

팔레놉시스의 PLB 증식에 미치는 배지와 배양온도 및 광도의 영향

김미선* · 은종선¹ · 김재영

원에연구소, ¹전북대학교 생물자원과학부 생물산업연구소

Effect of Culture Medium, Temperature, and Light Intensity on PLB Propagation of *Phalaenopsis*

KIM, Mi Seon* · EUN, Jong-Seon¹ · KIM, Jae-Young

National Horticultural Research Institute, RDA, Suwon, 440-310, Korea

¹Faculty of Biological Resources Science, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea

ABSTRACT This study was conducted to investigate the effect of culture media and environment on PLB proliferation by using PLBs produced from leaf segments excised from shoot of *Phalaenopsis* flower stalk. The fresh weight of PLBs propagated was higher in MS medium than in NDM (New Dogashima medium) or VW, but the condition of PLB was better in NDM medium. Natural additives of Coconut water, potato and apple were absolutely required for the PLB propagation. PLB propagation was better in solid medium than in liquid medium including cotton as support. Optimal sucrose concentration for proliferation was 10 g/L. PLB proliferation was very effective condition $14.3 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ in PPFD and 25°C.

Key words: Cotton medium, flower stalk, natural additives, sucrose concentration

서 론

팔레놉시스의 실생묘는 생산비용이 저렴하고 발아에서 육묘까지의 배양작업이 쉬운 장점이 있어 재배에 많이 이용되고 있으나 잠종상태가 강한 계통의 후대들은 유전자 분리로 인하여 생육과 개화가 균일하지 않기 때문에 영리재배가 어려워 (Arditti and Ernst 1993; Tokuhara and Mii 1993) 대만과 태국으로부터 연간 약 1,000만 본으로 추정되는 묘를 수입하고 있는 실정이다. 반면, 영양계 묘는 생육상태가 고르기 때문에 재배관리가 편리하고 개화시기도 일정하여 영리재배가 가능한 장점이 있어 농가에서 영양계 묘재배를 선호하고 있다. 그러나 팔레놉시스 묘의 대량생산 능력은 영양계의 증식방법과 품종이나 계통의 특성 및 유전자형에 따라 차이가 커서 (Chen et al. 1998) 실용화가 쉽지 않은 실정이다. 한편 팔레놉시스 영양계묘 생산에 대한 본격적인 연구는 1992년

Ichihashi에 의해 이루어졌고 배양부위에 따른 효율적인 PLB 유도에 관한 연구보고가 많다 (Tokuhara and Mii 1993; Ichihashi 1992). 한편, 팔레놉시스 영양계 묘 대량생산에서 PLB 증식은 대량생산과 직접 관련되고 또한 증식된 PLB의 상태는 영리성을 좌우하는 중요한 과정이므로 이 배양과정에 대한 배양환경, 배지, 그리고 배지 등에 대한 연구가 필요하다. 따라서 흰색과 분홍색 계통의 화경조직을 배양하여 얻은 PLB를 이용하여 배지와 배양환경에 따른 PLB의 증식효과를 조사하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용된 팔레놉시스의 PLB는 액아를 포함한 화경마디를 배양하여 얻은 신초의 잎을 배양하여 유도한 것이다. 화경은 12월부터 2월 사이에 개화한 것을 이용하였으며 시판용 락스 20%액으로 20분 동안 살균한 다음 화경배양용 배지 (Kim et al. 1999)에 배양하여 신초를 얻었다. 이 신초의

있을 원괴체 유도용 V4 또는 H2배지 (Kim et al. 1999)에 배양하여 PLB를 유도하였다.

배지 및 천연첨가물에 따른 PLB 증식률을 조사하기 위해 기본배지는 MS (Murashige and Skoog 1962), NDM (Tokuhara and Mii 1993), MVCW (Vacin and Went 1949) 등 3종류를 사용하였고 각 기본배지에 coconut water (CW) 10%를 넣었다. 천연산물의 첨가가 PLB 증식에 미치는 영향을 조사하고자 MS기본배지 (MS), 사과와 감자즙을 각각 10 g · L⁻¹씩 첨가한 배지 (MSAP), 코코넛액 10%를 첨가한 배지 (MSCW) 등 3종류의 배지를 이용하여 백색과 분홍색 계통의 PLB를 배양하였다. 이 계통들은 형은 약간 벌어진 컵형 (semi cup)이며 흰색꽃잎에 노랑설판이 있는 계통과 꽃잎과 설판이 모두 분홍색인 중소형이었다. PLB 배양은 처리별 0.5 g씩 7반복으로 하여 온도 25 ± 1°C, PPF 14.3 μmol · s⁻¹ · m⁻²에서 16/8시간 명암주기의 성장상에서 실시하였으며 각 처리별 증식된 PLB량은 배양 2개월 후 생체중을 측정하여 비교하였다. 증식한 PLB의 형태는 육안으로 정상 (A형태), 정상과 비정상 (B형태), vitrification 조직으로 변한 비정상 (C형태)으로 구분하였으며 각 형태별 PLB의 절단면 조직과 각 형태의 PLB로부터 재분화된 유식물체의 기공은 주사형 전자현미경 (Hitachi, S-570)을 이용하여 조사하였다.

배지의 sucrose 농도와 지지물에 따른 PLB 증식률을 조사하기 위해 sucrose 농도는 0, 10, 20, 30, 40 g/L로 처리하였고, 배지의 지지물 gelrite (Sigma, G-190) 0.3%를 첨가한 고체배지와 탈지면 (두께 : 약 0.3 mm)이 충분히 젖을 정도로 액체배지를 분주하여 조제한 액체탈지면 배지로 구분하여 처리하였다. 배양은 CW 10%를 넣고 조제한 NDM배지가 들어 있는 100 mL 삼각플라스크에 PLB를 0.5 g씩 7반복으로 넣고 배양 2개월 후 PLB의 증식률을 조사하였다.

광 및 온도가 PLB 증식에 미치는 영향을 조사하기 위해 광도를 PPF 6.7, 14.3, 22.0, 33.4 μmol · s⁻¹ · m⁻²로, 온도는 22, 25, 28, 31°C로 각각 조절되는 성장상에서 실험을 실시하였다. 광도실험에서는 온도를 25 ± 1°C로, 온도실험에서는 PPF를 6.7 μmol · s⁻¹ · m⁻²로 고정하여 실시하였다. 처리에 사용된 배지는 10%의 CW가 첨가된 NDM배지이며 PLB를 0.5 g씩 7반복으로 하였고, 배양 2개월 후 증식률은 생체중을 측정하여 조사하였다.

결과 및 고찰

배지 및 천연첨가물과 PLB 증식

MS, NDM, VW 등 3종류의 배지에 따른 PLB 증식량은 MS와 NDM배지에서 다소 높았다 (Figure 1). 특히, NDM 배지에 배양된 PLB는 다른 배지의 PLB 보다 갈변이 적고 증식한 PLB 또한 유의성은 없으나 정상적 형태가 많았다. 그

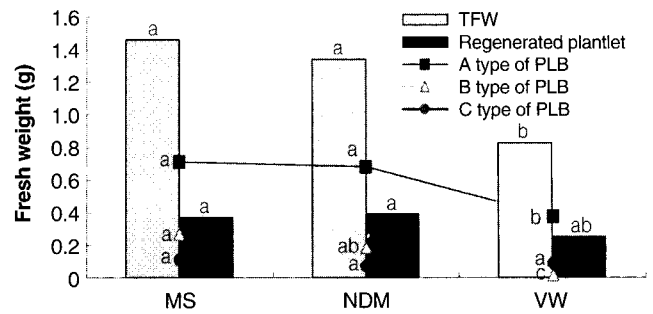


Figure 1. Effect of medium on fresh weight and PLB formation after 50 days of culture. All media were containing 10% of coconut water. TFW : Total fresh weight (Fresh weight of plantlet + Fresh weight of PLB). A: normal (green color and corm), B: normal + abnormal (green color and vitrification), C: vitrification. Alphabets show mean separation within bar by DMRT at 5% level.

런데 MS배지에서는 전체 생체중이 높았으나 B나 C형태의 PLB (비정상)도 많이 증식되었고, VW배지에서는 PLB가 재분화되어 증식량이 적었다. 한편 증식한 PLB 가운데 A형태의 정상적인 PLB는 외관상으로 보면 구형이면서 투명화 현상이 없고 녹색을 띄었으며 (Figure 6-1A) PLB의 절단면 조직이 치밀하고 균일하였다 (Figure 6-1B). 또한 이 형태의 PLB로부터 재분화된 유식물체의 기공은 뚜렷하고 기공의 수도 3~5개 더 많았다 (Figure 6-1C). 반면, B형태의 PLB는 투명화 현상이 일어날 가능성이 있는 것으로 보였으며 (Figure 6-2A) A형태 PLB의 절단면 조직보다는 치밀함이 적었고 균일성도 다소 낮았다 (Figure 6-2B). 그리고 재분화된 유식물체의 기공이 A형태의 기공 수보다 적고 뚜렷하지 않았다 (Figure 6-2C). 한편 C형태의 PLB는 투명화되어 (Figure 6-3A) 절단면의 조직이 엉성하고 모양도 일정하지 않았으며 (Figure 6-3B) 기공의 형태 또한 뚜렷하지 않고 개폐 작용도 어려운 모습이었다 (Figure 6-3C). C형태의 PLB는 높은 증식력을 보유하고 있으나 재분화율이 매우 저조하고 재분화되어도 기내생장 기간이 길고 성장 후 순화 도중 고사되었는데 그 이유는 정상적인 호흡작용을 할 수 없었기 때문으로 추측되었다. 한편, PLB 증식용 적정 배지는 연구자에 따라 차이가 있어 Park 등 (1996)은 VW배지가 효과적이었던 반면 MS배지는 억제적이라고 하여 본 실험의 결과와 달랐으며 Tokuhara와 Mii (1993)는 NDM배지가 팔레놉시스와 도리테놉시스를 대량생산하는 데 효과적이라고 하였는데 본 실험에서도 증식용 배지로 NDM배지가 효과적이었다. 이와 같이 연구자에 따라 PLB 증식에 차이가 있는 것은 배양 부위에 따라 적정배지가 다르고 PLB 유도시 사용한 배지는 증식시에도 영향을 미치기 때문으로 생각되었다.

배지의 견고도와 PLB 증식

천연산물의 첨가 및 배지의 형태가 PLB 증식에 미치는 영향을 조사하고자 MS, MSAP, MSCW 등 3종의 고체 및 액

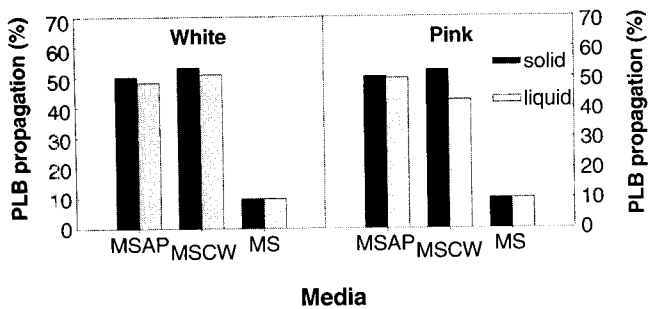


Figure 2. PLB proliferation affected by natural organic compound and media solidity on PLB propagation rate of white and pink type in *Phalaenopsis*. MSAP: Modified MS basal medium + apple 10 g/L + potato 10 g/L. MSCW: Modified MS basal medium + coconut water 10%. This percentage was obtained from increased PLB/30 cultured PLB.

체 탈지면 배지를 이용하여 백색과 분홍색 계통의 PLB를 배양한 후 증식률과 증식수를 조사한 결과는 Figure 2와 같다. 사과와 감자즙을 첨가한 배지 (MSAP)의 PLB 증식률은 흰색과 분홍색 계통 모두 코코넛액을 첨가한 배지 (MSCW)보다 약간 낮았지만 큰 차이는 없었다. 반면, 대조구의 배지 (MS)에서는 PLB의 증식이 매우 저조하였다. 따라서 천연첨가물인 CW 또는 사과와 감자의 사용은 PLB 증식효율을 향상시키는 데 필수적이었다. 따라서 고가이고 전량 수입에 의존하는 CW를 첨가하기 보다는 감자 또는 사과즙액의 첨가로 PLB 증식량에 큰 차이가 없으므로 대체사용이 가능할 것으로 생각되었다.

팔레닐시스 대량생산을 위해 PLB 증식시 CW 첨가는 본 실험 결과를 비롯한 많은 연구 보고에서 매우 효과적이라고 하였다 (Intuwong and Sagawa 1974; Tanaka and Sakanishi 1977; Zimmer and Pieper 1978; Hass-Von Schmude 1984; Homma and Asahira 1985; Lin 1986; Griesbach 1983). CW의 역할에 대해서는 정확하게 밝혀지지는 않았고, 다만 CW 내에 포함되어 있는 내생 cytokinin과 영양물질의 부가적인 효과에 의해 PLB 형성이 촉진된다고 하였다 (Homma and Asahira 1985). 그러나 Ichihashi (1992)는 팔레닐시스의 화경 액배양에서 유도한 PLB 증식시 CW 첨가는 PLB의 생장을 억제한다고 하였는데 이것은 기본배지 또는 재배종에 따라 차이가 있기 때문으로 생각되었다.

배지의 종류와 PLB 증식률과의 관계는 천연산물이 첨가된 배지 (MSCW)의 경우 흰색계통의 경우 고체나 액체탈지면 배지에 관계없이 PLB 증식이 용이하였다. 그런데 분홍색 계통에서는 고체배지가 증식률 52.2%, 증식된 PLB 수 5.1개로 액체탈지면 배지의 42.3%, 4.8개보다 약간 높았다 (Figure 7). Park 등 (1996)은 팔레닐시스의 효율적인 PLB의 증식은 액체 탈지면배지이며 고체배양이나 다른 배양기의 이용에서는 PLB의 형태나 증식률이 낮다고 하였는데 본 실험에서 흰색계통에서는 고체나 탈지면 배양 간에 증식량의 큰 차이가 없었고 분홍색 계통에서는 오히려 고체배지에서 증식한 양이

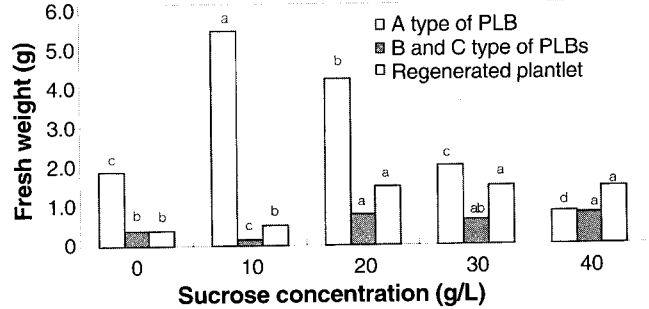


Figure 3. Effect of sucrose concentration on PLB propagation in white genotype of *Phalaenopsis*. This data were obtained after culturing 40 days of culture in NDM medium. Initial fresh weight was 0.5 g. Alphabets show mean separation within investigated items by DMRT at 5% level.

많아 다른 경향이였다. 이상의 결과로부터 두 계통 모두 PLB 증식시 CW 또는 사과와 감자 등 천연산물의 첨가가 필수적 이었고 고체배지의 사용이 유리하였다.

Sucrose 농도와 PLB 증식

농도에 따른 PLB 증식량을 조사하기 위해 배양 40일 후 증식한 PLB의 생체중을 측정하였다 (Figure 3). 10 g/L의 농도에서 정상적인 PLB의 생체중이 높았으며 비정상적인 PLB의 증식과 유식물체 분화도 적어 가장 양호하였다. 그런데 sucrose 농도가 높아짐에 따라 PLB의 증식이 둔화되면서 증식된 PLB의 일부가 바로 식물체로 재분화되는 경향을 보였다. 따라서 PLB 증식에는 10 g/L의 sucrose 농도가 가장 적절하였다 (Figure 8). 팔레닐시스 PLB 증식에는 sucrose 농도가 조절되어야 한다. 고농도의 sucrose는 배지의 삼투압을 높여서 생육을 억제하기 때문에 과즙 등을 첨가할 경우에는 배지의 삼투압이 높아지지 않도록 sucrose 농도를 감소시켜야 하며 (Ichihashi 1993), 팔레닐시스와 도리테닐시스의 callus 증식시 sucrose 농도가 높은 배지에 배양된 callus색은 노란색 또는 백화녹색을 띄었지만 저농도에서는 체세포배로 분화하거나 녹색으로 변화되므로 callus 증식에는 저농도가 우수하다고 하였다 (Ichihashi and Hiraiwa 1996). 본 실험에서도 30 g/L 이상의 농도에서는 PLB의 증식이 억제되고 식물체로 분화되거나 PLB의 생장이 억제되어 비슷한 경향이었고 sucrose 농도에 따라 PLB의 증식량이나 PLB 형태가 달라질 수 있음을 시사하고 있다.

광 및 온도처리와 PLB 증식

PLB를 MVCW 배지에 배양하여 광도를 달리한 성장상에서 60일 동안 배양된 PLB량은 광도 14.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ 에서 높은 생체중을 보였다 (Figure 4). 광도가 6.7 $\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ 로 낮거나 22.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ 로 높을 경우, 증식한 PLB의

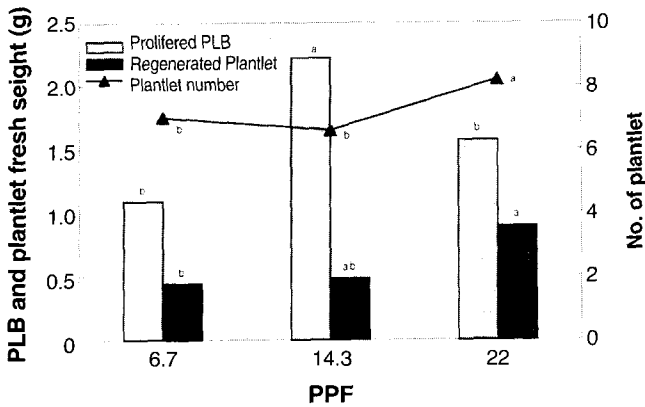


Figure 4. PLB proliferation and plantlet regeneration of *Phalaenopsis* affected by light intensities in MSP medium at 25°C after 60 days in culture. Alphabets show mean separation within investigated items by DMRT at 5% level.

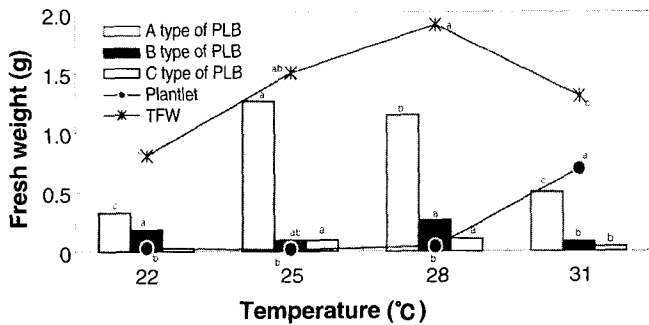


Figure 5. Effect of cultural temperature on total fresh weight and types of PLB after 50 days of culture. TFW: Total fresh weight. Plantlet : regenerated plantlet from PLB. A type of PLB: normal (green color, corn), B type of PLB: green color and vitrification, C type of PLB: vitrification. Alphabets show mean separation within investigated items by DMRT at 5% level.

생체중이 낮았다. 이는 적정 광도 이상 또는 이하에서 PLB는 증식하지 않거나 유식물체로 재분화되었기 때문인데 높은 광도는 PLB의 신초 분화를 촉진하는 것으로 생각되었다. 이 결과로 부터 팔레놉시스의 PLB 증식에는 보통 배양실의 광도 (약 22 μmol · s⁻¹ · m⁻²)보다 약간 낮은 광도가 요구되었으며 광도에 따라 PLB의 성장형태가 크게 달라지는 것을 알 수 있었다. 따라서 PLB 증식효율을 향상시키기 위해서는 광도의 조절이 필수적이었다.

배양온도별 PLB 증식효과를 조사한 결과 전체 생장은 배양온도가 28°C로 높아짐에 따라 증가하지만 이보다 높거나 낮은 온도에서는 PLB의 생장이 감소하였다 (Figure 5). 증식한 PLB를 형태별로 나누어 생체중을 측정된 결과 25°C 배양에서 정상 PLB (A 형태)가 많이 증식되어 가장 양호하였다. 반면, 22°C와 31°C에서는 정상 PLB가 적어지고 녹색이며 투명한 비정상 PLB (B나 C 형태)로 증식하거나 PLB가 빨리 식물체로 재분화 되는 양이 많아져 PLB 증식량이 줄었다. 이들 결과로 부터 PLB 증식에는 25°C가 적절하였으며 PLB 증식시 온도는 PLB의 증식형태를 변화시킬 수 있는 중요한 요

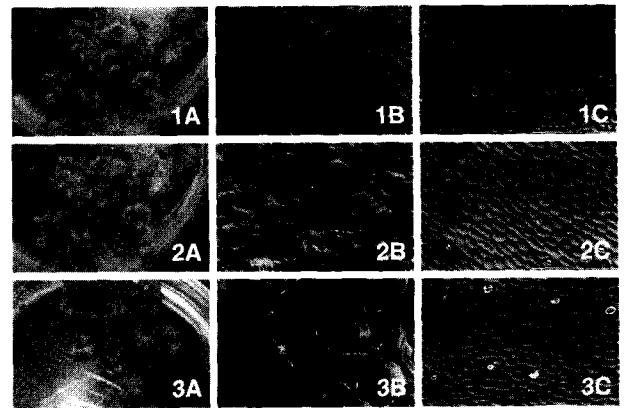


Figure 6. Morphological observation of PLBs of *Phalaenopsis* Normal (1A, 1B, 1C), Normal+abnormal (2A, 2B, 2C), and Abnormal type (3A, 3B, 3C).

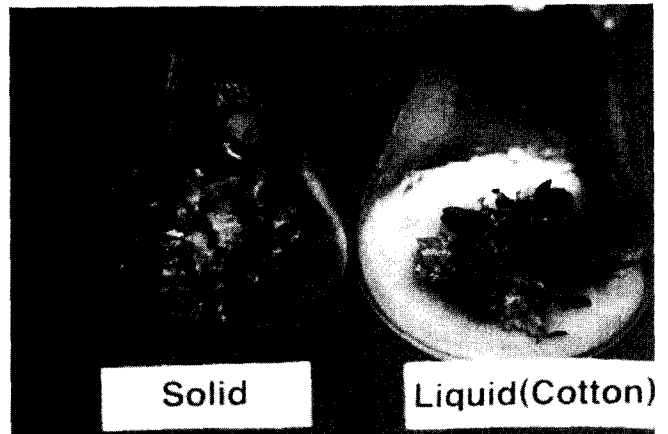


Figure 7. Comparison of induced PLB from leaf segments of *Phalaenopsis* hybrid according to medium type (solid and liquid) after 50 days of culture.

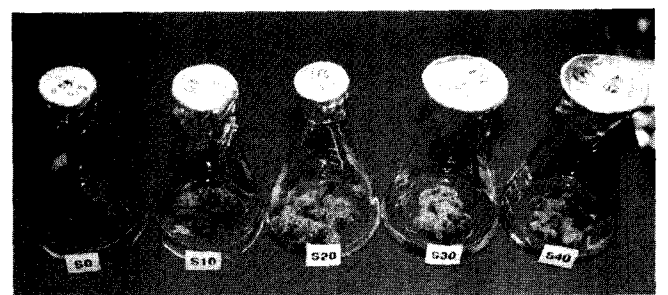


Figure 8. Comparison of PLB propagation among sucrose concentrations of white type in *Phalaenopsis*.

인임을 알 수 있었다.

적 요

팔레놉시스 대량생산시 PLB 증식에 미치는 배지와 배양환경에 대해 조사하였다. PLB 증식량은 MS배지에서 높았지만, 증식된 PLB상태는 NDM배지가 더욱 양호하였다. 천연첨가

물인 CW 10% 또는 사과와 감자의 사용은 PLB 증식효율을 향상시키는 데 필수적이었다. 배지내 지지물에 따른 PLB 증식률은 gelrite가 첨가된 고체배지가 흰색과 분홍색계통 모두 액체탈지면 배지보다 증식이 양호하였다. PLB 증식시 적정 sucrose 농도는 10g/L이며 농도가 높아질수록 PLB가 유식물체로 재분화되었고 저농도 일수록 증식과 유식물체의 재분화가 모두 억제되었다. PLB 증식을 위한 적정 PPF와 온도는 각각 $14.3 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, 25°C 이었다.

주요어 : 탈지면배지, 화경, 천연첨가물, 당농도

인용문헌

- Arditti J, Ernst R** (1993) Micropropagation of Orchids. p. 200, 434, 591, 545, 373-375, 467-520. John Wiley & Sons, Inc. New York
- Chen WH, Chen TM, Fu YM, Hsi RM, Chen WS** (1998). Studies on somaclonal variation in Phalaenopsis. Plant Cell Reports **18**:7-13
- Griesbach RJ** (1983) The use of indoleacetyl amino acids in the in vitro propagation of Phalaenopsis orchids. Scientia Horticulturae **19**:363-366
- Hass-Von Schmude NF** (1984) Tissue culturing Phalaenopsis using leaves and leaf segments. In : Tan, K. W. (ed.) Proc. 11th World Orchid Conference. p. 311. Miami, Florida
- Homma Y, Asahira T** (1985) New means of Phalaenopsis propagation with internodal sections of flower stalk. J. Japan. Soc. Hort. Sci. **54**:379-387
- Ichihashi S** (1992) Micropropagation of Phalaenopsis through the culture of lateral buds from young flower stalks. Lindleyana **7**(4):208-215
- Ichihashi S** (1993) Phalaenopsis(Breeding and culture) III. Production of plantlet. p. 60-95. Sungmundang Syngwangsa. Tokyo
- Ichihashi S, Hiraiwa H** (1996) Effect of solidifier, coconut water and carbohydrate source on growth of embryogenic callus in Phalaenopsis and allied genera. Hirosawa Univ. **10**:81-88
- Intuwong O, Sagawa Y** (1974) Clonal propagation of Phalaenopsis by shoot tip culture. Amer. Orchid Soc. Bull. **43**:893-895
- Kim MS, Won JY, Lee YR, Kim JY** (1999) Increased of PLB induction efficiency by improvements of in vitro culture condition in Phalaenopsis. Kor. J. Sci. & Tech. **17**(2):268
- Lin CC** (1986) In vitro culture of flower stalk internodes of Phalaenopsis and Doritaenopsis. Lindleyana **1**(3):158-163
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant **15**:473-497
- Park YS, Kakuta S, Kano A, Okabe M** (1996) Efficient propagation of protocorm like bodies of Phalaenopsis in liquid medium. Plant Cell, Tissue & Org. Cult. **45**(1):79-85
- Tanaka M, Sakanishi Y** (1977) Clonal propagation of Phalaenopsis by leaf tissue culture. Amer. Orchid Soc. Bull. **46**(8):733-737
- Tokuhara K, Mii M** (1993) Micropropagation of Phalaenopsis and Doritaenopsis by culturing shoot tips of flower stalk buds. Plant Cell Reports **13**(1):7-11
- Vacin EF, Went FW** (1949) Some pH changes in nutrient solutions. Bot. Gaz. **110**:605-613
- Zimmer K, Pieper W** (1978) Clonal propagation of Phalaenopsis by excised buds. Orchid Rev. **87**:223-227

(접수일자 2001년 6월 10일)