

## *Doritaenopsis* 뿌리배양으로부터 고빈도의 Protocorm-like Body (PLB) 형성

박소영, 오성래<sup>1</sup>, 백기엽<sup>2\*</sup>

임업연구원 생물공학과, <sup>1</sup>충남대학교 원예학과, <sup>2</sup>충북대학교 첨단원예기술개발연구센터

### High Frequency Protocorm-like Body (PLB) Formation through Root Cultures of *Doritaenopsis* Hybrids (Orchidaceae)

So-Young Park, Sung-Rae Oh<sup>1</sup>, Kee-Yoep Paek<sup>2\*</sup>

Plant Biotechnology Division, Forest Research Institute, Suwon 441-350, Korea

<sup>1</sup>Horticulture Department, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

<sup>2</sup>Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

**ABSTRACT** Root cluster section cultures, showing high efficient Protocorm-like body (PLB) formation capacity, were established in *Doritaenopsis* hybrids. Three types of root tissue were obtained from excised shoots on 1/2 MS medium containing different concentrations of NAA: ① normal roots, ② multiple roots and ③ abnormal root clusters. Those were placed on 1/2 MS medium supplemented with 0.5 mg/L thidiazuron for PLB regeneration. PLB regeneration rate was greater in root cluster section cultures (77.8%) compare to normal root tip cultures (30%). Number of PLBs regenerated from root cluster sections were counted over 11 per explant (5.3 per normal root tip). High frequency of PLB regeneration was achieved in root cluster section cultures. This result can be used as an efficient method for clonal proliferation of *Doritaenopsis* hybrids.

**Key words:** Clonal proliferation, NAA, root cluster culture, thidiazuron

## 서 론

*Doritaenopsis*는 대만이나 열대아시아에 자생하는 단경성 착생란인 *Phalaenopsis*와 *Doritis*의 교배종으로 국내에서는 *Phalaenopsis*와 함께 통칭하여 호접란이라 불려지며 *Cymbidium*, *Denphalae*, *Oncidium*과 함께 국내에서 많이 재배되는 난과식물이다. *Doritaenopsis*와 *Phalaenopsis*의 실생묘는 형질간 유전적 변이가 심하여 재배과정중 개체간 묘 생육 차이가 크며 환경, 화색이 일정하지 않아 고품질 묘의 생산이 어렵다 (Arditti and Ernst 1993). 이러한 이유로 영양계 번식에 관한 연구는 Rotor (1949)에 의해 처음으로 시도된 이래 여러 조직

으로부터 protocorm-like body (PLB)를 유도하고자 하는 연구가 지속적으로 이루어져 왔으나 모본의 유전적 형질에 따라 PLB 재분화율은 0~100%까지 다양하여 (Tanaka 1992) 품종에 따른 결과의 재현성에 의문이 제기되면서, 최근 들어 좀더 효율적이고 재현성 높은 PLB 재분화 방법과 PLB의 대량 증식법이 여러 연구자들에 의해 모색되고 있다 (Chen et al. 2000; Park et al. 2002; Park et al. 2003). 그러나 대부분의 실험은 잎 절편이나 정단조직을 이용하여 PLB 형성과 식물체 재분화를 시도하였고 근단조직을 이용한 실험결과는 많지 않다. White (1934)에 의해 토마토의 근단배양이 처음 시도된 이래 경정부위와 함께 뿌리는 정단분열조직을 가지고 있어 재생율이 높을 것으로 생각되어 왔으나 실제 적용한 예는 많지 않고 (Jeong et al. 2002) 특히 난과식물의 조직배양에 이용한 예는 많지 않다 (Kerbaudy 1984). *Doritaenopsis*는 자연상태에서도

\*Corresponding author Tel 043-266-3245 Fax

E-mail

중종 뿌리에서 식물체가 분화되는 것이 발견되곤 하였는데 (Arditti and Ernst 1993), 이로 인해 뿌리는 PLB 재분화가 어려운 잎 절편보다 PLB를 유도하기 위한 좋은 재료로 여겨져 근단배양이 시도된 바 있으나 (Tanaka et al. 1976) 뿌리에 있는 분열조직은 지상부의 정단분열조직과는 달리 형태형성이 극히 제한적인 세포로 구성되어 있어 식물체나 체세포 배의 재분화가 어렵고 (Vaz et al. 1998), 지금까지 보고된 연구결과 역시 *Phalaenopsis*와 *Doritaenopsis* 근단 조직에서 PLB 재분화율이 매우 낮았다 (Kim 1974; Tanaka et al. 1976). 또한 기내 배양중인 식물체는 뿌리 수가 적어 PLB 유도를 위한 적합한 재료로 고려되지 않았었다. 그러나 최근 근단조직으로부터 효율적인 PLB 재분화에 대한 가능성을 보고한 바 있다 (Park et al. 2003). 따라서 본 연구에서는 기내배양중인 *Doritaenopsis* 식물체에서 3가지 형태의 뿌리를 유도하여 뿌리 종류별 PLB 재생 능력을 구명하여 실제 영양체묘의 번식에 이용할 수 있는 가능성을 조사하기 위하여 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

본 실험에는 화경배양을 통해 유도된 *Doritaenopsis* 'New candy' × *Dtps.* ('Mary Anes' × 'Ever spring')의 영양체 묘를 2종의 Hyponex (N:P:K=6.5:4.5:19 g/L과 20:20:20 g/L)분말이 혼합된 개량된 Hyponex (Kano 1965)배지에 peptone 2.0 g/L, activate charcoal (Duchefa, The Netherlands) 0.5 g/L, sucrose 3% (w/v)와 Plant agar 8.0 g/L (Duchefa, The Netherlands)이 첨가된 배지에서 2개월 정도 배양하여 잎이 2~3매 정도 발달된 유묘를 뿌리 유도용 재료로 이용하였다.

### 3종류의 뿌리 유도

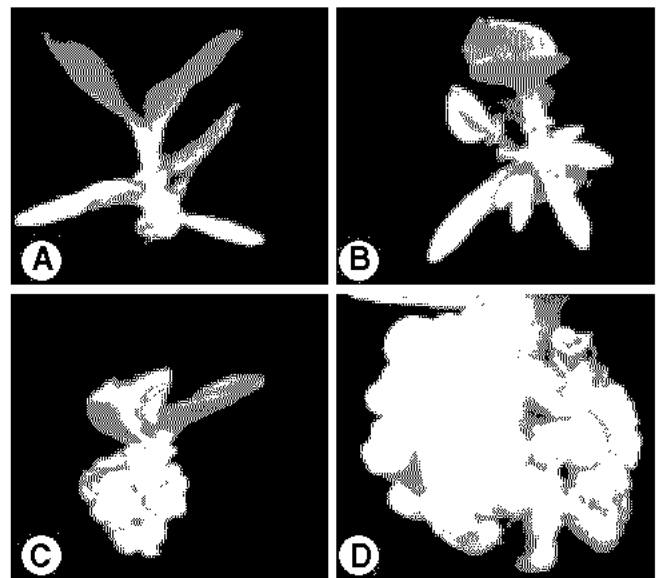
뿌리가 제거된 유식물체를 1/2 MS (Murashige and Skoog 1962)배지에  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA)가 0, 1.0, 5.0 mg/L 농도별로 첨가되고 3% sucrose, 5% (v/v) 코코넛액과 0.2% (w/v) gelrite (Duchefa, The Netherlands)로 고형화시킨 배지에서 8주간 배양하여 여러 형태의 뿌리조직을 얻었다. 코코넛액의 첨가는 베트남에서 수입된 코코넛 열매에서 액을 채취하여 Watman No.11 여과지로 여과한 다음, -70°C에서 보관하였다가 사용시 녹여 배지에 첨가하였다. 배지는 400 mL 부피의 유리배양병에 80 mL씩 분주한 다음 배양병당 5개의 유식물체를 접종하였고 처리당 5반복하였다. 배양 8주 후 3종의 배지에서 얻은 3가지 형태의 뿌리는 PLB 형성을 위한 다음 실험의 재료로 이용되었다.

### 뿌리조직별 PLB 형성

PLB 형성을 위해 NAA가 첨가되지 않은 배지에서 형성된 정상 뿌리의 근단 (2~3 mm), NAA 1.0 mg/L 첨가구에서 증식된 부정근의 근단 (2~3 mm), 그리고 NAA 5.0 mg/L 첨가구에서 형성된 뿌리 덩어리 절편 (0.5×0.5 cm)을 코코넛액 20% (v/v), 1-phenyl-3 (1,2,3-thiadiazol-5-yl)urea (thidazuron; TDZ) 0.5 mg/L, 10 mg/L의 adenine sulfate와 0.2% gelrite가 첨가된 1/2 MS 배지에 절단면이 배지에 접하도록 하여 총 8주간 배양하였고 배양개시 4주 후 각각의 절편체는 신선한 동종의 배지로 옮겨 주었다. 배지는 HCl로 pH를 5.7~5.8로 조절하였으며 121°C, 1.2 기압하에서 20분간 고압멸균한 후 직경 8.7 cm의 1회용 플라스틱 petri-dish에 25 mL씩 분주하였다. 절편체는 petri-dish 당 20개씩 접종하여 4반복으로 배양하였고, 재현성을 위해 실험은 2차례 반복되었다. 모든 배양은 형광등으로 광양자속밀도가 25~30  $\mu\text{mole m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 온도가 24±1°C로 유지되는 배양실에서 16시간 일장으로 실시되었고, 배양 8주 후 PLB 형성률, 절편체당 PLB 수 등을 조사하였다. 결과는 통계 분석용 프로그램 (SAS Institute, Cary, N. C.)을 이용하여 분석되었고 평균은 Duncan의 다중검정으로 유의성을 비교하였다.

## 결과 및 고찰

*Doritaenopsis* 유식물체를 NAA가 첨가된 배지에 8주간 배양하여 3가지 형태의 뿌리조직을 얻었다 (Figure 1). NAA가 첨가되지 않은 배지에서는 2~3개의 뿌리가 형성된데 비



**Figure 1.** Three types of root formation derived from different levels of NAA in 1/2 MS medium after 8 weeks in culture. A, Normal roots in 1/2 MS medium; B, Multiple roots formation in 1/2 MS medium containing 1.0 mg/L NAA; C and D, Abnormal root cluster formation in 1/2 MS medium containing 5.0 mg/L NAA.

해 (Figure 1A) NAA 1.0 mg/L가 첨가된 배지에서는 다수의 뿌리를 얻을 수 있었고 (Figure 1B), NAA 농도가 높아질수록 뿌리가 점점 짧아져서 NAA 5.0 mg/L가 첨가된 배지에서 배양된 식물체는 기부에 짧은 뿌리가 덩어리 형태로 자란 것을 볼 수 있었다 (Figure 1C, 1D).

이렇게 형성된 3가지 형태의 뿌리로부터 PLB 유도를 위해 20% 코코넛액, 0.5 mg/L TDZ과 10 mg/L adenine sulfate가 첨가된 1/2MS 배지에서 8주간 배양하여 배양 절편체의 종류에 따른 PLB 형성률 등을 조사하였다. 절편체 생존율은 뿌리 덩어리 절편체 95.8%가 생존하여 일반 근단 배양의 생존율 53.3%보다 높았다 (Table 1). *Doritaenopsis*와 같은 착생란의 뿌리는 해부학적 특성이 여러 층의 죽은 세포 (velamen층)로 둘러 싸여 있고, 지상부의 정단분열 조직의 염원기와 같이 생존을 도와줄 만한 다른 조직이 없어 근단배양시 생존율이 낮고 재분화에도 지상부의 정단배양과 달리 오랜 시간이 소요된다 (Park et al. 2003). 이러한 이유로 뿌리에서 근단만을 절취하여 배양한 처리구는 생존율이 낮았으나 근단 (2~3 mm) 보다 크기가 큰 뿌리 덩어리 절편은 생존이 더 유리했던 것으로 생각된다.

고농도의 NAA (5.0 mg/L)가 첨가된 배지에서 형성된 뿌리 덩어리의 표면을 절단한 절편체의 77.8%에서 PLB가 형성됨으로써 PLB 형성률이 가장 높았고, NAA가 첨가되지 않은 배지에서 자란 식물체의 근단에서 30%, NAA 1.0 mg/L이 첨가된 배지에서 형성된 부정근 근단에서 22.5%로 가장 저조하였다 (Table 1, Figure 2). 또한 절편체당 형성된 PLB 수에 있어서

**Table 1.** Protocorm-like body (PLB), callus-like body (CLB) and adventitious shoot formation from three types of explants of *Doritaenopsis* hybrids cultured on PLB regeneration medium<sup>a</sup> after 8 weeks in culture.

Explant type	Survival		Formation (%)		
	rate (%)	PLB	CLB	Shoot	
Normal root tip	53.3 b	30.0 b	45.0 b	5.0 b	
Multiplicated root tip	63.8 b	22.5 b	45.0 b	0.0 b	
Root cluster section	95.8 a	77.8 a	93.1 a	20.8 a	

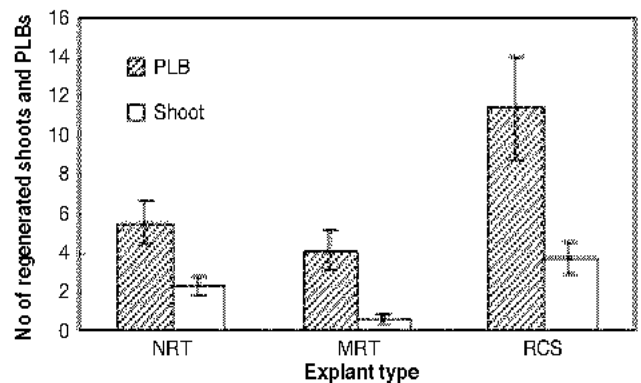
<sup>a</sup>1/2 MS medium containing 0.5 mg/L TDZ, 10 mg/L adenine sulfate and 20% coconut water.

<sup>b</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

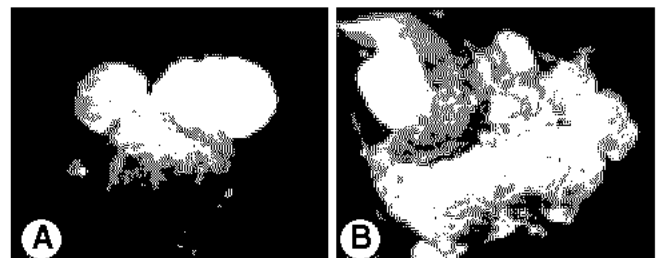


**Figure 2.** Protocorm-like body (PLB) formation from different root tissues of *Doritaenopsis* hybrids after 8 weeks of culture. A, PLBs formation from root tip of normal root; B, PLBs formation from root tip of multiple adventitious root; C, PLBs formation from root cluster section.

도 뿌리 덩어리 절편체 배양시 절편체당 평균 11개로 가장 높았다 (Figure 3, 4). 뿌리 덩어리 절편체에서 PLB 형성률이 높고, 일반 근단에 비해 재분화된 PLB 수가 많은 이유는 고농도의 NAA에 의해 신장하지 못한 뿌리의 정단부가 한 절편체 내에 다수 포함되어 있어 1개의 근단만을 배양한 다른 처리구에 비해 절편체 내에 분열능이 높은 세포가 비교적 많이 포함되어 있기 때문인 것으로 생각된다. 이와 유사한 결과가 *Solanum lycopersicosides*에서 보고되었는데, Tylicki 등 (2000)은 고농도의 auxin이 첨가된 배지에서 뿌리 원기 덩어리 (root primordia cluster)를 형성하고, 뿌리덩어리에서 각각의 뿌리 원기를 분리하고 뿌리원기로부터 직접 식물체를 형성함으로써 다수의 식물체를 얻을 수 있었다고 하였다. NAA 첨가구 (1.0 mg/L)에서 형성된 다수의 부정근 근단은 성장조절제가 첨가되지 않은 배지에서 형성된 뿌리의 근단보다 PLB 형성률도 낮고, 절편체당 PLB 수도 적었는데 이는 부정근 유도시 첨가된 NAA에 의해 뿌리내 내생 auxin의 함량이 높아지면서 내생 cytokinin과의 농도구배가 달라지는 것에 기인하는 것으로 생각된다. 내생 cytokinin 함량이 PLB 형성에 미치는 영향에 대하여는 Kerbauy (1993)에 의해서도 고찰된 바 있는데 그는 *Oncidium* 근단 배양시 sucrose와 agar의 농도가 근단 분열조직내 내생 cytokinin 함량과 밀접한 관계가 있어 저농도



**Figure 3.** Direct shoots and protocorm-like body (PLB) formation from three types of root explant in *Doritaenopsis* hybrids in vitro. NRT, normal root tip; MRT, multiplicated root tip; RCS, root cluster section.



**Figure 4.** Pprotocorm-like body (PLB) formation from root tip and root cluster section of *Doritaenopsis* hybrids after 8 weeks of culture. A, PLBs formation from root tip; B, PLBs formation from root cluster section.

의 sucrose 첨가시 내생 cytokinin 함량이 높아지고 이것이 근단 분열조직을 자극하여 PLB 형성을 촉진하였다고 하였다.

이렇게 형성된 PLB는 activated charcoal 0.5 g/L과 3% sucrose가 첨가된 Hyponex 배지에서 2개월간 배양하여 식물체로 발달되었고, 신선한 동종의 배지로 옮겨 다시 2개월간 배양된 후 수태에 식재된 다음 온실에서 순화되었으며 순화된 식물체는 모두 형태적으로 정상이었다.

이로서 PLB 형성을 위해 근단배양을 할 경우, 기존의 방법대로 생장조절제가 첨가되지 않은 배지에서 배양된 식물의 근단을 배양을 하는 것보다 고농도의 auxin에서 뿌리덩어리를 유도하여 그 절편체를 배양하는 것이 절편체의 생존율, PLB 형성률 및 PLB 수 모두에 있어 효과적이므로 차후 *Doritaenopsis*의 영양계 번식시 뿌리 덩어리 절편체가 효율적인 증식재료로 이용될 수 있다는 것을 보여주었다.

**적 요**

*Doritaenopsis*의 근단으로부터 고빈도의 PLB 재분화를 유도하기 위해 NAA가 첨가된 배지에서 유묘를 배양하여 3가지 유형의 뿌리를 얻었다. 3가지 유형의 뿌리, 즉 생장조절제가 첨가되지 않은 배지에서 형성된 일반 뿌리 근단, NAA 1.0 mg/L이 첨가구에서 형성된 다수의 부정근 근단, NAA 5.0 mg/L 첨가구에서 얻은 뿌리 덩어리의 절편체를 TDZ 0.5 mg/L가 첨가된 1/2 MS 배지에서 배양한 결과 일반 근단배양시 30.0%의 절편체에서 PLB가 형성된 반면 뿌리 덩어리의 절편체 배양시는 77.8%의 절편체에서 11개 이상의 PLB가 형성되었다. 이 결과는 *Doritaenopsis*와 함께 *Phalaenopsis*속 식물의 영양계증식에 효율적인 방법이 될 것으로 생각된다.

사사 - 본 연구는 한국과학재단지정 충북대학교 첨단원에 기술개발 연구센터지원에 의한 것임.

**인용문헌**

Arditti J, Emst R (1993) Micropropagation of orchids. John Wiley & Sons, INC. New York, USA, pp 373-375  
 Chen YC, Chang C, Chang WC (2000) A reliable protocol for plant

regeneration from callus of *Phalaenopsis*. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 36: 420-423  
 Jeong JH, Yu KW, Chakrabarty D, Kim SJ, Paek KY (2002) In vitro regeneration and plantlet formation from adventitious roots of *Rehmania glatinosa* Liboschits. Propagation of Ornamental Plants 2: 19-23  
 Kano K (1965) Studies on the media for orchid seed gemination. Mem Fac Agri Kagawa Univ 20: 1-68  
 Kerbaux GB (1984) Plant regeneration of *Oncidium Varicosum* (Orchidaceae) by means of root tip culture. Plant Cell Rep 3: 27-29  
 Kerbaux GB (1993) The Effects of sucrose and agar on the formation of protocorm-like bodies in recalcitrant root tip meristems of *Oncidium Varicosum* (Orchidaceae). Lindleyana 8: 149-154  
 Kim KK (1974) Clonal propagation of orchids through aseptic culture of root-tip. Kor J Plant Tiss Cult 2: 13-16  
 Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. Physiol Plant 15: 473-497  
 Park SY, Yeung EC, Chakrabarty D, Paek KY (2002) An efficient direct induction of protocorm-loke bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. Plant Cell Rep 21: 46-51  
 Park SY, Murthy HN, Paek KY (2003) Protocorm-like bodies induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. Plant Sci 164: 919-923  
 Rotor Jr. G (1949) A method for vegetative propagation of *Phalaenopsis* species and hybrids. Amer Orchid Soc Bull 18: 738-739  
 Tanaka M, Senda Y, Hasegawa A (1976) Plantlet formation by root-tip culture in *Phalaenopsis*. Amer Orchid Soc Bull 46: 1022-1024  
 Tanaka M (1992) Micropropagation of *Phalaenopsis* spp Biotechnology in agriculture and Forestry. In: Bajaj YPS (eds), High-Tech and Micropropagation IV, Springer-Verlag, Berlin  
 Tylicki A, Burza W, Kuras M, Malepszy S (2000) A new way of achieving plant regeneration of *Solanum lycopersicoides* Dun. from root primordia culture. Plant Cell Rep 19: 837-844  
 Vaz APA, Kerbaux GB, Figueiredo-Ribeiro RCL (1998) Changes in soluble carbohydrates and starch partitioning during vegetative bud formation from root tips of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). Plant Cell Tiss Org Cult 54: 105-111  
 White PR (1934) Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. Plant Physiol 9: 585-600

(접수일자 2003년 7월 31일, 수리일자 2003년 9월 1일)