

碩士學位論文

組織培養 技術을 利用한 竹柏蘭의
無菌發芽와 大量 繁殖에 關한 研究
Asymbiotic Germination and Mass propagation
of *Cymbidium lancifolium* Using Tissue Culture Technique

濟州大學校 大學院

園 藝 學 科



1989年 12月

組織培養 技術을 利用한 竹柏蘭의
無菌發芽와 大量 繁殖에 關한 研究

指導教授 蘇 寅 燮

康 日 洙

이 論文을 農學碩士 學位 論文으로 提出함

1989年12月

康日洙의 農學碩士 學位論文을 認准함



審査委員長

白 子 襄

委

員

蘇 寅 燮

委

員

朴 庸 學

濟州大學校 大學院

1989年12月

Asymbiotic Germination and Mass propagation
of *Cymbidium lancifolium* Using Tissue Culture Technique

IL—Soo Kang

(Supervised by professor. In—Sup So)

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

DEPARTMENT OF HORTICULTURE
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1989

目 次

Summary	3
I. 緒 論	5
II. 研究史	6
III. 材料 및 方法	8
IV. 結果 및 考察	10
VI. 摘 要	21
參考文獻	22



Summary

This experiment was carried out in order to choose the optimal basal medium and to study the seed germination of oriental orchid, *Cymbidium lancifolium*, and the effect of plant growth regulators and various substance treatments on organogenesis of the rhizome were also examined.

1. Germination was identified to be the best in MS+peptone medium among 6 different kinds of basic media.
2. Dipping seeds in 0.1N KOH for 90min. was most effective for promoting the germination.
3. Dark condition promoted significantly the germination rate in liquid MS with 3g/l peptone, compared with other light conditions.
4. Application of growth regulators for the MS medium had no effect on total growth of rhizome. However the medium containing 3g/l peptone not only increased fresh weight, but also promoted organogenesis during rhizome culture. The higher the BA concentration relative to NAA, the more concentration relative to BA, the more the root differentiation occurred.
5. The more effectiveness for the rhizome growth and shoot formation was produced when 2 grams of activated charcoal, 100 grams of banana, and 50 grams of potato were added to 3 grams-peptone MS.
6. Overall, mixed culture with some kinds of oriental *Cymbidium* rhizome showed mutual competition in terms of nutrition absorption. This

promoted a significant growth of rhizome. However, the mixed culture resulted in no mutual competition between *Cymbidium kanran* and *Cymbidium lancifolium*, rather showed that unknown material produced from *C. kanran* functions *C. lancifolium* to promote growth and organic differentiation.



I. 緒 論

竹柏蘭(*Cymbidium lancifolium*)은 種子가 發芽하면 根莖(rhizome)으로 發達하는 東洋蘭系統으로 알려져 있고, 잎모양이 일반 *Cymbidium* 屬의 東洋蘭과는 달라 대나무잎과 비슷하기 때문에 竹柏蘭이라는 이름이 붙여졌다고 한다.

우리나라에서는 漢拏山 남쪽 傾斜面 海拔 300~600m 地域에 많이 分布되어 있다고 하며^{28,29)}, 속칭 돈란이라고 하는데 無分別한 不法採取로 因하여 지금은 거의 멸종상태에 이르렀다.

東洋蘭들은 繁殖이 잘되지 않는 稀貴성과 文化生活의 向上으로 因하여 需要가 急增하고 있으나 供給이 따르지 못하고 있으며, 우리나라에서는 거의 大部分이 日本이나 中國等地로부터 輸入에 依存하고 있고 價格도 높아 大衆化하기 어려운 植物中の 하나이다. 이와같이 東洋蘭의 繁殖問題를 解決하기 爲해서는 洋蘭처럼 生長點培養을 해야하나, 生長點을 採取하는 데는 價格이 비싸기 때문에 經濟的인 問題가 따르며, 또한 洋蘭에서 처럼 不定芽의 形成되는 것이 아니고 rhizome化되어 여기에서 shoot의 發生을 誘導해야 하는 어려움이 있다.

지금까지 東洋蘭系統의 *Cymbidium*屬의 組織培養에 關해서는 研究者에 따라 結果에 다소 차이가 있기 때문에 組織培養技術을 利用한 多量繁殖 體系를 確立하기 爲해서는 더 많은 研究가 必要하다고 생각된다. 現在 寒蘭의 경우에는 國內의 많은 研究者들에 依해 種子의 無菌發芽法과 個體의 繁殖法이 밝혀져^{27,30,32)} 組織培養에 依하여 生産되고 있지만, 竹柏蘭의 경우에는 이러한 研究가 전혀 없고 오직 白生地環境에 對한 調查研究만이 유일한 資料로 남아있다.^{28,29)}

따라서 本實驗은 竹柏蘭種子의 無菌發芽에 미치는 여러 要因들과, 生産된 rhizome 으로부터 shoot 增殖과 器官分化에 關여하는 諸要因들을 밝히고자 實施하였다.

II. 研究史

蘭種자의 人工發芽法이 Knudson²²⁾에 의하여 開發된 이래 人工交雜에 의한 蘭의 育種事業이 活潑히 進行되어 日本이나 歐美에서는 新品種들을 紹介하는 文獻들이 많이 나오고 있다. 그러나 이런 品種들은 亞熱帶를 原產으로 한 洋蘭系이고 일반적으로 溫帶가 原產인 東洋蘭들은 播種하였을 때 發芽期間이 오래 걸리거나 發芽率이 낮기 때문에 植物種에 따른 發芽實驗이 要求되고 있다.

韓¹⁴⁾은 蘭種자의 不發芽 理由로는 種子內로의 水分, 溶質, 酸素 等の 透過不良과 發芽抑制物質의 存在, 胚의 活性減退, 胚內의 發芽促進物質 不足 그리고 遺傳的 特性이라고 하였다.

우선 東洋蘭의 種子發芽에 對한 培地를 살펴보면 春蘭의 경우에 Kyoto II 培地가 좋다고 하였으며,³⁾ 蘇와 李¹¹⁾는 MS培地에 peptone 3g/l을 添加한 것이 좋다고 報告한 바 있고, 鄭等⁶⁾은 小葉風蘭의 種子 發芽에는 Kyoto I 培地에 peptone 4g/l을 添加한 것이 發芽數나 protocorm 生育에 가장 좋다고 報告하였다.

種자의 發芽促進을 爲한 研究로는 播種前에 wilson 溶液에 種子消毒을 하면 특히 東洋蘭의 發芽가 增加한다고 Kano¹⁸⁾는 報告하였으며, 狩野⁴²⁾는 0.1N KOH 溶液을 處理하면 透水性 促進과 아울러 發芽抑制物質을 除去할 수 있다고 하였다. 坂本³⁸⁾은 四國產 自生蘭의 種子 發芽에는 0.1N KOH溶液에 5分間 處理하는 것이 좋다고 하였으며, Nagashima³³⁾는 日本春蘭의 種子發芽 實驗에서 KOH 處理에 의하여 種皮가 傷處를 입은 後에도 水分이 胚까지 到達하는 데는 90~120分이 經過해야만 可能하다고 하였다.

한편 種子發芽에 對한 明暗處理로서 鄭⁵⁾은 大葉風蘭의 경우 明條件이 發芽數와 苗의 生育에 좋다고 하였고, Yates와 Curtis⁴⁵⁾는 Cattleya의 경우 暗條件에서는 種子發芽가 거의 안된다고 하였다. 그러나 Kohl²³⁾은 Cymbidium 種자의 發芽는 暗狀

態에서 오히려 促進된다고 하였고, Knudson²²⁾은 Vanilla의 種子는 오직 暗狀態에서 만 可能하다고 報告하였다.

種子發芽 後에 生成된 根莖의 生育培地로는 비록 量的으로 약간의 差異가 있지만 peptone을 添加한 것이 根莖의 發育을 旺盛하게 誘導한다고 報告되어 있다. 4.5.9) 東洋蘭의 根莖發育에는 活性炭을 添加하여야 培養이 잘 된다는 報告도 있는데, 鄭 等¹⁰⁾과 Ernst¹³⁾는 活性炭의 添加效果로서 代謝分泌物이 吸收된다고 하였고, 蘇⁴⁰⁾는 活性炭의 添加에 의해 안개초의 器內發根이 容易하다고 하였으며, 李 等³²⁾은 寒蘭의 根莖培養時 MS培地에 活性炭을 2g/l 添加하면 根莖의 生育과 이후에 發生되는 個體의 數와 健全한 苗의 生産이 可能하다고 하였다.

生長調節物質 處理效果는 蘇와 李⁴¹⁾는 春蘭의 根莖培養時 NAA 5mg/l와 BA 5mg/l 處理에서 充分한 苗의 生産을 할 수 있다고 하였고, 楠元²⁶⁾은 MS培地에 kinetin을 處理해야만 cattleya의 莖頂培養時 protocorm의 增殖과 忠實한 個體를 얻을 수 있다고 하였다.

그러나 朴³⁷⁾은 生長調節物質 處理實驗에서 活性炭을 使用할 경우에는 生長調節物質이 거의 活性炭에 吸收되어 處理效果를 認定할 수 없다고 하였다. 李 等³²⁾은 寒蘭의 根莖培養時 NAA와 BA를 混用處理할 경우에는 根莖의 生育이 沮害되고 마침내 根莖이 自體的으로 分泌하는 phenolic compound에 의해 枯死된다고 하였다.

培地에 天然產物을 添加하는 것으로 coconut milk의 處理가 좋다고 하는 것^{17, 36)}은 널리 알려진 事實이고, Cymbidium屬 蘭類의 培養에서 바나나 100g/l와 감자 50g/l을 添加하여 좋은 結果를 얻었다는 報告도 있다.^{2, 11)}

그러나 組織培養時 各各 다른 植物體를 混植하여 좋은 結果를 얻은 例로는 Nitch와 Noreel³⁵⁾이 독말풀의 藥培養時 培地에 成熟한 藥을 添加한 것이 小孢子로부터 個體를 얻는데 效果的이다 하였고, 이러한 培養技法을 nurse culture라고 하였으며, 單細胞培養의 경우에 新鮮한 培地에서는 가끔은 細胞分裂이나 生育이 안되지만, 일단 캘러스 培養을 거친 培地에서는 培養이 可能한 경우가 있어 이러한 方法을 conditioned medium의 利用方法이라고 하였다.³⁴⁾

Ⅲ. 材料 및 方法

A. 種子の 無菌發芽 實驗

共試種子로 1986년에 受粉시켜 完熟된 것을 1987년에 採取하여 濟州大學校 組織 培養室에서, 鄭 等⁷⁾의 方法에 따라 12時間 교반한 다음 Wilson 溶液에 30分間 殺菌 하여 여과지로 여과한 후 滅菌수로 數回 洗滌하고 白金耳로 容器當 10번씩 찍어 播種하였다. 使用容器는 200ml flask에 培地를 50ml씩 注入하고, 난괴법 10반복으로 하여 播種후 150日後에 發芽數를 調查하였다.

1. 種子發芽에 適合한 培地를 얻기 爲하여 供試한 培地의 種類는 Knudson C(以下 KC라 함), White, Kyoto solution I (hyponex 培地, 以下 Kyoto I 라 함), Kyoto solution II (hyponex+peptone 3g/l, 以下 Kyoto II 라 함), Murashige-Skoog培地(以下 MS라 함), MS에 peptone 3g/l을 添加한 培地(以下 MS+peptone) 等 6種의 培地를 擇하여 播種 150日後에 發芽數를 調查하였다. 이때 에 發芽數를 數値로 表示하기 困難하여 發芽程度를 +부호로 表示하였다.

2. 種子の 發芽促進을 爲해 0.1N KOH 溶液에서 10分, 30分, 60分, 90分씩 浸漬 하여 MS+peptone 培地에 播種하여 150日 後에 發芽數를 調查하였다.

3. 0.1N KOH 溶液에서 90分間 傷皮處理한 種子를 Kyoto II 培地와 MS+peptone 培地의 液體 및 固體 狀態別 發芽促進 效果를 調查하였다.

4. 0.1N KOH 溶液에서 90分間 傷皮處理한 種子를 MS+peptone 液體培地와 Kyoto II 液體培地에서 明暗處理에 對한 發芽數를 調查하였다.

B. 根莖의 增殖과 器官形成에 미치는 生長調節物質과 天然產物 添加效果

1. 植物生長調節物質 및 活性炭 處理 實驗

生長調節物質 處理에 依한 器官分化의 樣相을 보기 爲해서 NAA와 BA를 各各 다 음과 같이 組合하여 25處理를 하였다. 이것을 MS+peptone 培地에 根莖을 길이 1 cm씩 切斷하여 容器當 3個씩 置床하여 난괴법 10반복으로 外形의 個體發生 程度를 調査하였다. 그리고 活性炭(Activated charcoal)의 效果를 알아보기 爲하여 活性炭을 添加한 것과 添加하지 아니한 것으로 區分하여 根莖의 生育狀態를 調査하였다.

Table 1. Contents of plant growth regulators treatment.

NAA(mg/l)	0	0.2	1.0	5.0	10.0
BA(mg/l)	0.0.21.05.010.0	0.0.21.05.010.0	0.0.21.05.010.0	0.0.21.05.010.0	0.0.21.05.010.0

2. 天然產物 添加 實驗

MS+peptone 培地에 活性炭 2g/l을 添加한 培地를 基本으로 하여 바나나 100g/l, 감자 50g/l를 各各 單用 또는 混用處理하여 根莖의 生長量과 個體分化 程度를 調査하였다.

C. 根莖 混植 反應 實驗

다른 種類의 蘭科植物과 竹柏蘭의 根莖을 混植하여 根莖間의 相助 혹은 拮抗關係를 調査하기 爲해 建蘭, 報歲蘭, 觀音素心, 春蘭, 그리고 寒蘭의 根莖을 單植 또는 混植하여 培養後 180日째의 生育相과 個體分化의 程度를 調査하였다.

IV. 結果 및 考察

A. 種子의 無菌發芽 實驗

竹柏蘭의 種子發芽에 對한 6가지 培地에서의 發芽數는 MS培地와 Kyoto II 培地가 +++로 비교적 良好하였고, 특히 MS에 peptone을 添加한 培地가 ++++로 가장 좋은 發芽數를 나타내었다[표2].

供試한 6가지 培地中에서 peptone을 添加한 培地에서 가장 發芽率이 높은 結果를 나타낸 것은, 狩野⁴²⁾의 春蘭種子 發芽實驗에서 MS培地에 peptone 3g/l을 添加한 것이 가장 良好하였다는 結果와, 鄭 等¹¹⁾의 建蘭種子의 發芽實驗에서 peptone 4g/l 處理效果와 같은 경향을 나타난 것으로 보아 東洋蘭系統의 *Cymbidium*屬들은 種子發芽에 peptone 添加가 좋은 것으로 생각된다.

Table 2. Germination of *Cymbidium lancifolium* seeds in the various medium

Medium	Germination
KC	+
White	++
Kyoto I	++
Kyoto II	+++
MS	+++
MS+Peptone 3g/l	++++

z : 150 days after seeding

y : (+) : bad, (++) : medium, (+++) : good, (++++) : very good

表3은 竹柏蘭種子の 發芽促進을 爲해 0.1N KOH를 傷皮處理한 것인데, 處理時間이 길어질수록 發芽數가 增加하는 傾向으로 90分에서 發芽數가 78個로 나타났다.

Table 3. Effects of KOH scarification for the germination of *Cymbidium lancifolium* seeds.

Treatment	Time	Germination
KOH	0(min.)	0(ea)
	15	0
	30	15
	60	43
	90	78

Z: Germination were counted 150 days after seeding on MS+peptone 3g/ℓ medium.

Ueda와 Torikata^{43,44)}는 日本春蘭의 種子發芽 實驗에서 KOH 處理에 依하여 種皮가 파괴되더라도 水分이 胚에까지 到達하는 데는 90~120分이 所要된다고 한 것과, 坂本⁴⁵⁾의 경우와 같이 四國産 自生蘭의 種子發芽를 爲한 KOH 處理時間에는 단 5分間 處理하는 것이 가장 좋다고 한 報告를 보면, 같은 蘭類種子라도 傷皮處理時間이 다른 것으로 추측된다.

本實驗의 結果는 春蘭의 경우와 마찬가지로 90分 處理區가 가장 좋았는데, KOH의 濃度 및 處理時間에 對한 자세한 實驗이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

實驗에 使用된 種子들은 完熟된 狀態에서 採取하여 播種하였기 때문에 休眠物質 蓄積이 많아져 傷皮處理時間이 더 많이 要하게 된 것으로 추측된다.

表4는 培地의 狀態別 發芽效果를 보기 爲하여 MS+peptone 培地와 Kyoto II 培地를 各各 固體狀態와 液體狀態로 하여 發芽數를 調査한 結果, 2種의 培地 共히 液體狀態에서의 發芽數가 현저히 많았다. MS+petone 培地에서는 固體狀態가 液體狀

態보다 平均發芽數가 57.25%였으며, Kyoto II 培地에서는 47.5%로 培地間에 차이를 보였다. 또 培地の 種類나 液體, 固體狀態에서 共히 處理時間이 길어질수록, 發芽數도 增加하였는데, 150日보다 더 長時間 處理實驗은 今後 더 研究하여야 될 것으로 생각된다.

Table 4. Germination of *Cymbidium lancifolium* seeds in different medium type.

Medium type	Germination after seeding(ea)				
	30	60	90	150(days)	
Ms+peptone 3g/l	liquid	16	58	72	125
	solid	10	23	47	78
Kyoto II	liquid	15	49	60	95
	solid	2	18	45	62

韓¹⁴⁾에 依하면 東洋蘭種子가 發芽가 되지 못하는 要因으로서, 種皮內로의 水分의 透過不良은 KOH溶液에 依한 傷皮處理로 一次的인 水分의 傳達은 胚에까지 이루어 지지만, 그 즉시 種皮內의 發芽抑制物質이 溶出되는 것이 아니고, 種皮內에 그것이 多量 存在하여 發芽를 抑制한다고 하였다. 그러나 播種된 培地가 固體狀態보다 液體狀態일 때 種子에 보다 많은 水分이 接하게 되므로 養水分의 供給이 더 많다는 것은 잘 알려진 事實이다. 24, 25, 42) 本 實驗에서도 液體培地에서 發芽數가 많은 것으로 보아, 種子들이 水分과 더 많이 接할수록 發芽抑制物質의 溶出이 용이하여 發芽가 잘되는 것으로 思料된다.

明暗條件에 따른 種子發芽數를 調査한 實驗은 表5에서와 같이 暗條件下에서 MS+petone 培地는 明條件時의 1.5倍, Kyoto II 培地에서는 1.3倍로서 明條件보다

暗條件에서가 發芽數가 많았고, 明暗에 關係없이 MS+peptone 培地가 Kyoto II 培地보다 發芽數가 많았다.

Table 5. Effect of light and dark condition on the germination of *Cymbidium lancifolium* seeds. z)

Light treatment	Medium(liquid)	Germination(ea)
Light	MS+peptone 3g/l	125
	Kyoto II	95
Dark	Ms+peptone 3q/l	186
	Kyoto II	122

z : 150 days after seeding

Seeds were treated with 0.1N KOH solution for 90 min. before seeding.

明條件에서는 總發芽數가 220이었고 暗條件에서는 308으로서 培地에 關係없이 暗條件일 때가 發芽가 良好하였다.

Kohl²³⁾은 *Cymbidium* 種子의 發芽는 暗狀態에서 오히려 發芽가 促進的인 效果를 가진다고 하였다. Knudson²²⁾은 vanilla의 種子發芽實驗에서 暗狀態에서 만이 發芽할 수 있는 蘭類의 發芽에는 그와같은 條件을 確實히 提供하여야만 發芽를 促進시킬 수 있다고 하였다. 그러나 鄭 等⁷⁾은 石斛種子 發芽實驗에서는 明條件이 發芽數나 苗의 生育에 좋다고 하였고, Yates와 Curtis¹⁵⁾는 cattleya의 경우 暗條件에서는 種子發芽가 거의 없다고 하였으며, 李와 蘇¹¹⁾의 紫蘭種子 發芽實驗에서 暗條件이 發芽에 不良한 것으로 서로 相反된 報告가 있다.

이와같이 蘭科植物에서도 同一屬, 種이라도 發芽와 苗의 生育을 主管하는 要因들

이 각각 다른데, 竹柏蘭은 暗狀態에서 發芽가 促進됨을 確認할 수 있었다. 그러나 溫帶原産인 cymbidium屬은 대체로 種子가 發芽하면 protocorm이나 個體가 發生하는 것이 아니고, 1.21) 發芽 즉시 蘭菌과 共生하여 根莖이 形成된 뒤 地下部生育期를 거쳐 根莖이 어느정도 成長된 後 器官分化가 이루어지는 生育習性을 가졌기 때문에¹⁵⁾ 러한 蘭類의 種子發芽에는 暗狀態가 좋을 것이라고 思料된다.

B. 根莖의 成長과 器官分化 實驗

表6에서는 個體分化에 미치는 生長調節物質의 處理效果를 나타낸 것인데, NAA 單用處理에서는 rooting을, BA 單用處理에서는 shooting을 促進하였고 NAA와 BA의 混用處理의 경우에도 NAA의 농도가 BA 농도보다 높을 때는 root 數가 增加하였고, 反對로 BA농도가 높을 때는 shoot數가 增加하는 경향을 나타내었다.

특히 BA 10mg/l을 單用處理區에서 個體의 發生이 良好함을 보이나 培養期日이 경과함에 따라 培地의 褐變에 따른 培養對象 根莖의 生育이 阻害되는 現象이 發生하여 바람직한 方法이라 할 수 없다고 생각된다. 이것도 李等¹²⁾이 寒蘭의 根莖培養에서 밝힌 報告와 같은 結果로서 竹柏蘭의 根莖培養을 爲해서도 生長調節物質의 種類와 處理濃度에 關한 正確한 實驗이 있어야 할 것으로 생각된다.

根莖의 生育時 分泌되는 代謝分泌物인 페놀물질(phenolic compound)¹⁷⁾을 除去하는 方法으로서 活性炭을 添加하였을 때의 效果를 알기 爲한 實驗結果는 表7에 나타내었다. 活性炭 添加區에서는 個體發生數, 生體重 및 根莖의 側枝發生數 모두 處理하지 않은 對照區에 比하여 增加하였으나 뿌리의 發生數는 오히려 減少하는 傾向을 나타내었다.

活性炭의 添加效果로서 auxin類의 處理없이도 器內發根이 容易하게 된다는 報告¹⁸⁾도 있지만, 活性炭의 가장 큰 處理效果는 代謝分泌物를 除去하는 것이라는 사실이 몇가지 研究^{16, 20)}에서 밝혀지고 있다.

Table 6. The growth response of *Cymbidium lancifolium* rhizome in vitro with various combinations of BA and NAA concentration.

NAA (mg/l)	BA (mg/l)	No. of L	Shoots S z)	No. of root (ea)	Fresh weight(g)	Weight of rhizome	Intensity of shoot devel.
0	0	-	-	-	0.07	0.07	+ y)
	0.2	-	-	-	0.10	0.10	+
	1.0	-	-	-	0.24	0.24	+
	5.0	1.3	1.5	-	0.23	0.14	++
	10.0	1.8	2.0	-	0.28	0.12	+++
0.2	0	-	-	-	0.22	0.22	+
	0.2	-	-	-	0.24	0.24	+
	1.0	-	-	-	0.28	0.28	+
	5.0	1.0	1.0	-	0.32	0.18	++
	10.0	1.2	1.6	-	0.30	0.13	++
1.0	0	-	-	-	0.32	0.32	+
	0.2	-	-	-	0.30	0.30	+
	1.0	-	-	-	0.24	0.24	+
	5.0	-	-	-	0.27	0.27	+
	10.0	-	0.5	-	0.20	0.18	++
5.0	0	-	-	3.5	0.54	0.46	+
	0.2	-	-	1.8	0.42	0.33	+
	1.0	-	-	-	0.33	0.33	+
	5.0	-	-	-	0.25	0.25	+
	10.0	-	-	-	0.27	0.27	+
10.0	0	-	-	4.6	0.48	0.21	+
	0.2	-	-	2.7	0.45	0.24	+
	1.0	-	-	-	0.32	0.32	+
	5.0	-	-	-	0.24	0.24	+
	10.0	-	-	-	0.27	0.27	+

z : L : Larger plantlet means that shoot length is longer than 1cm.

S : Small plantlet means that shoot length is shorter than 1cm.

y : (+) : bad, (++) : medium, (+++) : very good.

그러나朴³⁷⁾은活性炭을添加했을 때生長調節物質의處理效果가 없다고 하였는데 이는器內培養時活性炭이生長調節物質을吸收하였기 때문이라 하였다.

Table 7. Growth response of *Cymbidium lancifolium* rhizomes on the medium with or without activated charcoal in vitro. z)

Medium	No. of shoots (ea)	No. of roots (ea)	Fresh weight (g)	No. of rhizome branches(ea)
MS+peptone 3g/1	0.7	1.4	0.94	3.4
MS+peptone 3g/1 +AC 2g/1	0.8	1.2	5.36	5.7

z : 180 days after rhizome culture

Table 8. Growth response of *Cymbidium lancifolium* rhizomes in natural product supplements added MS medium in vitro.

Nutrient supplement	No. of shoots (ea)	No. of roots (ea)	Fresh wt. (g)	No. of rhizome branches(ea)
Control	0.8(±0.6)	1.2(±0.87)	5.36(±0.89)	5.7(±0.97)
Banana 100g/1	1.2(±0.87)	3.2(±1.17)	5.75(±0.73)	6.5(±0.97)
Potato 50g/1	0.6(±0.49)	0.8(±0.6)	3.28(±0.48)	2.4(±0.66)
Banana 100g/1+ potato 50g/1	1.4(±0.82)	4.2(±0.79)	6.54(±0.57)	7.4(±0.92)

Basal medium was prepared MS with peptone 3g/l+activated charcoal 2 g/l.

All numbers were counted 180 days after rhizome culture.

Numericals in parenthesis indicate standard deviation.

表8은 活性炭을 2g/l 添加한 MS+peptone 培地에 天然產物인 바나나와 감자를 單用 혹은 混用處理한 結果를 나타낸 것이다.

바나나 單用處理와 바나나+감자 混用處理는 對照區보다 個體數, 뿌리數, 生體重 및 根莖數가 增加하였으나 감자 單用處理는 오히려 對照區에 比하여 減少하는 현상을 나타냈다.

Arditti¹⁷는 바나나 添加培地는 cattleya 幼苗의 生長을 促進시켰으며, 그 原因으로서는 培地の 酸度에 對한 緩衝作用(buffer action)과 培地內에 存在하고 있는 無機鹽類에 對한 錯鹽效果(chelating effect)를 강조한 바 있으며, Karasawa¹⁸는 바나나 自體가 가지고 있는 여러가지 養分 및 어떤 未知의 生長調節物質등의 부가적인 效果라고 하였다.

또한 Ernst¹²는 Papiopedilum의 無菌培養에서 바나나와 活性炭을 混用添加하였을 때 특히 이들 物質의 相互 緩衝作用이 生育을 促進시킨다는 것과, Kano¹⁵가 寒蘭이나 春蘭과 같은 東洋蘭의 根莖生育에 있어 바나나와 감자의 混用處理가 좋다고 報告한 事實과 같은 傾向을 나타내었다. 그러나 감자의 單用處理에서 對照區보다 오히려 모든 生長량이 減少하는 傾向을 보인 것은 某種의 감자成分이 바나나와 같이 緩衝作用과 錯鹽效果와 같은 것을 갖지 못해서 그런지 혹은 不活性化 되어 그런지는 알 수 없기 때문에 앞으로 이에 對한 細密한 研究分析이 必要하다고 생각된다.

表9는 몇가지 東洋蘭 品種을 單一植栽 혹은 混合植栽한 結果를 나타낸 것인데, 竹柏蘭과 여러가지 다른種의 蘭들 즉 建蘭(C. encifolium), 報歲蘭(C. siners), 觀音素心(C. gyokuckin), 春蘭(C. virescense), 그리고 寒蘭(C. kanran)과 混植한 것이 單一植栽한 것보다 生體重을 除外하고 모든 處理 共히 個體發生數, 發根數 그리고 根莖數에 있어 현저히 增加하는 傾向을 나타내었다.

그러나 竹柏蘭의 경우에는 混植한 것이 單一植栽한 것보다 側枝發生數, 生體重 그리고 發根數가 增加한 反面, 個體發生數는 多少 減少하는 傾向을 보였다. 그러나

竹柏蘭과 寒蘭과의 混植에 있어서는 竹柏蘭의 個體數가 7.8個로서 竹柏蘭과 다른 寒蘭들과 混植한 結果中에서 가장 많은 個體發生數를 나타낸 觀音素心+竹柏蘭 處理 區보다 3倍정도 많은 個體를 發生하였는데, 生體重 역시 가장 무거운 傾向을 나타내 었다(그림1).

이러한 現象은 Nitch와 Noreel¹⁵⁾이 報告한 바와 같이 寒蘭이 nurse의 役割 즉 donor 植物이 되고 竹柏蘭이 acceptor에 해당되는 植物임을 알 수 있었는데, 이는 李 等²⁹⁾이 濟州道에서 寒蘭과 竹柏蘭의 自生地 分布와 環境을 調査한 實驗에서 두가 지 植物이 거의 같은 地域이나, 環境이 비슷한 場所에서 生育하고 있다고 한 것으로 보아 寒蘭과 竹柏蘭 사이에는 相互共助하는 關係가 있는 것으로 생각되지만, 이러 한 現象들은 앞으로 밝혀져야 할 重要な 課題라 생각한다.

이러한 事實들을 미루어 볼 때 竹柏蘭의 個體發生을 爲한 根莖培養에는 生長調節 物質의 添加보다는 MS培地에 peptone 3g/l, 活性炭 2g/l, 바나나 100g/l, 감자 5 0g/l을 添加하고 寒蘭의 根莖을 混植 培養하면 좋은 結果를 얻을 수 있을 것으로 思 料된다.



Table 9. Growth response of single or mixed culture of *Cymbidium lancifolium* and some kinds of oriental *Cymbidium* rhizomes in vitro.

	No. of shoots (ea)	No. of roots(ea)	Fresh wt. (g)	No. of rhizome branches(ea)
lancifolium(s) ^z	y) L : 1.4	4.2	6.54	7.4
	+ encifolium(m)	L : 2.2	4.25	6.4
	E : 8.6	5.2	3.85	5.6
encifolium(s)	E : 6.8	3.7	6.82	4.5
	+ siners(m)	L : 2.0	4.40	5.8
	S : 7.4	5.0	3.54	4.8
siners(s)	S : 5.3	3.6	6.45	4.2
	+ gyokuchin(m)	L : 2.5	4.52	6.0
	G : 8.8	5.8	4.94	7.8
gyokuchin(s)	G : 5.6	4.5	8.42	5.6
	+ virescence(m)	L : 1.6	4.20	5.4
	V : 7.4	5.5	4.54	5.8
virescence(s)	V : 4.8	3.8	8.75	5.6
	+ kanran(m)	L : 7.8	8.84	8.6
	K : 1.5	2.5	1.48	2.5
kanran(s)	K : 6.5	4.8	7.25	5.5

Basal medium was prepared MS with peptone 3g/ℓ + banana 100g/ℓ + potato 50g/ℓ.

All numbers were counted 180 days after rhizome culture.

y L : *Cymbidium lancifolium*, E : *C. encifolium*, S : *C. siners*

G : *C. gyokuchin*, V : *C. virescence*, K : *C. kanran*

z(s) : single rhizome culture

(m) : mixed culture of *Cymbidium lancifolium* and various oriental *Cymbidium* rhizomes.

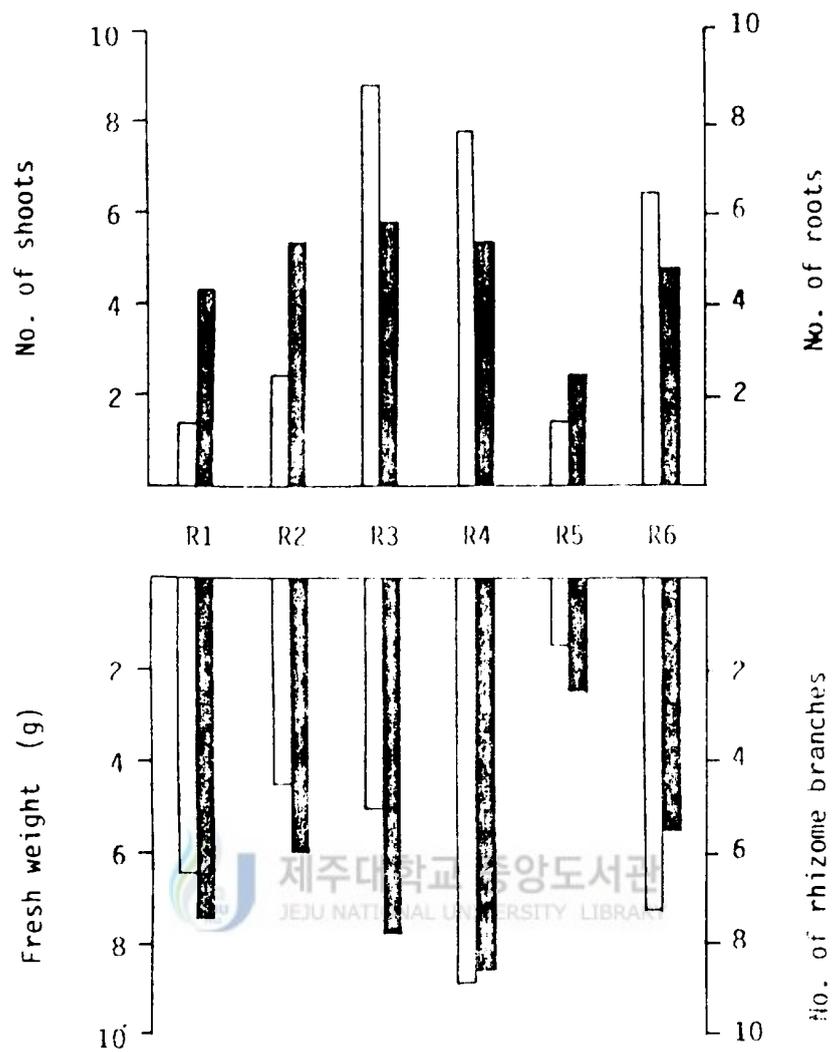


Fig.1. Growth response of single and mixed culture of *Cymbidium lancifolium* and two kinds of oriental *Cymbidium* rhizomes in vitro.

- R1 : *C. lancifolium*(single)
- R2 : *C. lancifolium*(with *C. yokuchin*)
- R3 : *C. yokuckin*(with *C. lancifolium*)
- R4 : *C. lancifolium*(with *C. hanran*)
- R5 : *C. kanran*(with *C. lancifolium*)
- R6 : *C. kanran*(single)

V. 摘 要

本實驗은 東洋蘭의 一種인 竹柏蘭(*Cymbidium lancifolium*)의 種子發芽을 爲한 適合한 培地와, 發芽하여 生育된 根莖의 器官分化에 미치는 生長調節物質 및 活性炭 等の 影響을 究明하여 竹柏蘭의 大量繁殖을 爲한 基礎資料를 얻기 爲하여 實施한 結果는 다음과 같다.

1. 供試한 6種의 培地中에서 MS培地에 peptone 3g/l을 添加한 것이 發芽數를 增加시켰다.
2. 發芽促進을 爲한 KOH 處理는 0.1N 濃度에서 90分處理가 發芽數가 가장 많았다.
3. 液體培地에서가 固體培地보다 그리고 暗培養하는 것이 明培養하는 것보다 發芽가 促進되었다.
4. 根莖培養의 경우 peptone 3g/l을 添加한 것이 生體重과 器官分化를 促進시켰으며, 生長調節物質의 處理效果는 NAA 濃度가 BA濃度보다 높은 때는 不定根의 發生이 많았고, BA가 NAA보다 높은 때에는 不定芽의 發生이 많은 傾向을 보였다.
5. 物質添加 處理에서는 活性炭 2g/l을 添加한 것에 바나나 100g/l와 감자 50g/l을 添加하는 것이 生體重과 個體發生을 增加시켰다.
6. 여러가지 東洋蘭系統의 混植培養에서 相互間에 個體發生이 促進되었으나, 寒蘭과 竹柏蘭 間에는 寒蘭의 生育은 沮害되었으나, 竹柏蘭은 器官分化와 全體的인 生育이 가장 良好하게 나타났다.

參 考 文 獻

1. 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*, *Godyera*, *Piperia*, and *Platanthera*. Bot. Gaz., 142 : 442~453.
2. Arditti, J. : 1968. Germination and growth of orchids on banana fruit tissue and some of its extract. Amer. Orchid Soc. Bull., 36 : 1068~1073.
3. 崔修玉, 鄭載東, 김장영. 1987. 東洋系 *Cymbidium* 屬의 急速增進을 위한 培地改良. 韓園誌 論文發表要旨. p. 96-97.
4. 全在琪, 鄭載東 : 1978. 石₂種子의 無菌培養에 關한 研究 (I) 寒天, 糖, peptone 및 tryptone의 濃度가 發芽와 生育에 미치는 影響. 慶北大論文集, 25 : 305~313.
5. 全在琪, 鄭載東 : 1978. 石₂種子의 無菌培養에 關한 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.
6. 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. 韓園誌, 25(4) : 305-312.
7. 鄭載東, 全在琪, 徐榮教, 卞碩庸 : 1981. 石₂種子의 無菌培養에 關한 研究 (IV) 明暗處理 및 培地造成이 種子發芽와 幼苗生育에 미치는 影響. 韓國園藝學會誌, 22 : 139~145.
8. 鄭載東 : 1979. 風蘭種子의 無菌培養 (I) 無菌發芽 및 生長에 關한 基礎研究. 韓國植物組織培養學會誌, 6 : 49~66.
9. 鄭載東 : 1980. 風蘭種子의 無菌培養, (II) Peptone과 tryptone을 添加한 hyponex 培地가 發芽와 生育에 미치는 影響. 韓國植物組織培養學會誌, 7 : 13~22.

10. 鄭載東, 全在琪, 崔修正. 1985. 建蘭(*Cymbidium ensifolium*) 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. 韓園誌, 26(2) : 186-192.
11. 鄭載東, 全在琪, 徐正海 : 1983. 紫蘭種子의 無菌培養에 관한 研究 (II) Peptone, sucrose, 寒天濃度 및 培地의 pH가 幼苗生長에 미치는 影響. 韓國園藝學會誌, 24 : 243~248.
12. Ernst, R. : 1974. The use of activated charcoal in asymbiotic seedling culture of *Paphiopedilum*. Amer. Orchid Soc. Bull., 43 : 35~38.
13. Ernst, R. : 1974. The use of activated charcoal in asymbiotic seedling culture of *Paphiopedilum*. Amer. Orchid Soc. Bull., 43 : 35-38.
14. 韓昶烈 : 植物組織培養, 一潮閣, 서울(1982) p. 259.
15. 伊藤五彦 : 蘭의 子房培養と種子形成, 增補 ラン科植物の 種子形成と 無菌培養. 誠文堂新光社 日本(1976).
16. 市橋正一, 加古舜治 : 1972. 蘭生長點培養に 關する研究(第6輯) *Cattleya* の フェノール性 成分について 日本園藝學會秋季大會發表要旨, 224~225.
17. Jeyanayaghy, S., and A. N. Rao. : 1966. Flower and seed development of *Bromheadia finlaysonianana*. Bull. Torrey. Botan. club, 93 : 97~103.
18. Kano, K. : 1965. Studies on the media for orchid seed germination. Mem. Fac. Agr Kagawa Univ., No. 20.
19. Karasawa, K. : 1966. On the media with banana and honey added for seed germination and subsequent growth of orchid. The orchid Review, 313-318.
20. Kerbaux, G. B 1984. Plant regeneration of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae) by means of root tip culture. Plant Cell Reports 3(1) : 27~29.
21. Knudson, L. : 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. Botan.

- Gaz., 73 : 1~25.
22. Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. Amer. Orchid Soc. Bull. 15 : 214-217.
 23. Kohl, H. C., Jr. 1962. Notes on the development of *Cymbidium* from seed to plantlet. Amer. Orchid Soc. Bull. 31(2) : 117~120.
 24. Kotomori, S. and T. Murashige,; 1965. Some aspect of aseptic propagation of orchids. Amer. Orchid Soc. Bull., 34 : 484~489.
 25. 楠元守 : 1973. 蘭の 莖頂培養に 關する研究 (第9報) 生長調節物質の組合せ添加や有機物の添加が *Cymbidium* の protocorm 増殖と分化に およぼす影響. 日本園藝學會秋季大會發表要旨, 294~295.
 26. 楠元守 : 1974. 蘭の 莖頂培養に 關する (第10輯) 生長調節物質の 添加が 莖頂分化後の *Cattleya* 苗におよぼす影響. 日本園藝學會春季大會發表要旨, 356~357.
 27. 李貞植, 全永鎮, 沈慶九, 柳美先, 李宗錫. 1984. 寒蘭 rhizome 植物體分化를 위한 基礎研究. 韓國園藝學會 論文發表要旨. 2(1) : 112~113.
 28. 李宗錫, 1984. 韓國野生蘭의 種類와 地理的 分布에 關한 研究. 濟州大 論文集 (自然科學篇), 19 : 31~54.
 29. 이종석, 김일중, 광병화 1981 : 韓國自生蘭의 生態에 關한 研究 한국원예학회지 22 : 44~50.
 30. 李宗錫, 郭炳華, 李炳基, 鄭載東. 1984. 韓國의 自生寒蘭에 關한 研究. I. 寒蘭의 根莖培養에 關하여, 韓園誌. 25(2) : 129-135.
 31. 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 停年退任記念論文集, p.163~167.
 32. 李宗錫, 蘇寅燮, 鄭載東. 1985. 寒蘭의 根莖生育에 미치는 各種 添加物質의 影

- 響에 관한 研究, 農村振興廳, 產學協同, '85-19, p. 23.
33. Nagashima, T. 1982. Studies on the seed germination and embryogenesis in the *Cymbidium goeringii* Reichb. f. and *Phaphiopedilum insigne* var. *Sanderæ* Reichb. f. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 51(1) : 94-105.
34. Nitch, C. 1975. Single cell culture of a haploid cell : The microspore, In : Genetic manipulations with plant material. pp. 297~310. Plenum Press, London.
35. Nitch C. and Noreel B. 1973. Ettet'd un choc thermique sur le pouvoir embryog'ene du pollen de *Datura innoxia* cultive dans l'anthere. Compt. Rend. Acad. Sei. Paris 276 D 303~306.
36. 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 Ph. D.
37. 朴春培, 1986. 韓國白生春蘭의 組織培養 技術開發에 관한 研究, 碩士學位論文. 濟州大學校
38. 坂本立彌. 1985. 圖解實技コーナー繁殖法. VII. 人工實生法, 盆栽世界 3月號 增刊 No.10 新企劃出版局, p. 60~66. Tokyo, Japan.
39. 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 5月號 增刊 No.11 新企劃出版局, p. 34~37. Tokyo, Japan.
40. 蘇寅燮. 1985. Virus 無毒株 生産을 위한 안개초의 生長點 培養에 관한 研究. 濟州大 亞熱帶農業研究報告書, 2 : 141~147.
41. 蘇寅燮, 李宗錫. 1985. 組織培養既述을 利用한 春蘭의 無菌發芽와 大量繁殖에 관한 研究. 韓國誌, 26(4) : 375~380.

42. 狩野邦雄. 1976. ランの無菌發芽培養基に関する研究. in; ラン科植物の種子形成と無菌培養. 誠文堂新光社/東京. p.75~152.
43. Ueda, H. and H. Torikata. 1970. Organogenesis in the meristem cultures of *cymbidiums*. V. Anatomical and histochemical studies on phagocytosis in the Mycorrhizome of *Cymbidium goeringii* Reichb. f. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 39(3) : 50~54.
44. Ueda, H. and H. Torikata. 1974. Organogenesis in the meristem cultuers of *Cymbidiums*. VII. Study on the extract from Mycorrhizomes of *Cymbidium goeringii* Reichb. f. J. Japan. Soc. zhort. Sci. 43(3) : 281-285.
45. 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.



謝 辭

本 研究를 遂行함에 있어서 α 에서 Ω 까지 指導하여 주신 蘇寅燮教授님과 論文을 審査하고 校訂하여 주신 白子勳, 朴庸奉教授님, 그리고 平素에 많은 가르침을 주신 韓海龍, 張田益, 文斗吉教授님께 感謝를 드립니다.

實驗을 도와준 여러 學友들께도 感謝를 드리며, 勉學을 할 수 있게끔 勇氣를 준 內子에게 이 작은 結實을 드리고자 합니다.

