

### 1. 동양계 심비디움 속의 종자 무균배양

난은 수분후 수정까지의 기간이 일반적으로 매우 길며 성숙기간도 *Cypripedium* 류는 3, 5 개월 정도로 빠르나 동양계 심비디움 속은 10~12 개월 정도되며 속간차이가 현저하다(표 1).

성숙된 종자의 길이는 0.25~1.2 mm, 폭은 0.09~0.27 mm, 무게는 0.3~15 mg 정도이며 씨꼬투리당 종자수는 1 천 3 백~4 백만개 정도로 대단히 많고 종자는 매우 미세하여 수정란이 수백개의 세포로 된 미숙배가 한층의 세포로 된 종피에 싸여있는 불안정 배와 배유만 있거나 배유가 전혀 없는 경우도 있어서 자연상태에서는 공생균(mycorrhiza)과의 공생에 의해서만 발아가 가능하다. Burnard(1899)와 Burgeff(1904)에 의해 공생발아가 발견된 이래 Knudson(1922)은 근부에 공생하는 난균을 분리하여 공생발아에 관한 이론적근거를 제시하고 무기영류와 당을 넣은 한천배지를 만들어 무균배양을 시도하여 Knudson B 와 Knudson C 배지를 개발한 이후 난종자발아에 적합한 약 25 종의 배지가 개발되었는데 온대계 심비디움 속 종자발아를 위해서는 Murashige 와 Skoog 배지, Tscuchiya 다량요소와 Nitsch 미량요소배지 및 Hyponex 배지 등이 사용되고 있는데 지금까지 여러종류의 무기염을 첨가한 배지에 비해 Hyponex 배지는 매우 간편하고 효과적인 배지이다. 양란의 경우는 비교적 발아가 쉽고 발아 후 원괴체(protocorm)를 형성하나 동양계 심비디움 속의 종자는 종피의 투수성 불량, 발아억제 물질의 존재, 배의 활력감퇴, 배내의 발아 촉진물질부족 등의 원인으로 발아가 어렵고 발아 소요일수도 280~360 일로 대단히 길다. 또한 발아후 근경을 형성하여 이들 근경으로부터 식물체를 분화시켜야 하기 때문에 대량증식에 의한 산업화가 어려웠다. 종래에는 발아 촉진을 위한 KOH 와 Ca(ClO)<sub>2</sub> 용액으로 전처리하여 발아시켰으나 최근 초음파 처리에 의한 발아소요일수의 단축으로 동양계 심비디움 속은 거의 90 일 이내에 발아가 가능해졌으며 또한 이들 근경으로부터 유묘의 대량증식을 위한 효율성이 높은 구체적인 배지의 제시 등에 의한 증식체계가 확립되어 보다 효과적인 동양계 심비디움 속의 종자무균배양에 관해 기술하고자 한다.

표 1. 난과식물의 배발생과 종자발아

종 류	수분후 일수		최고발아율		
	배발생 완료 (일)	발아가능일수 (일)	수분후 일수 (일)	최고발아율 (%)	발아소요일수 (일)
새우란	90	50	70	90.0	95
금새우란	100	70	100	97.0	50
여름새우란	60	45	60	1.0	21
자 란	100	45	70~110	100	6
연잎요강꽃	90	70	70	0.8	227
타래난초	14	6	10~15	85.0	6
금난초	80	50	60	5.0	17
나비난초	40	25	40	40.4	10
해오라비난초	26	10	17~30	80.8	7
흑난초	70	50	75	87.5	37
천 마	16	10	17	76.8	30
풍 란	80	35	80	97.1	4
약난초	80	40	120	70.5	23
춘 란	120	80	100	60.0	38
한 란	230	190	230	42.3	42
파피오펜디움	200	160	170~180	85.3	10
덴드로비움	140	90	110~150	100	6
덴파레	160	110	160	97.8	10
팔레눔시스	120	80~100	90~150	100	6~12
반 다	250	220	250	93.5	7
심비디움	275	150	200	85.5	48
카틀레아	230	160	230	92.1	8
밀토니아	160	120	140	97.1	12

## 가. 인공수분

난꽃은 3 개의 꽃잎, 꽃받침 및 1 개의 꽃술대(화주, 예주 : Column)으로 구성되어 있으며 꽃받침이 꽃잎화 되어 아름답고 꽃잎중 한장은 설판으로 특이한 꽃의 형태를 나타낸다. 대부분의 완비화에서는 암술과 수술이 구분되어 있으나, 난과식물은 화주의 선단부에 화분괴(pollinium)가 있고 내측 아래쪽 오목한 부분에 주두(stigma)가 있다. 종자파종을 위해서 인공수분을 할 때는 먼저 약포(capsule)를 제거하고 안쪽의 화분괴를 핀셋으로 집어 내측의 주두안으로 밀어 넣는다. 한국춘란 소심과 한국춘란 복분화 혹은 일본한란 등과 교잡하였을 경우는 종자결실이 잘되나, 일본 한란 풍설 혹은 비연을 자가수분시켰을 경우는 자방은 비대하더라도 위수정이 되어 종자결실이 되지 않거나 배가 없는 경우가 대부분이다. 그러므로 파종전에는 현미경으로 배형성여부를 관찰하는 것이 좋다.

## 나. 종자전처리

동양계 Cymbidium 속의 종자는 서론에서도 언급하였지만 인공배지에 파종을 하더라도 발아가 어렵고 발아소요일수도 대단히 길다. 그래서 발아를 촉진시키기 위해서 종피의 투수성 증대와 발아억제물질의 용해를 위해서 KOH 처리와 종피의 연화를 위해  $Ca(ClO)_2$  처리를 하기도 하나 만족한 결과를 얻지 못하였다.

그러나 초음파처리(초음파세척기, Branson2000)를 4 시간하면 서로 다른 Cymbidium 속의 종내 또는 종간교잡 종자의 경우 파종 후 100 일 이내에 발아가 되므로 발아소요일수를 현저히 단축시킬 수 있다(표 2).

표 2. 한국춘란과 중국춘란 녹운 교잡하여 얻은 제 1 대 잡종종자를 KOH 혹은 초음파로 파종 전처리 하였을 경우의 발아상태

처 리	처리시간(분)	발아소요일수	발아상태
0.1N KOH	10	72	+
	30	67	++
	60	-	-
	120	-	-
	240	-	-
초음파	10	-	-
	30	78	++
	60	78	++
	120	78	++
	240	55	++++

주 : 1) 파종용 배지 : Hyponex 3g 1ℓ+ peptone 4g 1ℓ+ NAA 0.1 mg/ℓ+ Kinetin 0.01 mg/ℓ

2) Symbol : + 나뉘 ++ 중간 +++ 매우 좋음

## 다. 파종방법

살균은 씨꼬투리 상태에 따라 2가지 방법으로 할 수 있는데 씨꼬투리가 터져서 종자가 날리면 오염될 가능성이 높기 때문에 씨꼬투리(수분 후 10개월)가 터지기 전에 채종해서 파종을 하면 오염율을 현저히 감소시킬 수 있다.

### (1) 씨꼬투리가 안 터졌을 경우

① 씨꼬투리의 표면살균은 살균수 200 ml에  $Ca(ClO)_2$  16g 을 넣어 충분히 흔들어 가라앉힌 후 (3 번 반복) 위의 용액을 비이커에 따라 부어 씨꼬투리를 담근후 솜으로 살짝 눌러 20~30 분간 살균한다.  $Ca(ClO)_2$  용액은 만든후 3 시간 이내에 사용해야 살균효과가 있다.

② 표면살균한 씨꼬투리를 열개해서 종자를 비이커에 담아 산균수를 약간 넣은 후 자력교반기를 이용하여 종자를 충분히 흡습시킨다.

③ 초음파세척기에 종자가 담긴 비이커가 담길 정도의 물을 넣은후 초음파처리를 4 시간한다.

처리시간을 넘기면 배가 상처를 받을 염려가 있으므로 주의한다.

**(2) 씨꼬투리가 터졌을 경우**

① 살균수 420 ml에 Ca(ClO)<sub>2</sub> 8g 을 넣고 충분히 흔들여 가라앉힌 후 위의 용액을 비이커에 따라 부어 터진 씨꼬투리의 종자를 넣은 후 자력교반기를 이용하여 10 분간 살균한 다음 유리 필터(glass filter)를 이용하여 여과한 후 살균수로 씻어내야 한다. 유리필터도 고압증기멸균기로 살균한 것을 사용해야 한다.

② 살균한 종자를 회수하여 살균수가 들어 있는 비이커 담아 자력교반기를 이용하여 종자를 흡습시킨다.

③ 초음파처리는 씨꼬투리가 안 터졌을 경우와 동일한 방법으로 한다. 초음파 처리를 한 종자에 살균수를 첨가하여 밀도를 맞춘 후 스포이드로 파종해서 25℃ 전후의 항온기내에 암배 양한다. 종에 따라 다소 차이가 있으나 파종 후 100 일 정도되면 대부분 발아가 된다. 그후 근경증식용 배지로 옮겨 명배양하여 원하는 양만큼 증식시킨다.

**라. 발아과정**

난과식물은 중복수정은 일어나지만 종자를 파종하였을때 종자는 배만 있고 배유가 없으며 배 역시 미분화되어 있기 때문에 다른 식물과 같은 발아과정을 거치지 않고 원괴체(protocorm) 또는 근경(rhizome)을 형성하게 된다. 한국, 일본, 중국을 위시한 온대지역에 자생하고 있는 동양란종 *Cymbidium* 속에 속하는 종들의 경우 근경을 형성하게 되어 형성된 근경의 선단부에서 신초가 발생하는 특이한 과정을 거친다. 우리나라에 자생하고 있는 춘란종자의 경우 배는 원형 혹은 구형이며 배의 크기는 100~150 μm이고 주피가 변화된 박막상의 사세포로 된 종피로 싸여 있으며 종피세포는 세포벽이 리그닌화된 투명한 형질로 되어있다. 종자의 발아과정을 단계별로 구분하면 발아기, 근경신장기, 근경분지기, 분화시, 분화기 및 유묘형성기로 구분할 수 있으며 각 생육단계별 형태적 특징을 보면 발아기에는 수분흡수에 의해 배가 팽대되고 구상으로 생장하여 원괴체가 형성되고 원괴체가 어느정도 생장한 후는 근경으로 분화되어 속상의 근모가 발생하며 신장기에는 피층세포내 전분립의 존재를 확인할 수 있고 전형성층세포가 진전되어 중심주가 완성되어 피층세포에서 기공을 관찰할 수 있다. 분지기에는 표피세포로 부터 새로운 근경의 분지가 시작되며, 분화시에는 근경의 선단에서 엽원기가 형성되고 분화기에는 잎의 신장이 급격히 일어나 유묘형성기에 shoot 의 기부조직의 전형성층 조직으로부터 뿌리가 분화되며 뿌리의 중심주와 근경의 유관속이 연결되어 있음을 알 수 있다.

**마. 근경의 증식과 유묘의 생육**

Hyponex 와 peptone 배지는 온대계 *Cymbidium* 속 뿐만 아니라 타속의 난과식물에서도 상당히 효과적이며 배지조제도 간편하다. Hyponex 는 N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O 의 비율이 매우 다양하게 상품화 되어 나오고 있을뿐 아니라 일제 혹은 미제도 판매되고 있으나 일반적으로 가격이 저렴하고 N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O 의 비율이 6.5 : 4.5 : 19 인 국산을 이용하더라도 발아 및 유묘의 생육에 효과적이며 또한 복합아미노산 계통인 peptone 을 첨가함으로써 유묘의 생육을 현저히 촉진시킬 수 있는데 peptone 도 일제와 미제가 시판되고 있는데 유기물과 무기물의 성분조성이 다르다.

온대계 *Cymbidium* 속의 종자발아는 Hyponex (N : P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> : K<sub>2</sub>O=6.5 : 4.5 : 19) 3g/l, peptone(Difco Bacto) 4g/l, NAA 0.1 mg/l kinetin 0.01 mg/l에 sucrose 30g/l과 agar 8g/l를 첨가한 배지를 pH 5.0 으로 조정한 배지에 파종하여 암배양한다. 근경형성후 25℃전후, 16 시간 일장, 2,000~3,000lux(40w 형광등 3 개정도)의 명배양으로 옮긴후 근경증식용 혹은 분화용 배지로 이식한다. 근경과 유묘의 증식 및 유묘의 생장을 촉진시키기 위한 배지의 조성은 표 3 과 같다.

**표 3. 온대계 *Cymbidium* 속의 근경증식과 유묘의 생육을 위한 성장조절물질의 조합**

Cymbidium	근경증식	신초의 대량증식	신초생장	발근
제주한란 (대한×설문대)	N 2.0 mg/l K 0.5 mg/l	N 1.0 B 1.0~3.0	N 2.0 B 1.0	N 2.0 B 1.0 AC 500 ml/l

제주한란×제주한란	N 2.0 K 1.0	B 3.0	B 3.0	N 2.0 B 1.0 AC 500
한국춘란×한국춘란 (소심)	N 2.0 K 0.2	N 1.0 B 1.0	N 2.0 N 3.0	N 2.0 B 1.0 AC 500
한국춘란×한국춘란 (소심)	N 2.0 K 0.2	N 1.0 B 1.0	N 2.0 N 3.0	N 2.0 B 1.0 AC 500
한국춘란×중국춘란 (송매, 취일품)	N 2.0 K 0.2	N 2.0 B 3.0	N 2.0 N 3.0	N 2.0 B 1.0 AC 500
건란 소심란	N 2.0 K 0.2	N 0.5 B 1.0	N 0.5 B 5.0	N 2.0 B 1.0 AC 500
사란×중국춘란 설란 자운형	N 2.0 K 0.1	N 1.0 B 2.0	N 1.0 B 2.0 conut 60 ml/	N 0.5 B 1.0 AC 300
중국춘란 홍용자, 왕자	N 2.0 K 0.1	N 2.0 B 1.0	N 2.0 N 1.0	N 2.0 B 1.0 AC 1,000
중국춘란 (선록×금릉변)	N 2.0 K 0.1	N 2.0 B 3.0	N 2.0 N 1.0	N 2.0 B 1.0 AC 500
대명란×한란 금봉금 일광 혹은 호덕지화	N 2.0 K 0.2	N 1.0~2.0 B 3.0	N 2.0 N 3.0	N 2.0 B 1.0 AC 500
바아랑란×일본춘란 홍옥	N 2.0 K 0.2 ~0.1	N 2.0 B 3.0	N 2.0 B 1.0	N 2.0 B 1.0 AC 500
도사관	N 2.0 K 0.2	N 1.0 B 3.0	N 2.0 B 1.0	N 2.0 B 1.0 AC 500

## 2. 동양계 심비디움속의 경쟁배양

난과식물의 번식은 분주, 종자의 무균발아 또는 조직배양 등에 의하여 행하여져 왔으나 분주의 경우, 증식속도가 대단히 느린 반면 종자를 이용하게 되면 후대가 모체와 동일하지 않고 분리되어 이형주가 생산될 가능성이 높으며 특히 일무늬종(병물)의 종자를 파종하면 후 대에 무늬가 나타나지 않는 경우가 대부분이어서 유전형질이 동일한 개체의 육성을 위해서는 조직배양을 이용한 유묘의 증식방법이 적용되어야 할 것으로 생각된다.

열대산 *Cymbidium* 의 경우 성장점 배양은 비교적 일찍 이루어져 Morel(1960)에 의해서 최초로 시도된 후 Wimber(1963)와 Morel(1960)에 의해 성장점 조직으로부터 원과체를 얻어 이를 증식시켜 많은 유묘를 얻을 수 있는 방법이 제시된 이후 곧이어 산업화 단계에 이르렀으나 온대산 *Cymbidium* 속의 경우, 1970 년대에 접어들면서 성장점배양이 시도되었는데 Ueda(1985), Hasegawa 와 Goi(1987) 및 Hasegawa(1985)는 춘란 또는 한란의 성장점배양을 통하여 유묘증식을 시도하였으나 별다른 성과를 거두지 못하고 있는 실정인데, 이는 실험재료를 확보하는데 경제적인 어려움이 있을 뿐만 아니라 성장점배양이 여러가지 요인에 의해 재생력이 낮아 배양의 효율이 저하되기 때문인 것으로 판단된다.

### 가. 모주의 재배

난과식물은 다년생이므로 오염의 가능성이 대단히 높기 때문에 배양재료로 사용할 모주는 별도로 관리하고 오염원으로부터 가급적 격리재배하고 유기질 비료의 사용을 줄이고 관수도 살균수로 하는 것이 좋다. 또한 수분은 미생물의 전파요인이 되므로 식물체 전면 관수보다 화분에 관수하는 것이 좋고 살균,

살충제를 주기적으로 살포하는 것이 좋으며 최소한 3 개월 정도 이와 같은 상태를 유지해 주어야 한다.

#### 나. 재료의 살균

난과식물의 경정배양시 살균방법의 확립은 배양효율을 높히는데 상당히 중요하다. 즉 어떻게 하면 오염물을 줄이고 생존율을 높힐 수 있는가 하는 것이 과제다. 우선 채취한 재료를 배양 바로전에 수돗물에 충분히 수세한 다음 1% 벤레이트(농약) 용액에 10 분간 살균한 다음 춘란과 보세란 계통은 3%  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  용액에, 한란은 1%  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  용액에 10 분간 표면살균한 다음 엽을 제거한 후 부드러운 잎이 나올때 1%  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  용액에 3 분 정도 살균한 다음 성장점 부위를 채취하여 Citric acid 와 Ascorbic acid 가 각각 150 mg/l 함유된 용액에 1 시간 담근 후 흡습지에 흡습시킨 다음 배양한다.

#### 다. 초기배양 및 근경의 증식

초기 배양용 배지는 MS 배지에 NAA 1.0 mg/l, kinetin 0.1 mg/l 가 함유된 배지에서 암배양 2 주 후에 못핀 등과 같이 뾰족한 핀으로 1~2 회 정도 액아와 성장점 주위에 상처를 낸후 MS 배지에 NAA 0.1 mg/l kinetin 1.0 mg/l 함유된 배지에서 암배양하면 근경이 생기기 시작한다. 근경형성후는 명배양하면서 Hyponex 배지로 이식한다. 근경증식 및 유묘의 생육을 위한 배지조성은 그림 1 과 같다.

#### 라. 복륜계 무늬종의 변이중 변이 양상

경정배양으로부터 얻은 근경은 전자현미경적 관찰을 통해 보면 종자 유래의 근경과 형태적으로 같고 모조직의 성장점 혹은 액아가 신장을 계속해서 근경화가 된다.

복륜인 제관의 경우 1 년 정도 계대배양 하였을 경우 녹색과 백자(albino) 근경의 분리가 일어나며 이들을 각각 분리 배양하면 백자근경에서는 백자근경만 증식이 된다. 그러나 녹색근경에서 녹색 및 백자근경의 계속적인 분리가 일어나며 백자근경에서는 백자개체, 녹색근경에서는 복륜개체가 출현한다.

조복륜인 옥화는 배양 1 개월경부터 녹색근경으로부터 백자근경의 분리가 시작되며 백자 근경에서 녹색근경의 분리가 나타난다. 녹색근경으로부터 재분화된 개체의 잎무늬의 특성은 대단히 다양하여 조복륜, 복륜, 호, 원평호 등이 출현한다. 그러나 백자근경으로부터 백자만 출현하는데 기외이식시 모두 고사하므로 이런 백자식물체를 어떻게 정상 식물체로 키울 수 있는냐는 상당한 과제로 남아있다. 다같은 복륜인데도 부수촌의 경우는 배양초기부터 백자근경이 자라면서 kinetin 첨가배지에서는 고사하나 BA 첨가 배지에서는 생장은 계속되나 녹색 근경으로 분리되진 않는다. 이와 같이 다같은 복륜이라도 품종에 따라서 근경의 분리양상 및 재분화된 개체들의 잎무늬에 현저한 차이가 나타나는 것은 제관은 유전적으로 상당히 고정되었다고 볼 수 있다. 제관의 무늬 출현율이 98%정도되나 호반인 안적맹호는 32.2%정도 되고 봉황전은 전혀 무늬종이 나타나지 않는다는 보고도 있다. 이와 같이 난과식물의 경우 성장점에 있는 세촌의 세포중 돌연변이가 유기된 세포가 어느층의 어떤 부위에 위치하느냐에 따라 여러종의 무늬가 나타나며 부수촌의 경우에 정상무늬채체를 전혀 얻지 못한 것은 경정배양에서 유기된 근경이 백자(albino) 세포에서 유래된 가능성이 높다.

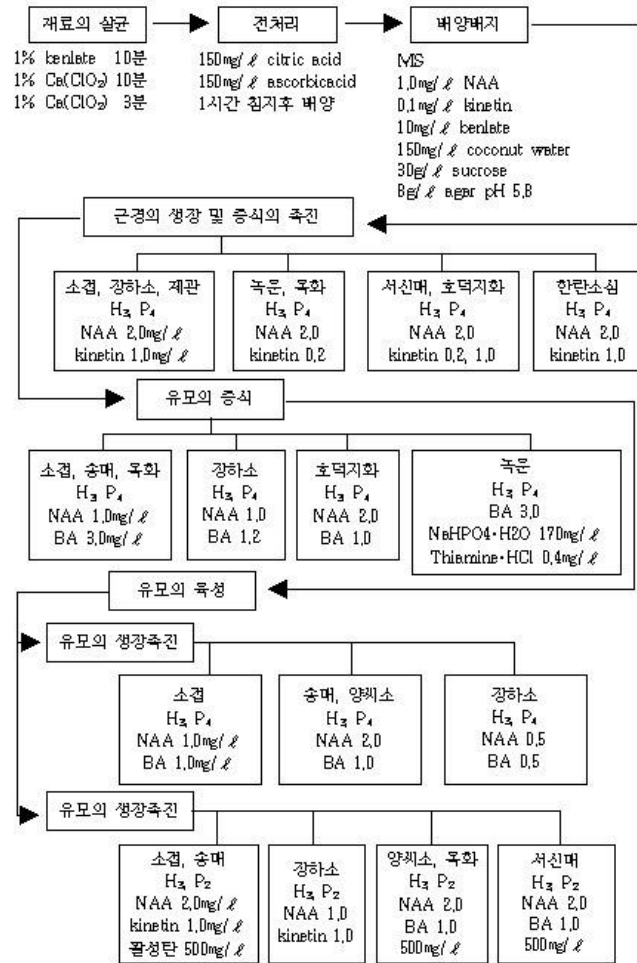


그림 1. 경정의 초기배양

참 고 문 헌

정재동. 1985. 자생한란의 rhizome 성장과 기관분화. 한국원예학회지.  
 최수옥. 1990. 온대계 심비디움속의 종자 무균발아 및 경정배양에 의한 유묘의 증식체계 확립과 변이체 선발. 경북대학교 대학원 박사학위논문.  
 Haploid in cereals. Clapham. D. H. New York.  
 Variation arising during culture. Pierik, R. L. M. Boston.