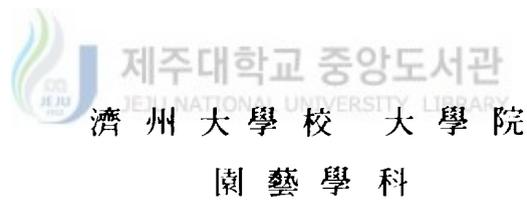


碩 士 學 位 論 文

韓 國 自 生 春 蘭 (*Cymbidium virescens*) 의
組 織 培 養 技 術 開 發 에 관 한 研 究



朴 春 培

1986年 12月

韓國 自生春蘭(*Cymbidium virescens*)의
組織培養 技術開發에 관한 研究

指導教授 蘇 寅 燮

朴 春 培

이 論文을 農學碩士學位 論文으로 提出함.

1986年 12月 日

제주대학교 중앙도서관
朴春培의 農學碩士學位 論文을 認准함

審査委員長

張 田 益

委 員

員

李 仁 燮

委 員

員

吳 斗 吉

濟州大學校 大學院

1986年 12月 日

ON THE RHIZOME CULTURE *IN VITRO*
OF *Cymbidium virescens* NATIVE
TO KOREA

Choon-Bae Park
(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

1986

目 次

Summary	1
I. 緒 論	2
II. 研 究 史	4
III. 材 料 및 方 法	7
1. 培 養 幼 苗 的 發 根 試 驗	7
2. 活 性 炭 添 加 에 의 한 生 長 調 節 物 質 吸 收 效 果	7
3. 培 地 에 添 加 된 몇 가 지 抗 酸 化 劑 的 效 果	8
IV. 結 果 및 考 察	10
摘 要	18
參 考 文 獻	19

Summary

For the rapid propagation of *Cymbidium virescens* and the improvement of tissue culture techniques, several trails were conducted.

The experimental results obtained are shown as follows.

1. Exogenous NAA and BA inhibited the rooting and growth of the plantlets. Addition of activated charcoal(2g/l) with or without NAA and BA increased the fresh weight and the number of roots per plantlet.
2. The activated charcoal absorbed all the NAA and BA in the medium, and the effect of added NAA and BA on the organogenesis was not detected in the presence of activated charcoal.
3. Addition of rutin(200mg/l) or aspartic acid(100mg/l) to the medium was effective in organogenesis of rhizomes, while that of ascorbic acid up to 200mg/l showed no effect.

I. 緒 論

春蘭은 *Cymbidium* 屬으로서 東洋蘭으로 일컬어지는 溫帶原産의 地生蘭이며, 一莖一花의 開花習性을 가지기 때문에 예전에는 이것이 眞正한 蘭이고 一莖多花性인 것은 惠로 稱하여 區分하였다고 한다.¹⁰⁾ 또한 花型 花色 草長等이 多樣하고 自然狀態에서 간혹 發見되는 變異種(一名 柄物)들이 個의 品種으로 登錄되어 蘭愛好家들에 의해 널리 栽培되고 있는 實情이다.

이러한 趨勢에 따라 知覺없는 사람에 依해 不法盜採가 甚하여 國內의 自生地마다 滅種 危機에 直面해 있어 그 保護問題가 深刻하게 擡頭되고 있다. 이러한 問題의 根本的인 解決方法은 自生地の 保護보다는 人工繁殖法이 確立되어 任意로운 增殖에 의하여 蘭愛好家들에게 自然스럽게 供給할 수 있는 體系가 이루어져야 하리라 본다.

蘇와 李³²⁾는 種子發芽에 對한 一連의 方法을 提示하고 優良苗의 生産에 適合한 培地의 選定과 生長調節物質의 組合等을 밝혀 大量繁殖 體系를 報告하였다.

한편 實際培養 過程中 發生되는 問題點을 段階別로 살펴보면 一次的으로는 器內에서 幼苗의 發根이 充分히 이루어 지지 않으면 硬化段階에서 不定根의 發生이 困難^{31, 33)} 하고 結局에는 枯死하는 境遇가 頻繁하기 때문에 培養最後의 段階로서 發根誘導過程이 確立되어야 할 必要가 切實하다. 二次的으로 個體 發生을 爲한 培地에 有害한 代謝分泌物的 吸收를 爲하여 活性炭을 添加하게 되면 生長調節物質 添加 效果가 喪失되는데⁸⁾ 이러한 問題에 關하여 正確한 生理的 根據를 提示한 資料나 文獻은 貧弱한 實情이며 다만 活性炭은 benzyl 기와 naphthyl 기 같은 芳香性 物質을 吸着하기 때문에 使用上 長短點이 各各 表出되고 있다는 報告가 있을 뿐이다. 마지막으로 根莖(rhizome)이 오랜 期間 培養되어 老化 하였거나 繼代培養前 段階에서 生長調節物質의 處理를 받았거나 하게되면 培地의 色이 褐變되는 現象²⁷⁾ 즉 代謝分泌物이 多量으로 培地에 流出되어 培地를 酸化시켜 結局에는 培養植物體의 生育이 沮害되는 現象이 發生하게 되는데 지금까지 알려진 몇가지 抗酸化劑를 培地에 添加하였을 境遇 그러한 現象이 防止될 수 있는지의 興否가 判明되어야 할 과제로 남아있다.

따라서 本試驗은 春蘭苗의 大量繁殖에 있어서 幼苗의 고른 發根을 誘導하기 爲

한 發根培地를 選定하며, 活性炭이 添加될 境遇 生長調節物質 즉 auxin類와 cytokinin이 어느 程度 吸收되는가를 究明하고, 培地의 酸化를 抑制 시키기 爲한 抗酸化劑(anti-oxidant)의 種類와 濃度を 밝히고져 遂行하였다.

Ⅱ. 研 究 史

Knudson¹⁶⁾ 이 蘭種子의 無菌發芽 培養法을 成功시킨 이후 Morel²³⁾ 은 virus 에 感染된 洋蘭 *Cymbidium*의 生長點을 培養해서 母本과 同一한 幼苗를 多量增殖시킬 수 있는 體系를 세웠고, 東洋蘭에 對한 研究로는 澤完과 鳥瀉³⁴⁾ 은 寒蘭種자를 Knudson C培地에서 種子發芽를 試圖했으나 發芽率이 低調했다고 했으며, Kokubu等¹⁷⁾ 은 寒蘭種자를 MS培地에 播種해서 rhizome의 增殖을 誘導했다고 報告하였다.

加古¹⁴⁾ 는 春蘭種자의 無菌發芽를 試圖했으나 發芽率이 低調했다고 하였고, Nagashima²⁴⁾ 는 春蘭의 種子發芽는 MS培地보다 Kyoto培地가 더 좋다고 하였으며, 蘇와李³³⁾ 는 春蘭完熟種자의 無菌發芽에는 MS基本培地에 peptone 3g/l를 添加하여 KOH 0.1N 溶液으로 傷皮處理하여 暗條件으로 培養하면 發芽日數 短縮과 發芽數 增加를 期할 수 있다고 報告하였다.

培養中 幼苗의 發根에 對한 研究로서 Ueda와 Torikata³⁵⁾ 는 春蘭의 發根은 培養中에 있는 不定芽를 8週日 程度 暗條件에서 培養하면 促進되지만 培地內에 kinetin을 單用處理하면 發根이 抑制된다고 하였고, 蘇와李³³⁾ 는 春蘭의 發根은 NAA의 水準이 BA보다 높을때 不定根의 發生이 잘 이루어 졌다고 하였다.

Drew⁷⁾ 는 *Paphiopedilum* 培養에서 活性炭 添加가 發根이 잘 되었다고 했으며, 鄭⁴⁾ 은 春蘭培養에서 뿌리의 形成과 生育에는 Peptone 4g/l와 tryptone 2g/l 添加가 效果的이라고 하였다.

또한 Yates⁴⁰⁾ 등에 依하면 *Oncidium* 은 光線이 없는 狀態에서도 뿌리發生이 이루어 졌다고 報告하였으며, 蘇³²⁾ 는 아프리카칸 바이올렛 培養에서 NAA 單用處理時 不定根이 誘導되었다고 하였고 白等³⁾ 과 蘇³¹⁾ 는 바나나, 안개초 生長點 培養中 幼苗의 發根과 不定芽의 生育은 auxin보다 活性炭이 效果的이라고 發表한 바 있다.

活性炭添加의 效果로서 Klein과 Bopp¹⁵⁾ Wang과 Huang³⁸⁾ 및 Reinert와 Bajaj²⁸⁾ 등은 活性炭의 添加는 phenol 系統의 代謝分泌物이 吸收되어 生育促進

을 하는 長點을 밝혔지만, Constantin等⁶⁾은 活性炭添加의 短點으로서 器官分화를 爲하여 培地에 添加되는 生長調節物質을 吸收하므로서 培養의 目的을 達成할 수 없었다고 報告 하였고, Martineau等²¹⁾은 *Petunia*의 組織培養에서 活性炭은 培地內 内生 外生の 生長調節物質을 吸收하여 callus와 뿌리의 發生을 抑制했다고 하였다.

Vij等³⁷⁾은 *Rhynchosytilis retusa* 葉片 培養에서 活性炭의 添加는 培地の 褐變을 減少시켰다고 하였으며, Proskauer와 Berman²⁵⁾은 培地를 검게하여 光을 遮斷하므로서 뿌리 生長 및 分화를 促進시킨다고 하였고, Ishii¹³⁾는 *Cattleya* 培養時 活性炭은 活着率을 增加시켰다고 했으며, 白等³⁾은 바나나 培養中 活性炭의 添加에 依한 發根 및 生育促進은 代謝分泌物的 吸收와 아울러 뿌리의 發育과 地上部の 生長이 促進될 수 있는 遮光效果에 起因한 結果가 아닐까 하는 假設을 示唆한 바 있다. 그러나 Reynold와 Murashige²⁹⁾는 活性炭의 有效物質 吸收 效果를 考慮하여 보다 많은 量 즉 活性炭이 吸着하고 남을 程度의 高濃度 水準의 生長調節物質 添加에 依하여 이와같은 問題가 解決될 것이라고 示唆한 바 있다.

한편 李等²⁰⁾의 寒蘭根莖 培養에서 活性炭을 2~4 g/l를 添加하게 되면 培地の 酸化가 防止되어 shoot의 分화를 促進시키고 分化個體의 數도 增加시켰다는 報告를 한 바 있다.

抗酸化劑에 對한 研究로서 Lee와 Fossard¹⁹⁾ 및 Skirvin과 Chu³⁰⁾는 培地에 ascorbic acid를 添加하므로써 酸化防止의 效果가 있다고 하였으며, 또한 Ishii¹³⁾는 *Cattleya* 生長點培養에 rutin 50~100 ppm 處理로 生存率을 높였는데, 이는 rutin處理로 組織內에서 湧출되는 phenol系統化合物的 減少 때문이라고 하였다.

白²⁾은 *Cattleya* protocorm 培養에서 rutin 50~100 ppm 處理가 生存率에 顯著한 效果가 있다고 하였으며, Ichihashi와 Kako¹²⁾는 *Cattleya* 培養時 polyphenoloxidase가 活性化되어 培地가 褐變現象을 보이는 것은 potassium cyanide, ascorbic acid 및 cysteine thiourea 등의 處理로서 抑制할 수 있었다고 하였다.

Ueda와 Torikata³⁶⁾는 *Cymbidium pumilum* 培養時 shoot의 形成은 gi-

bberellin, L-arginine, L-aspartic acid, 및 ascorbic acid 添加에 依하여 改善했으나 *Cymbidium goeringii* 는 L-arginine 과 L-aspartic acid 添加가 shoot 의 形成에 약간의 刺戟을 주었다고 報告 하였다.

鄭等⁵⁾은 寒蘭培養에는 MS 基本培地에 L-arginine 과 L-aspartic acid 를 添加한 培地에서 rhizome 의 生長과 器官分化가 좋다고 하였으며, Raghavan²⁶⁾ 은 *Cattleya* 組織培養에서 aspartic acid나 asparagine, glutamine 等の 添加는 幼苗에 基礎 營養의 供給源이 될 수 있기 때문에 生育이 良好하였다고 報告 하였다.

Anderson¹⁾은 사과 組織培養에 MBT 의 添加는 培地의 褐變化를 抑制할 수 있었다고 報告 했으며 李等²⁰⁾은 aspartic acid를 添加했을 境遇 根莖의 生育이 좋았다고 發表하였다.



Ⅲ. 材料 및 方法

人工授粉되어 完熟한 春蘭種子를 1983年 11月初에 採種하여 KOH 0.1N 을 添加한 Wilson 溶液으로 殺菌과 傷皮處理를 1時間 實施한 後 MS 培地에 pecton 3g/l 添加한³³⁾ 液體培地에 播種하여 1年間 生育된 rhizome 을 本試驗의 供試材料로 使用 하였다.

各 試驗에 適用된 培地는 MS 培地를 基本으로 하였고 기타 培地操作 方法과 培養室 條件은 慣行에 準하였으며 培地는 全處理 모두 pH 5.5 로 固定하였고 蔗糖은 30g/l 로 하고 培地의 固體狀態 유지를 爲하여는 寒天을 7g/l 를 添加하였다.

1. 培養幼苗의 發根試驗

1985年 8月初에 MS 에 BA 5ppm 과 NAA 5ppm 을 添加한 培地³³⁾에서 分化되어 生育되고 있던 幼苗들의 發根狀態가 一定하지 않았으므로 均一한 發根과 더불어 幼苗의 후속생장을 誘導하기 爲하여 다음과 같이 5 處理를 두어 實施하였다.

- 1) MS
- 2) MS + BA 5ppm + NAA 5ppm .
- 3) MS + BA 5ppm + NAA 5ppm + activated charcoal 2g/l
- 4) MS + activated charcoal 2g/l
- 5) MS + NAA 5ppm

試驗에 使用한 容器로는 300 ml 플라스크를 使用하여 容器當 50 ml 의 培地를 注入하였으며 培養對象幼苗는 3 cm 程度 크기로 容器當 5 個씩 10 反復으로 置床하여 培養 180 日後에 shoot 數, 發根數, 生體重을 調査하였다.

2. 活性炭添加에 의한 生長調節物質 吸收 效果

活性炭의 添加量은 2g/l 로 固定處理 하였는데 最適의 器官分化 培地로 提示된

³³⁾ MS + BA 5ppm + NAA 5ppm 處理를 基準으로 하여

- 1) MS

- 2) MS + NAA 5ppm
- 3) MS + NAA 5ppm + activated charcoal 2g/l (filtering)
- 4) MS + NAA 5ppm + activated charcoal 2g/l
- 5) MS + BA 5ppm
- 6) MS + BA 5ppm + activated charcoal 2g/l (filtering)
- 7) MS + BA 5ppm + activated charcoal 2g/l
- 8) MS + BA 5ppm + NAA 5ppm
- 9) MS + BA 5ppm + NAA 5ppm + activated charcoal 2g/l (filtering)
- 10) MS + BA 5ppm + NAA 5ppm + activated charcoal 2g/l
- 11) MS + activated charcoal 2g/l

等 11 處理를 두고 各各 10 反復으로 하였다.

活性炭은 純度를 높이기 爲하여 培地添加前에 0.1N HCl 溶液으로 24 時間 洗滌한 後 容器當 2g/l 되도록 培地에 添加하였다.

試驗處理에서 3), 6), 9) 번은 배지조제시 寒天添加前의 모든 操作을 하여 活性炭을 2g/l 添加하고 5 分間 교반하여 濾過紙 (Watman No.2)로 培地內에 함유된 活性炭을 除去한 後 寒天을 添加하고 培地 操作을 하였다.

試驗에 使用된 容器는 100ml 들이 플라스틱을 使用하였는데 容器當 20ml 의 培地를 注入하고 置床材料로는 培養된 根莖을 1cm 되게 切斷하여 容器當 1 個씩 置床하여 10 反復을 두고 培養 180 日 後에 shoot 數, 發根數, 根莖의 分枝數, 길이, 生體重을 調查하였다.

3. 培地에 添加된 몇가지 抗酸化劑의 效果

MS 培地에 BA 5ppm 과 NAA 5ppm을 혼용 添加한것을 基本으로 하여 抗酸化 機能이 있다고 알려진 ascorbic acid, aspartic acid 및 rutin 等 3가지 抗酸化 劑를 各各 10, 50, 100, 200 mg/l 의 濃度로 定하고 對照區를 包含한 13 處理에 10 反復을 두었다.

使用 容器로는 直徑 25 mm 되는 test tube 로서 tube 當 20 ml 되도록 培地를 注入 하였으며 置床材料로는 培養된 根莖을 1cm 되게 切斷하고 容器當 1 個씩 置床

하여 培養 180 日後에 shoot 數, 發根數, 生體重, 褐變程度를 調査하였다.

培地의 褐變程度測定은 達觀法에 의하여 褐變程度를 3 等級으로 두고 褐變이 가장 심한것은 3 點, 中間程度 2 點, 거의 變化없는 것은 1 點씩 주어 反復에 따른 平均値를 구하였다.

IV. 結果 및 考察

幼苗의 均一한 發根을 誘導하기 爲한 試驗結果는 Table 1.에서 보는 바와 같다. 生長調節物質이 添加된 培地 즉 BA5ppm 과 NAA5ppm 混用區와 NAA5ppm 單用區에서는 오히려 幼苗의 枯死程度가 심하게 나타난 반면 對照區와 活性炭이 添加된 培地에서는 활발한 發根誘導와 生育이 進行됨을 볼 수 있었다 [Photo1].

生長調節物質이 添加되지 않은 對照區에서도 發根이 促進되며 生體重이 增加한 것과 比較하여 볼 때 生長調節物質이 添加된 培地에서 오히려 低調한 結果를 나타낸 것은 本試驗에 供試된 幼植物體들이 種子를 發芽시켜 BA5ppm 과 NAA5ppm 혼합배지에서 誘起된 幼植物體를 利用하였기 때문에 이미 馴化 (habituation) 가 일어나 外生 生長調節物質에 對한 反應이 나타난 것으로 추측된다.

Table 1. Effect of BA, NAA and activated charcoal(A. C.) on the growth and differentiation of plantlet in *Cymbidium virescens* cultured for 180 days in MS medium.

Treatments	Number			Fresh weight (g)
	Roots	Shoots	Die-back	
Control	1.8	5.0a ^{z)}	—	4.0b
BA NAA 5ppm	—	5.7ab	1.8	2.3a
BA NAA 5ppm+A. C. 2g/1	2.6	6.6b	—	5.9c
A. C. 2g/1	3.0	6.2ab	—	6.0c
NAA5ppm	2.7	5.0a	2.0	3.9b

Z) Mean separation by DMR within columns, 5% level.

한편 生長調節物質의 無添加區에 活性炭이 添加되었을 境遇 發根效果가 뚜렷이 나타나는 것은 白等³⁾의 바나나 苗 發根試驗에서 活性炭의 添加效果와 蘇³⁾의 안개초 幼苗의 發根誘導試驗과 類似하게 나타났는데 白等³⁾에 의하면 活性炭은



Photo 1. Comparison of various rooting agent treatments on the *Cymbidium virescens* plantlets *in vitro*.

培養植物이 排出하는 代謝分泌物 즉 phenol 物質들을 吸收하므로 生育과 發根이 促進되는 것인지, 혹은 活性炭의 黑色粒子들이 培地の 자체를 검게하여 光源을 遮斷 하므로서 發育이 良好하게 되는지의 興否에 疑問점을 示唆하였다.

또한 Proskauer 와 Berman²⁸⁾은 活性炭을 添加하게 되면 光線이 遮斷되어 뿌리의 生長이 促進된다고 하였으며, Constantin 等⁶⁾의 報告로는 器官分化和 生育을 促進시키기 爲한 生長調節物質 處理가 活性炭의 添加에 依하여 相殺되기 때문에 活性炭 處理는 오히려 不利했다는 내용과는 相反되는 現象이지만 本試驗의 結果에서 나타난 바에서 볼 수 있듯이 NAA5ppm 과 BA5ppm 混用 處理된 培地에 다시 活性炭을 添加하므로서 發根數가 增加됨은 물론 生体重도 크게 增加한 것은 添加된 活性炭이 生長調節物質 處理에 依한 培地の 酸化를 防止한 結果라 思料된다.

Table 2.는 活性炭의 添加에 의한 生長調節物質의 吸收關係를 밝히기 爲한 結果이다. 培地調製時 活性炭을 넣었다가 다시 濾過한 處理에서 生長調節物質의 影響이 없는것으로 보아 2g/l 의 活性炭은 5ppm 水準의 BA와 NAA 를 吸收하

였음을 보여준 것이라 思料되었다.

Weatherhead 等³⁹⁾은 담배의 藥培養中 sucrose 의 分解에 의하여 生成되는 5-hydroxymethyl furfural 과 같은 毒物物質이 活性炭에 吸收되므로서 培養의 成功率를 높일 수 있었다고 하였고, Hu 와 Wang⁴⁰⁾은 植物體가 傷處를 받을 때 排出해 내는 物質은 polyphenolic compound로서 이러한 物質이 培地內에서 polyphenoloxidases 에 의하여 酸化되므로 培養植物體 生育을 阻害시키는 물론 培地의 褐變을 促進한다고 하였다. 이런 物質들은 대체로 benzyl 기를 가지고 있는 BA 와 naphthyl 기를 含有하고 있는 NAA 가 芳香性物質이기 때문에 活性炭에 吸收된 것이라 思料되었다.

Table 2. Interaction of the activated charcoal and exogenous growth regulators on the growth and differentiation of the rhizome in *Cymbidium virescens*.

Treatments	Number			Rhizome length (cm)	Fresh weight (g)
	Shoots	Roots	Rhizome branch		
Control	-	-	26.1	1.2	3.44b ^{z)}
NAA5ppm	-	-	7.5	1.5	0.65a
" + A. C. (filtering)	-	-	20.1	2.5	3.12b
" + A. C.	1	2	5.6	3.1	2.92b
BA5 ppm	2	-	1.6	0.9	0.32a
" + A. C. (filtering)	-	-	27.1	2.3	3.17b
" + A. C.	1.6	2.4	3.7	2.4	2.83b
BA5 ppm + NAA 5ppm	1	-	1.8	1.1	0.38a
" + " + A. C. (filtering)	-	-	21.6	2.2	3.43b
" + " + A. C.	1.3	1	5.1	3.0	2.76b
Control + A. C.	1.8	-	18.5	2.6	2.06ab

Unit of plant growth regulators is milligram per liter.

A.C(activated charcoal) was contained two gram per liter in MS medium.

Z) Mean separation by DMR within columns, 5 % level.

따라서 本試驗對象 植物인 春蘭의 境遇에서도 活性炭이 添加되어 根莖發育에 좋은 條件이 造成 되었기 때문에 本植物의 生理, 生態的 習성에 따라 植物體의

發生이 自然的으로 誘起되었다고 思料되는 바이다.

根莖의 길이는 측지 發生數와 關係가 있는 것으로 나타나고 있는데 (Table 2) 이는 活性炭에 의하여 光線이 遮斷 되었을 때는 橫的인 伸張이 誘導되어 根莖의 길이가 길어지는 現象을 나타내었으며, 活性炭이 添加되지 않은 培地에서는 光線에 對한 忌避現象으로서 측지를 多量發生 하였지 않았는가 여겨졌다.



Photo 2. Growth response of *Cymbidium virescens* rhizome to the activated charcoal treatment in the MS medium with NAA or BA 5ppm respectively.

한편 活性炭과 生長調節物質의 吸收關係를 볼 때 NAA 와 BA를 單用이나 混用 添加하고 濾過한 모든 處理區에서 添加된 全量의 物質이 吸收되어 濾過 되었기 때문에 生體重에서 3處理 모두 類似하게 生育하였다. 그리고 附加的으로 添加한 活性炭 含有 3處理에서도 生體重의 差異는 나타나지 않았지만 活性炭의 有無에 따라 分化程度의 差異가 나타난 것은 培地에 對한 光線透過 有無의 結果로 볼 수 있겠다 [Photo 2].

즉 濾過한 區에서는 培地内部에 光線이 透過됨에 따라 光線回避能이 刺戟 되어 측지를 多量發生시킨 結果로 生體重이 增加된데 반하여 活性炭의 添加에서는 光線이 遮斷되므로서 어느程度의 根莖生育期를 經過한 後 個體發生이 誘導 되었기 때문에 生體重이 그보다 低調하지 않았을까 思料되며 비록 吸收한 生長調節物質이라 하더라도 培養期間이 經過함에 따라 吸收物質의 親水性和 疏水性比에 의하여 약간씩 放出 되므로서 器官分化가 誘導된 것인지는 앞으로 더욱 치밀한 研究가 繼續 되어야 할 果題라 思料된다.

活性炭은 BA나 NAA 즉 生長調節物質을 吸收하는 것이 밝혀지므로서 器官分化를 爲하여 生長調節物質이 添加되는 境遇에 培地가 산화되므로 이를 防止하기 爲한 試驗結果는 Table 3에서 보는 바와 같다

ascorbic acid에 關하여는 Mocomb와 Newton²¹⁾이 *Angioganthos*의 生長點 培養에서 0.55M의 濃度가 培地의 酸化를 防止 하였다는 報告와, Ichihashi와 Kako¹²⁾의 *Cattleya* 生長點培養에서 5mM의 濃度로 處理했을 境遇 培地의 酸化가 防止 되었다는 報告가 있었지만 本試驗의 結果에서는 별다른 效果가 認定되지 않았다.

그러나 aspartic acid 100 mg/l 添加區와 rutin 200 mg/l 添加區에서는 酸化防止와 器官分化가 各各 良好한 結果를 보이고 있는데 이는 Ueda와 Torikata³⁶⁾의 *Cymbidium* 培養에 대한 報告와 Raghavan²⁷⁾의 *Cattleya* 培養에서, 李等²⁰⁾의 寒蘭培養에서 Aspartic acid處理 效果들과 같은 傾向이었으며, rutin에 對하여는 最近의 報告들로서 白²⁾ 및 Ishii¹³⁾는 *Cattleya* 培養에서 100 mg/l 添加 또는 50~100mg/l 添加가 效果的이라 하였으며 李²⁰⁾等도 寒蘭의 根莖培養時 rutin 250mg/l을 添加하고 이때 특히 NAA 1 mg/l를 添加하면 個體와 뿌리의 生育이 旺盛하였음을 報告한 바 있다.

抗酸化劑의 添加效果를 볼 때 만약 培地가 褐變하지 않더라도 處理된 生長調節物質에 따른 器官分化가 없거나 微弱하고 오히려 callus 나 단일 個體의 生育

Table 3. Effect of various anti-oxidants on the growth and differentiation of *Cymbidium virescens* rhizome cultured for 180 days MS medium. ^{z)}

Treatments	Number		Fresh weight (g)	Degree of browning ^{y)}
	Shoots	Roots		
Control	2.4	1.0	1.63ab ^{x)}	2.8i
Ascorbic acid (mg/l)	10	1.0	1.40a	2.0f
	50	2.3	1.51a	2.4h
	100	1.3	1.70ab	1.8e
	200	1.0	1.74ab	1.8e
Aspartic acid (mg/l)	10	2.7	1.97bc	2.2g
	50	3.3	2.29cd	2.4h
	100	1.6	2.72ef	1.6d
	200	1.0	2.45de	2.0f
Rutin (mg/l)	10	1.3	2.28cd	1.8e
	50	1.5	2.59def	1.4c
	100	4.2	2.91f	1.3b
	200	7.7	4.1g	3.20g

z) MS medium were supplemented BA 5ppm+NAA5ppm for good organogenesis.

y) All numericals were scored visually from 1 to 3 point.

x) Mean separation by DMR within columns, 5% level.

만이 展開 된다면 抗酸化劑의 處理를 認定할 수 없다고 思料된다.

따라서 本試驗의 結果에서는 rutin 200mg/l 處理區가 褐變程度, 生體重 그리고 특히 個體發生 및 發根이 容易하게 이루어진 點으로 보아 가장 推薦할 만한 結果라 생각된다 [Photo 3].

그러나 幼苗의 發根試驗에서 나타난 바와 같이 種子를 播種하여 얻은 生育 初期 段階인 根莖을 가지고 生長調節物質 處理를 할 境遇에는 培地の 酸化가 비교적

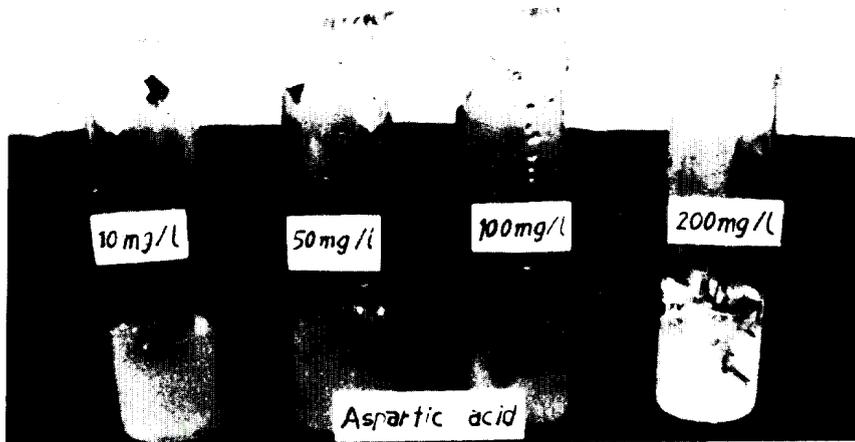


Photo 3. Growth responses of *Cymbidium virescens* rhizome to the several concentrations of anti-oxidants.

없었고 供試한 春蘭의 根莖에서는 MS 培地에 BA 5ppm과 NAA 5ppm 혼용添加에서 가장 좋은 結果를 나타냈다. 그러나 일단 生長調節物質處理를 經驗한 根莖이나 幼植物體들은 그들 自體가 排出하는 代謝分泌物에 의하여 生育이 低調해지며 심한 境遇에는 褐變枯死하는 境遇가 發生하였다.

특히 BA 濃度가 높아짐에 따라 培地의 褐變 정도가 比例的으로 나타나고 있는데 이러한 現象에 對하여는 東洋蘭系統 植物들의 독특한 特性인지 혹은 生長調節物質에 馴化되는 程度가 敏感하기 때문에 BA에 의하여 刺戟을 심히받아 正常的인 物質代謝生理가 깨어진 것인지에 대하여는 追後檢討 되어야 할 問題點 이라 思料된다.

摘 要

春蘭의 急速増殖을 爲한 組織培養 技術을 改善시키고자 試驗하여 얻어진 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 幼苗의 發根은 MS 培地에 生長調節物質이 없거나 活性炭이 添加되었을때, 生體重과 發根이 促進되었다.
2. 活性炭 2g/ℓ 添加는 各各 5ppm의 NAA 및 BA를 吸收하였으므로 活性炭을 添加한 境遇의 培養에는 生長調節物質의 添加는 그 效果가 없었다.
3. 培地의 酸化防止 效果로는 rutin 200mg/ℓ의 添加가 가장 效果的이었으며 aspartic acid 100mg/ℓ 添加도 그 效果가 認定되었으나 ascorbic acid는 效果가 없었다.

參 考 文 獻

1. Anderson, J. W. 1968. Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissue. *Phytochemistry* 7: 1973-1988.
2. 白基燁, 1982. *Cymbidium* 生長點 培養에 관한 研究.
慶北大學校 大學院 博士學位論文.
3. 白子勳, 蘇寅燮, 金承權, 1985. 熱帶營養繁殖 作物의 增殖에 관한 研究.
農振廳, 産學協同 '85-20.
4. 鄭鳳鐸, 1985. 韓國春蘭의 種子無菌培養 및 生長點 培養에 관한 研究.
圓光大學校 大學院 碩士學位 論文.
5. 鄭載東, 全在琪, 金聖洙, 李宗錫, 1985. 自生寒蘭 (*Cymbidium Kanran*)의 rhizome 生長과 器官分化. *韓園誌*, 26(3): 281-288.
6. Constantin, M. J., Henk, R. R. and M. A. Mansur, 1977. Effect of activated charcoal on callus growth and shoot organogenesis in tobacco. *In Vitro*, 13: 293-296.
7. Drew, R. L. K. 1979. Effect of activated charcoal on embryogenesis and regeneration of plantlets from suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.). *Ann. Bot.* 44: 387-389.
8. Ernst, R. 1974. The use of activated charcoal in asymbiotic seedling culture of *Paphiopedilum*. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 43: 35-38.
9. Fridborg, G. and T. Eriksson, 1975. Effects of activated charcoal on growth and morphogenesis in cell culture. *Physiol. plantarum.* 34: 306-308

10. 洪萬選, 1664 - 1715. 山林經濟(1974. 景仁文化社 影印本)
券之四. P 197 - 199.
11. Hu, C. Y. and P. J. Wang, 1983. Meristem, shoot tips and bud culture In : Hand book of plant cell culture, ed. Evans, S. and A. Yamada Macmillan Pub. Co. New York, pp 177 - 227.
12. Ichihashi, S. and S. Kako, 1977. Studies on clonal propagation of *Cattleya* through tissue culture method. II. Browning of *Cattleya*. J. Japanese. Soc. Hort. Sci., 46(3) : 325 - 330.
13. Ishii, M. 1980. Studies on tissue culture of *Cattleya* species. III. The relationship between seasonal changes in phenolic substances exuded from pseudobulb tissues and the survival rate of explant. J. Japanese. Soc. Hort. Sci., 49(1) : 127 - 131.
14. 加古舞治, 1968. シュンラン 種子の発芽に関する研究.
ラン科植物の種子形成と無菌培養. 誠文堂新光社. 174 - 237.
15. Klein, B. and M. Bopp, 1971. Effect of activated charcoal in agar on the culture of lower plant. Nature, 230, 474.
16. Knudson, L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchids seed. Bot. Gaz., 73 : 1 - 25.
17. Kokudu, T., Y. Kaieda and Y. Higashi, 1980. Organogenesis in sterile culture of oriental *Cymbidium*, *Cymbidium Kanran* Makino. Mem Fac. Agr. Kagoshima Univ. 16 : 53 - 64.
18. Lee, E. C. M. and de Fossard, R. A. 1977. Some factors affecting multiple bud formation of strawberry (*Fragaria ananassa* Duchesne) in vitro. Acta Hort., 78, 187.
19. Lee, E. C. M. and de Fossard, R. A. 1975. Regeneration strawberry

- plant from tissue cultures. Proc. Int. Plant Prop. Soc., 25, 277.
- 20.李宗錫, 蘇寅燮, 鄭載東, 1985. 寒蘭의 根莖生育에 미치는 각종 添加物質의 影響에 관한 研究. 農振廳, 産學協同 '85 - 19.
 21. Martineau, B., M. R. Hanson and F. M. Ausbbel. 1981. Effect of charcoal and hormones on anther culture of *Petunia* and *Nicotiana*. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 102 : 109 - 116.
 22. Mccomb, J. A. and Newton, S. 1981. Propagation of *Kangaroo* paws using tissue culture. J. Hort. Sci. 56 : 181 - 183.
 23. Morel, G. M. 1960. Producing virus - free *Cymbidiums*. Amer. Orchid. Soc. Bull. 29 : 495 - 497.
 24. Nagashima, T. 1982. Studies on the seed germination and embryogenesis in the *Cybidium goeringii* Reichb. f. and *Phapiopedilum insigne* var. *Sanderae* Reichb. f. J. Japanese. Soc. Hort. Sci. 51(1):94-105.
 25. Proskauer, J. and R. Berman. 1970. Agar culture medium modified to approximate soil conditions. Nature 227, 1161.
 26. Raghavan, V. 1964. Effects of certain organic nitrogen compounds on growth *in vitro* of seedlings of *Cattleya*. Bot. Gaz. 125(4) : 260 - 267.
 27. Rangan, T. S. 1984. Pineapple, In: Handbook of cell culture I, Ed. by Evans, D. A., W. R. Sharp, and S. P. Amirato. Macmillan Pub. Co. London, pp. 373 - 382.
 28. Reinert, J. and Y. P. S. Bajaj. 1977. Plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, New York, pp. 41 - 42.
 29. Reynold, J. F. and Murashige, T. 1979. Asexual embryogenesis in callus cultures of palm, *In Vitro*, 15, 383.

30. Skirvin, R. M. and Chu, M. C. 1977. Tissue culture may revolutionize the production of peach shoot. III. Res., 19, 18.
31. 蘇寅燮, 1985. Virus 無毒株 生産을 爲한 안개초의 生長點 培養에 관한 研究, 濟州大. 亞農研, 2 : 141 - 147.
32. 蘇寅燮, 1983. *Saintpaulia ionantha wendl* 의 組織培養에 관한 研究 I. 各種生長調節物質의 組合에 따른 器官分化에 관하여. 韓園誌, 24(1): 86 - 91.
33. 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 번식에 관한 研究. 韓園誌, 26(4) : 375 - 380.
34. 澤完島鴻博高. 1968. カンランの 無菌發芽. 増補ラン科植物の 種子形成と 無菌培養. 誠文堂新光社. 296 - 301
35. Ueda, H. and H. Torikata. 1970. Organogenesis in the meristem culture of *Cymbidium*. V. Effects of light and culture medium on adventitious root formation. J. Japanese Soc. Hort. Sci. 39(4) : 73 - 78.
36. Ueda, H. and H. Torikata. 1969. Organogenesis in the meristem tissue cultures of *Cymbidium*. II. Effect of growth substances on the organogenesis in dark culture. J. Japanese Soc. Hort. Sci 38(2): 78 - 83.
37. Vij, S. P., A. Stood, and K. K. Plata. 1984. Propagation of *Rhynchosyris retusa* BL. (orchidaceae) by direct organogenesis from leaf segment cultures. Bot. Gaz. 145(2) : 210 - 214.
38. Wang, P. J. and L. C. Huang. 1976. Beneficial effects of activated charcoal on plant tissue and organ cultures. *In Vitro*, 12(3) : 260 - 262.

-
- 39 Weatherhead, M. A., Burdon, J., and Genshaw, G. G. 1978. Some effect of activated charcoal as an additice to plant tissue culture media. *Z. pflanzenphysiol.* 89 : 141 – 147.
40. Yates, R. C. and J. T. Curtis. 1949. The effect of sucrose and other factors on the shoot – root ratio of orchid seedlings. *Amer. J. Bot.* 36(5) : 390 – 396.



謝 辭

本 研究를 遂行함에 있어서 實驗設計에서부터 始終 아낌없이 直接 指導하여 주신 蘇寅燮 教授님께 衷心으로 深謝의 뜻을 表합니다.

그리고 간곡한 忠告와 論文의 校閱을 하여 주신 濟州大學校 園藝學科의 韓海龍 教授님, 白子勳 教授님, 張田益 教授님, 文斗吉 教授님, 李宗錫 教授님 그리고 朴庸奉 教授님께도 深甚한 感謝를 드리며, 또한 本 論文 作成에 始終 指導 鞭撻을 해주신 濟州道 農村振興院 金英輝 課長님과 職員여러분께 謝意를 表하며, 勞心焦思 걱정하시고 뒤를 돌봐 주신 父母님께 感謝드리는 바입니다.

