to plantlet. Amer. Orchid Soc. Bull. 31 (2) : 117-120.
44. 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.
45. Kramer, J. 1975. Orchids. Harry N. Abrams, Inc. New York. 309 pp.
46. Kusumoto, M. and J. Furukawa. 1977. Effect of organic matter on the growth of *Cymbidium* protocorms cultured *in vitro*. J. Jap. Soc. Hort. Sci. 45(4) : 421-426.
47. Lawler, L.J. 1984. Ethnobotany of *Orchidaceae*. pp. 30-116. In : J. rditti(ed.) Orchid biology, reviews and perspectives, III. Comstock Publishing Associate. Cornell University Press.
48. 李貞植, 沈慶九, 柳美先, 李宗錫, 金永鎮. 1986. 寒蘭(*Cymbidium kanran*) 無菌培養에 있어서 rhizome의 增殖과 器官形成에 關한 研究. 韓國誌. 27 (2) : 174-180.
49. 李宗錫. 1982. 韓國 自生寒蘭의 特性, 生育環境 및 繁殖에 關한 研究. 高麗大 大學院 博士學位論文. 145 pp.

50. 李宗錫. 1984. 濟州道の 自生寒蘭. 濟州大 亞農研. 1 : 157-168.
51. 李宗錫. 1986. 濟州寒蘭 (*Cymbidium kanran*)의 器內增殖. 科學技術處 '85 國策研究開發事業報告書. pp. 175-196.
52. 李宗錫. 1986. 韓國의 蘭草栽培歷史에 關한 研究. 韓國誌. 27(2) : 181-189.
53. 李宗錫. 1988. 東洋系 *Cymbidium*屬 種間雜種植物의 根莖培養에 關한 研究. 濟州大 亞農研. 5 : 49-59.
54. 李宗錫. 1988. 玉花蘭 (東洋蘭系) 根莖의 組織培養時 生育과 分化에 미치는 NAA, BA 및 溫度處理의 影響. 濟州大 論文集 (自然科學篇). 27 : 21-27.
55. 李宗錫. 1989. 寒蘭의 根莖培養을 爲한 效果的인 培地의 開發. 韓國誌. 30 (4) : 303-310.
56. 李宗錫. 1991. 蘭. 內外出版社. pp. 149-227.
57. 李宗錫, 郭炳華, 李炳基, 鄭載東. 1984. 韓國自生寒蘭에 關한 研究. I. 寒蘭의 根莖培養에 關하여. 韓國誌. 25 (2) : 129-135.
58. 李宗錫, 蘇寅燮. 1984. 紫蘭 種子의 無菌發芽에 미치는 光線과 糖 및 活性炭의 影響. 石龜 金承贊 先生 停年退任紀念論文集. pp. 163-167.
59. 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 關한 研究. 農振廳 產學協同研究報告書. pp. 1-23.
60. Lin, W.C., H.F. Wilkins and M.L. Brenner. 1975. Endogenous promotor and inhibitor levels in *Lilium longiflorum* bulbs. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 100 (2) : 106-109.
61. Manganaris A. G., and F. H. Alston. 1987. Inheritance and linkage relationships of glutamate oxaloacetate transaminase isozymes in apple. 1. The gene GOT-1, a marker for the incompatibility locus. Theor. Appl. Genet. 74 : 154-161.
62. 町山英一. 1981. シュンラソづくり. ひかりのくに株式會社. 96 pp.
63. Markert, C.L. and F. Moller. 1959. Multiple forms of enzymes :

- Tissue ontogenetic and species-specific patterns. Proc. Nat. Acad. Sci. 45 : 753-763.
64. Miles, K. 1982. Growing equitant *Oncidium*. Amer. Orchid Soc. Bull. 51 : 155-160.
65. Miller, C. 1961. A kinetin-like compound in maize. Proc. Nat. Acad. Sci. 47 : 170-174.
66. Morel, G. 1964. Tissue culture-A means of clonal propagation in orchids. Amer. Orchid Soc. Bull. 33 : 473-478.
67. 文斗吉. 1986. 濟州在來 柑橘의 同位酵素分析과 交雜 實生의 早期識別 方法에 관한 研究. 서울大學校 大學院 博士學位論文. 46 pp.
68. Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15 : 473-479.
69. 永野芳夫, 笹山三次. 1962. 寒蘭譜. 加島書店. 東京. pp. 69-125.
70. 長島時子. 1982. シュンラン及びパフィオペディラムの種子形成, ならびに種子發芽について. 日本園藝學雜誌. 51 (1) : 94-105.
71. Nakagahra, M., T. Akihama, and E. Hayashi. 1975. Genetic variation and geographic cline of esterase isozymes in native rice varieties, Japan. J. Genetics 50 (5) : 373-382.
72. Nijenhuis, B.Te. 1971. Estimation of the proportion of inbred seed in brussels sprout hybrid seed by acid phosphatase isozyme analysis. Euphytica 20 : 498-507.
73. Northen, R.T. 1976. Orchids as house plants. Dover Pub. Inc. New York. 148 pp.
74. Nowak, J., M. Saniewski and R.M. Rudnicki. 1974. Studies on the physiology of hyacinth bulbs, *Hyacinthus orientalis* L. I. Sugar content and metabolic activities in bulbs exposed to low temperature. J. Hort. Sci. 49 : 383-390.

75. 岡見義男. 1971. ラン種類と培養. 試文堂新光社. 東京. 435 pp.
76. 岡田拓郎. 1968. シュンラン, カンランの交雑と無菌播種 In : 圖解. ランのバイオ技術. 誠文堂新光社. 東京. pp. 84-91.
77. Osterman, L. A. 1984. Methods of protein and nucleic acid research. I. Electrophoresis, Isoelectricfocusing, Ultracentrifugation. Springer Verlag : pp. 153-209.
78. Paek, K.Y. 1987. Micropropagation of temperate *Cymbidiums* by rhizome culture. Intl. Cym. and Workshop on gene manipulation for crop improvement. SABRAO. Malaysia.
79. 白基燁, 安成容, 沈杰輔. 1990. 東洋蘭의 開發과 微細繁殖體系 確立 III. 培養한 rhizome의 polyphenol 含量, 機關形成의 組織學的 觀察 및 同位酵素 檢定. 韓園誌. 31 (3) : 263-275.
80. 白基燁, 沈杰輔. 1987. 溫帶産 *Cymbidium*의 種子 無菌發芽와 形成된 rhizome으로 부터 植物體 形成. 韓園誌. 28 (2) : 185-193.
81. 白基燁, 沈杰輔, 金正柱. 1990. 東洋蘭의 開發과 微細繁殖體系 確立. II. 天然産物 및 BAP 處理日數가 東洋蘭 rhizome의 器官形成에 미치는 影響. 韓園誌. 31 (1) : 74-80.
82. Pai, C., T. Endo, and H.T. Oka. 1973. Genetic analysis for peroxidase isozymes and their organ specificity in *Oryza perennis* and *O. sativa*. Can. Genet. & Cytol. 15 : 845-853.
83. Peterson, R. 1974. Growing orchids under fluorescent light. Horticulture. Nov. : 34-36.
84. Pierce, L.C. and J. L. Brewbaker. 1973. Applications of isozyme ananalysis in horticultural science. Hort. Sci. 8 : 17-22.
85. Pierik, R.L.M. and H.H.M. Steegmans. 1975. Analysis of adventitious root formation in isolated stem explants of *Rhododendron*. Hort. Sci. 10 : 31-37.
86. Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj. 1976. Plant cell, tissue and organ

- culture. Springer-Verlag. 803 pp.
87. Rick, C.M. and J.F. Fobes. 1974. Association of an allozyme with nematode resistance. *Rep. Tomato Genet. Coop.* 24 : 25-32.
 88. Scandalios, J. G. 1974. Isozymes in development and differentiation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25 : 225-258.
 89. Second, G. 1985. Isozymes and phylogenetic relationship in *Oryza*. *Rice. Genetics. IRRI.* 27-39.
 90. Shannon, L. M. 1968. Plant isoenzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 19 : 187-210.
 91. Sharp P.J., S. Desai and M.D. Gale. 1988. Isozyme variation and RFLP at the β -amylase loci in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 76 : 691-699.
 92. Skoog, F. and C.O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* No. 11. The biological action of growth substances. pp. 118-131.
 93. 蘇寅燮, 李宗錫. 1985. 組織培養 技術을 利用한 春蘭의 無菌發芽와 大量繁殖에 關한 研究. *韓園誌.* 26 (4) :375-380.
 94. Stegmann, H. M., W. Burgermeister, H. Francksen, and M. Rogerreck-lenfort, 1985. Electrophoresis and focusing in slabs using the panta-phorapparatus for analytical and preparative separation in gels. *Institute for Biochemie. Biologische Bundesantalt. Messeweg 11 D-3300 braunschweig. West Germany.*
 95. Tanksley, S.D. and C.M. Rick. 1980. Isozymic linkage map of the tomato : Applications in genetics and breeding. *Theor. Appl. Genet.* 57 : 162-170.
 96. Tanksley, S.D. and C.M. Rick. 1981,. Application of alcohol dehydrogenase allozymes in the testing the genetic purity of F₁

- hybrid.
97. 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.
 98. Ueda, H. and H. Torikata. 1974. Organogenesis in the meristem cultuers of *Cymbidium*. VII. Study on the extract from mycorrhizomes of *Cymbidium goeringii* Reichb. *fl.* J. Japan. Soc. Hort. Sci. 43 (3) : 281-285.
 99. Vacin, E. and F. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. Bot. Gaz. 110 : 605-613
 100. Vogelpoel, L. 1980. *Disa uniflora* - Its propagation and cultivation. Amer. Orchid Soc. Bull. 49 : 961-972.
 101. 王博仁, 邱金春. 1984. 蘭的繁殖法. 臺灣省 農業試驗所. 14 : 73-108.
 102. Weiler, J. and R. Emershad. 1977. Tissue culture for *Iris* hybridizer. Bull. Amer. Iris. Soc. 58 : 36-42.
 103. White, P.R. 1939. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial medium. Amer. J. Bot. 26 : 59-64.
 104. White, P.R. 1963. The cultivation of animal and plant cells. Ronald Press Co., New York. pp. 37-53.
 105. Wimber, D.D. 1963. Clonal multiplication of *Cymbidium* through tissue culture of the shoot meristem. Amer. Orchid Soc. Bull. 32 : 105-107.
 106. 上野 勇, 西浦昌男. 1976. ザイモグラフィーのカンキツ育種への應用 III. キメラにおけるパーオキシダーゼアイソザイムについて. 果樹試報 B (興津). 3 : 25-32.
 107. 殷茂永. 1988. 分析用 polyacrylamide gel 等電點 電氣泳動法. 植物遺傳工學 워크샵. 農業技術研究所. pp. 7-33.
 108. 殷茂永, 趙龍九, 鄭泰英. 1988. 等電點 電氣泳動法에 의한 벼 種子內

- esterase 同位酵素 品種特性 區分. 農試論文集 (生命共學篇). 30 (1) : 21-25.
109. Yates, C.R. and J.T. Curtis. 1949. The effect of sucrose and other factors on the shoot-root ratio of orchid seedlings. Amer. J. Bot. 36 : 390-396.
110. Ziv, M., A.H. Halevy and R. Shilo. 1970. Organ and plantlets regeneration of *Gladiolus* through tissue culture. Ann. Bot. 34 : 671.



謝 辭

本 研究와 論文이 이루어지기까지 指導鞭撻을 하여주신 蘇寅燮 博士님과 論文審査에 指導助言을 하여주신 郭炳華, 韓海龍, 文斗吉, 李宗錫 博士님께 깊은 감사를 드리며, 大學院에서 강의를 하여주셨던 白子勳, 張田益, 朴庸奉, 康勳 博士님들의 思慮 깊은 指導에도 감사드립니다.

또한 本 研究를 위해 많은 助言과 與件을 마련해 주신 제주도농촌진흥원 高一雄 원장님을 비롯한 모든 同僚職員과 유전공학연구소 殷茂永 博士님께 대하여 깊은 謝意를 表하오며, 아울러 本 實驗에 必要하게 사용되었던 材料 植物을 아낌없이 제공하여 주신 제주대학교 同門 김성수, 문영찬씨와 그의 많은 분들에게도 감사드립니다.

끝으로 지금까지 늘 祈願과 念慮로 보살펴주신 어머니와 親族님들 그리고 晩學을 할 수 있도록 限없는 至誠으로 힘이 되어주었던 아내 許貴仁과 사랑하는 아들 大學院生 錫範과 딸 大學生 志炫과 함께 이 榮光을 간직하고자 하오며, 오늘이 있기까지 正行大成을 家訓으로 가르치면서 生活의 支柱가 되어주셨던 아버님의 靈前에 이 小著를 드립니다.