

한란의 금속증식을 위한 생장조절물질과 항산화제 처리효과

소인섭[†] · 최지용 · 고태신 · 이종석*

제주대학교 원예학과

*서울여자대학교 원예학과

Effects of Plant Growth Regulators and Anti-oxidants on Rapid Multiplication of *Cymbidium kanran*

In-Sup So[†], Ji-Yong Choi, Tae-Sin Ko, and Jong-Suk Lee*

Department of Horticulture, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

*Department of Horticultural Science, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

Abstract

Effects of plant growth regulators and anti-oxidants for rapid multiplication of *Cymbidium kanran* were investigated. The best gelling agent was 2.5 g/l gelrite which needed less quantity (about 28%) and half price than 9 g/l chemical agar. Undefined edible agar was only a little bit worse than chemical agar in growth, but the price was half as much as the latter. The higher concentration of BA and NAA, the deeper browning of medium that prevented from performing its functions of plant growth regulators. Polyvinylpyrrolidone (M.W. 40,000) was the most effective anti-oxidant other than ascorbic acid, aspartic acid, and rutin in protecting the browning of medium, enhancing the effect of plant growth regulators, and thus prolonging the subculture cycle. Vigorous seedlings were obtained by 0.1~1.0 mg/l BA, 0.1 mg/l NAA and 1 g/l polyvinylpyrrolidone treatments. Therefore, the best result for growth and economic aspects in rhizome culture of *Cymbidium kanran* were obtained by using MS basal medium with 2.5 g/l gelrite, 1 g/l polyvinylpyrrolidone, 0.1~1.0 mg/l BA and 0.1 mg/l NAA.

Key words : polyvinylpyrrolidone, orchid, tissue culture, micropropagation

서론

한란(*Cymbidium kanran*)은 그윽한 향기와 고아한 초세가 더욱 돋보이는 난이며 특히 한기가 내려 깔리는 늦가을에 꽃망울을 터뜨리는 개화습성이 있기에 한란의 가치가 더욱 돋보인다. 제주 자생종으로 알려져 애호도가 높은 한란은 우리 나라 천연기념물 191호로 지정보호되고 있기는

하지만 춘란과 달리 자생지가 파괴되어 개화주를 찾아 볼 수 없을 만큼 멸종 위기에 있다. 지금에는 한란과 춘란까지도 조직배양기술을 이용한 인위증식법이 국내의 몇몇 연구가들에 의해 확립되어^{3,12)} 종자 무균발아법으로부터 개체 증식까지의 단계가 체계적인 방법에 의하여 자유자재로 생산될 수 있다는 점이 고무적이라 하겠다.

그러나 배양대상 식물의 종이나 품종에 따라서도 적용되

[†] Corresponding author

는 배지의 종류가 다르며 특히 개체 분화를 위한 auxin과 cytokinin의 종류와 농도조합 등 각각의 연구 결과들이 다르게 제안되므로^{1,6,7)} 이러한 문제점 해결을 위한 보다 체계적인 연구가 요망된다.

동양란의 근경 배양시 배지가 심하게 갈변하여 정상적인 생육이 저해되고, 식물생장조절물질의 효과가 나타나지 않는데, 이러한 현상은 배양 중 배양식물이 분비하는 페놀화합물에 의하여 배지내의 유효 무기이온들이 산화되므로 발생하는 현상이다^{4,5,10,11)}. 한란의 경우에는 생장조절물질 중 특히 cytokinin류의 첨가와 그 농도의 증가에 따라 갈변도가 심하게 나타난다. 따라서 한란의 급속증식을 위한 불활성지질과 항산화제의 선별, 식물생장조절물질의 최적 농도, 그리고 그에 따른 배지의 갈변도와 배지 내 페놀화합물의 함유 정도 등의 연구를 통해 한란의 근경배양과 효율적인 배양방법을 개발하고자 일련의 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

공시재료로 사용된 한란의 근경은 한란의 적화(赤化)×자화(紫化)를 인공 수분시켜 1년간 성숙된 종자를 발아시켜 얻어진 근경을 충분히 확보한 후 재료식물로 사용하였고, 종자발아는 So와 Lee²⁾의 방법에 준하였다.

MS 기본배지에 2 mg/l BA+2 mg/l NAA 배지를 정하여 항산화제로써 10 mg/l ascorbic acid, 10 mg/l aspartic acid, 100 mg/l rutin, 1 g/l polyvinylpyrrolidone (PVP, M.W. 40,000)와 2 g/l 활성탄을 첨가하여 300 ml 플라스크에 50 ml 씩의 주입한 배지에 2 cm로 절단된 근경을 3개씩 치상하여 10반복으로 배양하였다. 이때 불활성지질의 종류별 효과를 검증하기 위하여 9 g/l 식용 한천, 9 g/l 시약용 한천 (Junsei Co.) 그리고 2.5 g/l gelrite (gelan gum) 등 3처리를 기본으로 한 배지에서 항산화제의 효과를 검증하였다.

배양조건은 25±2℃에 16시간 인공조명조건과 1.5 klux의 조도가 조성된 제주대학교 원예학과 식물조직배양실에서 배양하였다.

이상의 시험에서 가장 좋은 결과를 보인 2.5 g/l gelrite 처리와 1 g/l polyvinylpyrrolidone (PVP)가 첨가된 MS 기본배지를 사용하여 BA와 NAA를 0, 0.1, 1.0, 5.0, 10.0 mg/l로 교호조합하여 단용 혹은 혼용된 생장조절물질처리

로 총 25처리에 10반복을 두었으며, 이외에도 생장조절물질 무첨가에 2 g/l 활성탄 처리를 두어 6개월 후의 생육을 관찰하였다.

배지의 갈변도 측정은 Hendel 등⁸⁾의 방법에 따라 수행하였다. 즉, 배지의 70% ethanol 추출물을 농도 범위에 맞게 같은 용매로 희석하여 420 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

페놀화합물은 Swain과 Hillis¹⁴⁾의 방법에 따라 수행하였다. 즉, 0.4 ml의 70% ethanol 추출액에 7 ml의 증류수와 0.54 ml의 Folin-Denis 시약을 가하여 섞어준 다음 3분 후에 1 ml의 Na₂CO₃ 포화용액을 가하여 잘 섞어 주었다. 한시간 동안 정치하였다가 725 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

조직배양의 경우 생산원가의 절반 가량을 차지하는 것이 불활성 지지물에 투여되기 때문에 원가 절하의 측면에서 3종의 지지물 사용에 대한 배양 반응을 보기 위한 시험으로써 한란 근경 배양 결과, 신초 발생수에서는 2.5g/l gelrite 처리에서 7.6개로 가장 많았고, 식용한천 처리구가 가장 적은 5.4개로 나타났다(Table 1). 초장은 큰 차이가 없었으나 뿌리의 발생수나 길이는 식용한천 처리구에서 가장 긴 6.8 cm까지 발생하였다. 근경 생육면에서는 gelrite 처리구에서 3.2 g으로 가장 무거웠고, 근경의 분지수는 8.5개로 식용한천 처리구에서 가장 많았다.

gelrite와 한천을 비교해 볼 때 gelrite가 가장 우수한 결과를 보이고 있는데, gelrite는 *Pseudomonas*가 glucose를 기질로 하여 생산하는 hetero polysaccharide의 일종으로 무미, 무취, 무독성의 백색 분말이며 시약 한천의 1/2-1/4 농도로 사용해도 한천과 같은 강도의 gel을 얻을 수 있는 장점이 있다²⁾. 또한 식물조직배양 등에 사용하면 수용액 속의 양이온과 결합하여 내열성을 가지며 낮은 산도에서도 gel의 강도가 저하되지 않고 식물체의 생장속도를 가속화한다는 것이다. 이와 같은 측면에서 볼 때, 지금까지 한천만 사용하던 기존의 관념에서 탈피하여 신제품으로써 gelrite의 이용은 9 g/l 한천과 비교할 때 g당 단가가 시약한천보다 2배 비싸다 하여도 2.5 g/l 즉, 약 28%의 양으로 한천과 대체한다고 볼 때 생산원가의 비교상 한천의 거의 절반 가량으

Table 1. Effects of various gelling agent with MS medium on rhizome culture of *Cymbidium kanran*

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

Basal medium were MS medium contained with 2 mg/l BA and 2 mg/l NAA.

Table 2. Effects of anti-oxidants contained with MS medium on rhizome culture of *Cymbidium kanran*

Anti-oxidant	Shoot		Root		Rhizome		Intensity of brown coloring
	No. (ea)	Length (cm)	No. (ea)	Length (cm)	Weight (g)	Tiller (ea)	
Control	8.7	0.6	0.0	0.0	0.65	0.0	++++
Ascorbic acid(10 mg/l)	3.0	4.5	4.4	5.4	3.32	8.7	+++
Aspartic acid(10 mg/l)	3.4	4.8	4.8	5.0	3.52	8.0	+++
Rutin(100 mg/l)	3.6	4.3	5.2	5.8	2.95	5.2	++
Polyvinylpyrrolidone(1 g/l)	5.2	5.8	4.5	5.2	2.45	3.6	+

Basal medium were MS medium contained with 2 mg/l BA and 2 mg/l NAA.

로 투자비용을 낮출 수 있다고 하겠다. 또한 한천보다 배지의 투명도가 월등히 좋아 세균 오염시에도 한천에 비해 육안으로 쉽게 판별될 수 있는 장점도 있다.

식용한천은 시약용 한천보다 가격면에서 1/3 가격으로 구입할 수 있는데, 식용한천은 정제가 미흡하여 다소의 염분과 불순물이 혼합되어 있으나, 본 연구의 결과와 같이 생육이나 개체 발생면에서 고가의 시약용 한천에 비해 별다른 손색이 없다면 앞으로 식용한천의 이용성을 높일 수 있는 개체 식물에 대한 적응성 검증도 필요하다 하겠다.

한란 근경 배양시 몇가지 산화방지제 처리에 의한 산화방지 효과를 볼 때, 우선 대조구에서 신초의 발생수가 8.7개로 타처리에 비하여 월등한 발생율을 보인다. 그러나 뿌리의 발생수나 근경생장이 거의 없고 배지의 갈변도가 극심함을 알 수 있다. 한편, 착염효과가 인정되어 항산화 효과가 있다고 알려진 ascorbic acid와 aspartic acid는 무처리에 비하여 신초 발생수는 적지만 근경 발육과 배지의 갈변도에서 약간 향상된 결과가 나타났다. 100 mg/l rutin 처리에서는 개체수, 뿌리수, 근경 무게 및 분지 발생수가 이상의 항산화제보다 적었으나 배지의 갈변도는 어느 정도 방지된 결과를 보였다. 그러나 1 g/l PVP 처리에서는 개체

발생과 신초장, 그리고 발근상태는 타처리보다 월등히 높았고, 근경의 성장과 분지수는 적었으나 본 시험의 목적인 갈변 방지 효과는 가장 좋았다.

배양중 배지의 갈변은 배양 식물이 분비하는 phenolic compound에 의하여 배지내의 유효 무기이온들이 산화되므로 발생하는 현상인데^{11,12)}, 이는 배양 재료 식물의 영양상태⁹⁾ 혹은 생육시기별¹⁰⁾에 따라 서로 다르게 나타나며, 대사분비물로서 페놀화합물의 발생량 증감에 따라 좌우된다. 이러한 현상을 방지하기 위해서는 활성탄의 처리가 우선적으로 제안되고 있음을 몇몇 보고에서 접할 수 있다^{5,6,7)}. 그러나 활성탄의 첨가는 조직배양 이용면에서 필수적이라고 할 수 있는 생장조절물질은 거의 흡수하므로써 생장조절물질 처리효과를 상쇄시킨다는 사실이 So와 Park¹³⁾에 의하여 실증된 바, 활성탄 첨가를 능가하는 항산화제의 종류와 농도를 찾는 것이 본 연구의 목적이다. 한란의 경우에는 생장조절물질 중 특히 cytokinin류의 첨가와 그 농도의 증가에 따라 갈변도가 심하게 나타난다. 따라서 그러한 반응이 심하게 발생하는 종에 대해서는 항산화제의 사용이 필수적이라 할 수 있는데, 본 연구에서는 여타의 항산화제보다 특히 PVP의 첨가에 의하여 항산화 효과를 탁월하게

확인할 수 있었으며, 동양계 *Cymbidium* 경정배양 결과와도 일치하였다³⁾.

한란 근경의 급속증식배양을 위한 식물생장조절물질의 처리와 산화방지효과의 시험 결과 1 g/l PVP 처리에서 식물생장조절물질의 효과가 탁월하게 나타난 반면, PVP 무처리구에서는 성장반응이 제대로 나타나지 않았다 (Fig. 1, 2, 3, 4).

근경의 분지수에서 PVP 처리구가 무처리구에 비해 전체적으로 0.1 mg/l BA 처리구에서 가장 좋게 나타났고, BA 농도가 증가할수록 분지수가 감소하였다. 0.1 mg/l BA와 0.1 mg/l NAA 혼합처리구에서 가장 좋은 효과를 나타내었다.

신초의 발생수에서는 BA의 농도가 증가할수록 신초의 수가 증가하는 경향이었으나 PVP 무처리구에서는 반응이

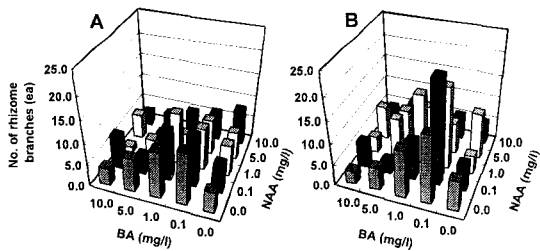


Fig. 1. Effects of various concentration of NAA and BA on rhizome growth of *Cymbidium kanran* in MS medium supplemented with (B) and without (A) polyvinylpyrrolidone.

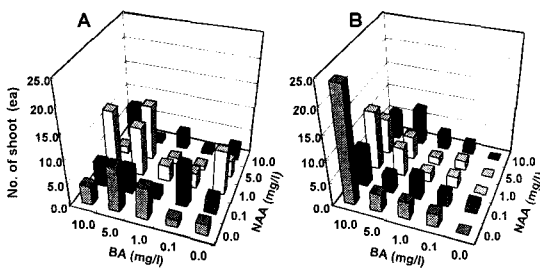


Fig. 2. Effects of various concentration of NAA and BA on shoot number of *Cymbidium kanran* in MS medium supplemented with (B) and without (A) polyvinylpyrrolidone.

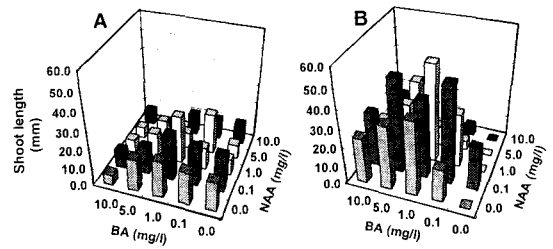


Fig. 3. Effects of various concentration of NAA and BA on shoot length of *Cymbidium kanran* in MS medium supplemented with (B) and without (A) polyvinylpyrrolidone.

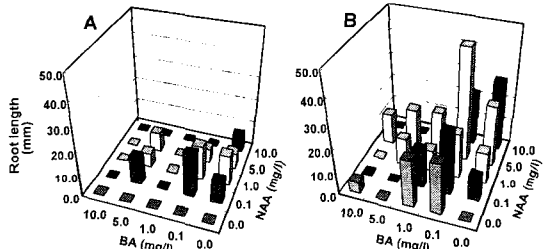


Fig. 4. Effects of various concentration of NAA and BA on root length of *Cymbidium kanran* in MS medium supplemented with (B) and without (A) polyvinylpyrrolidone.

일정하지 않았다. 신초장에서는 PVP 처리구가 무처리구에 비해 월등히 좋았는데, 특히 1.0 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA 구에서 가장 좋았고, 5.0 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA 구, 0.1 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA 구에서 좋은 결과를 보였다.

뿌리의 길이에서도 PVP 처리구가 무처리구보다 좋은 효과를 나타내었는데, NAA 농도가 증가할수록 뿌리의 길이가 길었다.

전체적인 생육반응 결과 PVP 처리구가 무처리구에 비해 월등히 좋은 반응을 보였고, 분지수, 신초 발생수, 신초장, 근장 등 모든 면을 고려할 때 MS 기본배지에 0.1 mg/l BA, 0.1 mg/l NAA, 그리고 1 g/l PVP가 가장 좋은 결과를 나타냈다. 1.0 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA 처리구는 신초장은 가장 길었지만 분지수나 신초발생수, 근장 등에서 0.1 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA 처리구에 비해 좋지 못했다.

배지의 산화방지에서 PVP 처리구가 무처리구에 비해 월

등히 좋은 결과를 나타내었는데, 대조구로 사용된 활성탄 처리구보다 더 좋은 결과를 나타냈다 (Fig. 5, 6). 한편, 무처리구는 식물생장호르몬의 농도가 높을수록 갈변도가 심하게 나타난 반면, PVP 처리구는 갈변현상이 억제되었다.

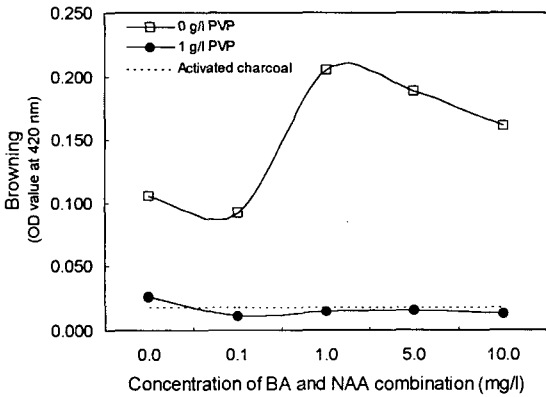


Fig. 5. The effect of polyvinylpyrrolidone (PVP) on the degree of the browning.

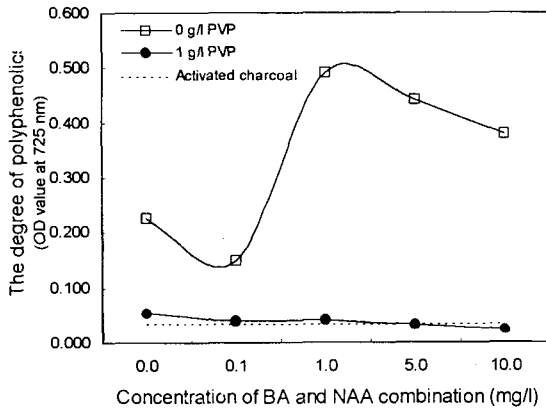


Fig. 6. The effect of polyvinylpyrrolidone (PVP) on the degree of polyphenolics.

한란의 기내 배양시 흔히 나타나는 배지의 갈변화는 최대 흡광도가 725 nm의 페놀화합물인데¹¹⁾ PVP 처리를 통하여 배지내의 유효 무기물과의 산화를 방지하는 효과로 인하여 배지의 안정성을 높이므로 특히 한란과 같은 갈변화가 심한 식물의 배양에 꼭 필요한 약제라고 사료된다.

따라서 한란의 경우 급속한 개체 증식을 위해서는 0.1-1.0 mg/l BA 수준에 0.1 mg/l NAA를 처리하고, 1 g/l PVP 첨가를 통해 배지의 산화를 억제하고 식물생장조절물질의 역할이 정상적으로 작용하여 적은 양의 식물생장조절물질의 사용으로 좋은 개체를 확보할 수 있는 것으로 나타났다.

적 요

한란(*Cymbidium kanran*)의 급속증식을 위한 식물생장조절물질과 항산화제의 처리결과, 2.5 g/l gelrite가 성장과 경제적인 면에서 우수하였는데, 9 g/l 시약한천보다 적은 약 28% 정도의 양과 절반 정도의 가격으로 우수한 결과를 나타냈다. 식약한천은 시약한천에 비해 절반 정도의 가격으로 거의 비슷한 생육을 보였다. BA와 NAA의 농도가 높을수록 배지의 갈변도가 심하였으며, 식물생장조절물질의 작용을 억제하였다. Polyvinylpyrrolidone (PVP, M.W. 40,000)이 ascorbic acid, aspartic acid, rutin 보다 우수 항산화제인 것으로 나타났다. 식물생장조절물질 처리에서는 0.1-1.0 mg/l BA와 0.1 mg/l NAA, 1 g/l PVP 처리구가 가장 좋은 생육을 보였다. 따라서 한란의 경우 급속한 개체 증식을 위해서는 MS 기본배지에 2.5 g/l gelrite를 불활성 지지물로 사용하고, 0.1-1.0 mg/l BA 수준에 0.1 mg/l NAA를 처리하고, 1 g/l PVP 첨가를 통해 배지의 산화를 억제하여 배양기간을 연장하고, 식물생장조절물질의 역할이 정상적으로 작용하도록 하여 적은 양의 식물생장조절물질의 사용으로 강건한 묘를 확보할 수 있는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지정 제주대학교 아열대원에 산업연구센터의 지원에 의한 것입니다.

참 고 문 헌

1. Anderson, W. C.: Propagation of *Rhododendron*: Part I, Development of culture medium multiplication of shoots. Proc. Int'l. Plant Prop. Soc., 25, 129 (1975).
2. Beverly, J. N., Furneaux, R. H. and Stevenson, T. T.

- : Identification of an agar constituent responsible for hydric control in micropropagation of radiata pine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 43, 1 (1995).
3. Choi, S. O., Chung, J. D. and Lee, J. H. : Effect of culture media on rhizome formation and its subsequent growth from shoot-tip culture of temperate *Cymbidium* species. *Korean J. Plant Tissue Culture*, 23, 167(1996).
 4. Constantin, M. J., Henk, R. R. and Mansur, M. A. : Effect of activated charcoal on callus growth and shoot organogenesis in tobacco. *In Vitro*, 13, 293 (1977).
 5. Drew, R. L. K. : Effect of activated charcoal on embryogenesis and regeneration of plantlets from suspension cultures of carrot (*Daucuscarota* L.). *Ann. Bot.*, 44, 387(1979).
 6. Ernst, R. : The use of activated charcoal in asymbiotic seedling culture of *Paphiopedilum*. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, 43, 35(1974).
 7. Fridborg, G. and Eriksson, T. : Effects of activated charcoal on growth and morphogenesis in cell culture. *Physiol. Plant.*, 34, 306(1975).
 8. Hendel, C. E., Bailey, G. F. and Taylor, D. H. : Measurement of nonenzymatic browning of dehydrated vegetables during storage. *Food Technol.*, 4, 344 (1950).
 9. Hu, C.Y. and Wang, P.J. : Meristem, shoot tips and bud culture, In *Hand book of plant cell culture*. (eds. S. Evans and A. Yamada), pp. 177-227. Macmillan Pub. Co. New York (1983).
 10. Ichihashi, S. and Kako, S. : Studies on clonal propagation of *Cattleya* through tissue culture method. II. Browning of *Cattleya*. *J. Japanese Soc. Hort. Sci.*, 46, 325(1977)
 11. Ishii, M. : Studies on the tissue culture *Cattleya* species III. The relationship between seasonal changes of phenolics exudated from pseudobulb tissue and survival rates of explants. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 49, 127(1980).
 12. So, I. S, and Lee, J. S. : Asymbiotic germination and mass propagation of *Cymbidium virescens* using tissue culture technique. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.*, 26, 375(1985).
 13. So, I. S. and Park, C. B. : On the rhizome culture in vitro of *Cymbidium virescens* native to Korea. *Subtrop. Agr. Cheju Nat'l Univ.*, 6, 31(1989).
 14. Swain, T. and Hillis, W. E. : The phenolic constituents of *Prunus domestica*. 1. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.*, 10, 63 (1959).