

# Virus 無毒株 生産을 위한 안개초의 生長點 培養에 關한 研究

蘇 寅 燮

## 緒 言

안개초는 耐寒性이 강한 반면 耐暑性이 약한 宿根 花卉類로서 大部分이 冬季 栽培用 切花類로 꽃꽂이하할 경우 1個月 以上이나 壽命을 지속시키는 長點이 있기때문에 수요가 날로 급증하여 앞으로 대규모의 栽培가 기대되는 유망 花卉種이다.

그러나 種子 과종을 통한 1年生 品種들과 혹은 宿根性이라 하더라도 흉피기로 開花하는 品種들은 艸科 品種에 比하여 市場性이나 영리栽培에 不適台 하기 때문에 우수한 艸科 品種을 接木 하거나 저장된 목은 뿌리를 다시 심어 目的한 바 切花生産을 하고 있는 實情이다.

그러나 營養系 繁殖性 作物의 취약점으로 잘 알려진 virus 감염문제는 本 植物의 경우에서도 심각하게 作用하여 栽培年限이 경과함에 따라 감염 정도가 甚化되어 營利 栽培의 成敗를 좌우할 만큼 重要한 問題點으로 대두되고 있다.

한편, Morel(1952)이 組織培養法을 利用하여 生長點을 培養한 結果 virus 無病株가 生産될 수 있음을 확인 發表한 以來 必要의 정도에 따라 植物의 種類別로 生長點培養 하여 virus 感染 test 를 거친後 苗의 大量生産이 可能하게 되었다.

안개초의 경우에도 生長點培養을 통한 苗의 大量繁殖에 關하여 몇편의 論文이 發表되어 實利用 단계에 있지만(Kusey 等 1980) 그 규모나 절차가 너무 단조롭기 때문에 그러한 성적의 확인과 문제점 제시를 위한 보다 確실한 研究가 요망되고 있으며 더군다나 國內에서는 그러한 시도가 전혀 없었기 때문에 급증하는 苗의 수요를 충당하기 위하여 수입상을 통해 막대한 外화를 낭비 해가면서 大量으로 苗를 수입하는 實情에 있다.

따라서 本 實驗은 안개초의 生長點을 培養하는데 있어 callus 단계를 거친後 脫分化 시킨 苗의 경우에는 馴化現象이 發生되어 培養의 目的을 그르치는 사례가 많음을 고려하여 生長點에서 직

## 2 亞熱帶農業研究

접 植物體가 유기되는 生長調節物質의 組合을 究明하며 계대배양하여 苗의 大量生産 체계와 發根까지의 一連의 과정을 확립하는데 目的을 두었다.

### 材料 및 方法

供試 品種으로는 겹피기종이며 가장 인기있고 널리 栽培되고 있는 'Bristol Fairy'를 選定하여 1984년 10월 초순에는 休眠이 끝나 새순이 發生하기 시작하는 莖頂으로 부터 dome型의 生長點과 2枚의 葉原基를 부착한 組織을 0.2mm 정도로 절취하여 培養에 임하였다.

培地는 vitamin과 amino acid가 포함된 基本 培地에 inositol 100mg/l, sucrose 30g/l, 寒天 7g/l를 첨가하였으며, 산도는 寒天을 넣기전에 5.8로 調定하였고 1.2 psi/cm<sup>2</sup> 조건하에서 15분간 autoclaving 하였다.

生長調節物質은 auxin 類로서 NAA를 0, 0.1, 1.0, 5.0mg/l로 하고 cytokinin 類로는 BA를 0, 0.1, 1.0, 5.0mg/l로 하여 2가지 物質을 相互 組合한 16처리를 두었으며 처리當 20반복으로 實驗하였다.

對相 用器로 生長點 培養時는 직경 1.2cm의 test tube를 使用하여 用器當 10ml의 培地를 注入하였으며, 發根 실험에서는 100ml들이 flask에 20ml의 培地를 注入하였는데 이때 置床材料로는 生長點 培養에서 發生된 幼苗에 2枚의 葉을 부착시킨 마디를 1cm 길이로 절단하여 flask當 3개씩 심었다.

培養苗의 發根을 위해서는 生長點 培養에서 얻어진 幼苗를 액아가 부착되도록 1마디씩 절단하여 用器當 2개씩 植상하였는데 對象 培地로는 MS와 White 培地를 그리고 苗의 木質化를 촉진한다고 추진된 Tatsuya등(1982)의 培地(以下 X-medium)를 定하여 各各 무처리, 活性炭 2g/l와 NAA 0.01, 0.1mg/l 처리구 등 4처리를 두어 不定芽와 生體重, 草長, 發根數 및 callus의 무게를 조사 하였다.

培養室의 온도는 25°C ± 2로 하였고 光度는 1.5KLux 정도의 밝기로서 日長이 16시간 되도록 自動 調節된 培養室에서 培養하였다.

### 結果 및 考察

Table 1의 結果를 보면 培養50日後의 結果로서 NAA가 단용처리된 것 들이나 대조구 모두 發根되는 양상을 보이고 있으며 비례적으로 NAA 1mg/l 처리 까지는 BA의 첨가에 관계없이 NAA 단용 처리에서 callus의 發生量도 가장 많았다.

그러나 NAA 5mg/l 수준에서는 BA 1mg/l 첨가구에서 callus의 무게가 가장 무거웠지만 生長울만 볼때는 다른 처리에 比하여 뒤떨어짐을 알 수 있다.

不定芽의 發生은 NAA 0.1mg/l에 BA 1.0mg/l 혼용 처리구에서 평균 15.6개의 최고 수준을 보이고 있으며 生體重 또한 3.87kg으로 全처리에서 가장 좋은 生育을 보인다.

Table 1. The growth response of *Gypsophila paniculata* 'Bristol Fairy' shoot tips *in vitro* with various combinations of varied BA and NAA concentrations.

BA	NAA	No. of shoots	No. of roots	Shoot length	Callus weight	Total fresh wt.
0 (mg/ℓ)	0	2.5	4.3	57 (mm)	0.12 (g)	0.35 (g)
	0.1	1.5	5.3	25	0.35	0.51
	1.0	1.3	5.5	22	0.72	0.84
	5.0	-	15.5	-	1.21	1.26
0.1	0	4.2	-	46	-	0.78
	0.1	9.8	-	58	0.24	2.23
	1.0	3.0	-	42	1.57	1.76
	5.0	1.0	-	5	1.35	1.42
1.0	0	7.5	-	51	-	1.32
	0.1	15.6	-	53	0.14	3.87
	1.0	6.7	-	47	1.74	2.15
	5.0	2.3	-	8	1.38	1.53
5.0	0	12.7	-	38	-	2.06
	0.1	14.8	-	51	0.10	3.62
	1.0	8.5	-	26	1.82	2.36
	5.0	4.6	-	26	1.12	2.26

Data was obtained 50 days after culture.

안개초의 生長點 培養에서 Kusey(1980) 등의 結果로는 MS培地에 NAA 0.05mg/ℓ 와 BA 2.0mg/ℓ 를 混合 처리하여 15일간 배양하는것이 좋다고 하였는데 그들은 特히 NAA의 농도가 높아짐에 따라 callus의 生育이 증가하며 不定芽의 發生이 억제되는 現象을 강조하고 있다.

이러한 現象은 本 實驗의 結果에서도 잘 나타나고 있는데 일반적인 常識에 비추어 볼때 callus化를 촉진하는 auxin類를 첨가하지 않는다면 callus化 되지 않고 직접 植物體가 發生되는 것이 已知의 事實이며 그러한 단계를 거쳐야만 型質의 變異가 없는 영양제의 繁殖이 가능하다는 것이 많은 보고에 나타나고 있다 (Grinblat 1972; Yokoyama, Takeuchi 1976; Hedtrich 1977).

그러나 cytokinin 단용처리 즉 BA 0.1, 1.0, 5.0mg/ℓ 처리에서 나타나는 結果들은 물론 callus나 뿌리의 發生은 없었지만 生育이 가장 좋은 BA 5.0mg/ℓ 의 경우에서도 NAA 0.1mg/ℓ +BA 1.0mg/ℓ 혼용 처리에 比하여 生體重이 절반 정도 밖에 되지 않음을 관찰하게 되는데 역시 안개초의 경우에도 少量의 auxin이 첨가 되므로서 cytokinin의 作用能을 相助하게 하여 가능한 한 callus化 後 脫分化 시키지 않는 범위에서 混用처리 하는 것이 좋겠다. 따라서 NAA 0.1mg/ℓ 가 첨가 되고 그 10배가 되는 BA 1.0mg/ℓ 가 混用 첨가될 때 가장 좋은 生育을 볼 수 있으며 이때 少量의 callus 發生도 生長點이 變換한 것이 아니고 生長點 절취때의 葉原基에서 由來된

#### 4 亞熱帶農業研究

것이므로 별다른 問題가 없겠다.

發生된 幼苗의 發根을 위하여는 3種의 培地를 對象으로 하였는데 器內에서 xylogenesis를 촉진한다고 알려져 X-medium으로 추천된 Tatsuya등(1982)의 배지는 生育반응이 전혀 없었으며 Kusey(1980)가 利用한 White培地는 MS培地보다 發根率과 數에서 열등한 結果를 보이고 있다 [Table 2].

Table 2. Effect of auxin and activated charcoal treatments to the rooting of *Gypsophila paniculata* 'Bristol Fairy' internode at three kinds of medium.

Medium	Root length	No. of shoots	No. of roots	Rooting	Intensity of plantlet
X-medium	-	1.0	-	-	+
" + AC 2g/l	-	1.5	-	-	+
" " + NAA 0.01mg/l	-	1.0	-	-	+
" " + NAA 0.1mg/l	-	1.0	-	-	+
White medium	7	2.3	1.2	10	++
" + AC 2g/l	8	6.4	2.4	25	++
" " + NAA 0.01mg/l	10	3.8	3.5	30	++
" " + NAA 0.1mg/l	11	3.2	3.8	40	++
MS medium	26	3.2	7.8	65	+++
" + AC 2g/l	28	7.5	10.2	57	++++
" " + NAA 0.01mg/l	29	5.3	12.3	95	++++
" " + NAA 0.1mg/l	32	3.7	15.4	100	++++

Data was obtained 30 days after culture.

또한 發根을 유도하기 위한 NAA 처리들도 活性炭 2g/l 처리에 比하여 White나 MS培地의 경우 모두 뒤떨어진 結果를 가지는 것은 흥미로운 일이다.

Kusey等(1980)은 發根을 위하여 器內에서 幼苗를 꺼내어 millipore filter를 거친 IBA 25mg/l 용액에 5초간 침적한 後 다시 培地에 置床하는 것이 좋다고 추천한 바 있는데 이러한 절차를 밟기에는 작업이 매우 복잡해지며 오히려 오염율만 높히는 結果를 초래하게 된다.

굳이 auxin類를 처리하지 않더라도 活性炭의 첨가만으로 우량한 發根이 유도된다면 가치 추천할 만한 처리라 할 수 있겠는데 이러한 結果에 對하여는 Sandra와 Krikorian(1984)이 banana의 組織培養에서 얻어진 幼苗는 活性炭의 첨가나 IBA의 처리에 依하여 發根이 양호하게 이루어진다는 사실과 Rangan(1984)이 pineapple의 幼苗 發根에서 活性炭의 效果를 확인하는 등 여러 연구자들에 依하여 器內에서 幼苗의 發根 촉진 效果가 밝혀지고 있지만 果然 活性炭이 培地에 첨가됨으로써 그 자체가 carbon으로서 發根에 직접적으로 관여하는 것인지, 培地의 색깔을 검게 하여 간접적으로 배양되는 幼植物體의 굴지성이 촉진된 결과로 發根이 유도되는 것인지(Conger 1981), 배양 植物體가 發生하는 有害의 대사 분비물이 活性炭에 吸收되어 發根이 촉진된 것인지

는 (Fridborg 等 1978) 앞으로 상세한 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

한편 Table 2에서 보는 바와 같이 發根을 위하여 培養할 때 培地의 種類와 첨가되는 物質에 따라서도 不定芽의 發生數가 다르게 나타나고 있다.

이 경우에도 活性炭이 첨가된 MS 培地에서 不定芽의 數가 7.5個로 가장 많이 發生하고 있는데 이때 發生된 不定芽들은 새로이 分化된 것이 아니고 發根을 위하여 置床한 explant의 internode에 잠복해 있는 잠아들이 器內라는 특수 조건에 依하여 出現된 것이므로 苗의 安定性 여부에 對한 염려는 없어도 되겠으며 이러한 경우는 변과 김(1985)의 carnation 實驗과 同一하다.

結論적으로 안개초의 生長點 培養을 利用한 苗의 大量生産에는 (BA 1.0mg/l + NAA 0.1mg/l) 를 첨가한 MS 培地를 利用하여 최초의 生長點을 50日間 培養한 後 培養된 幼苗를 1개의 마디별로 절단하여 活性炭 培地에 30日間 계대배양하면 發根은 물론 目的한 바 대로의 幼苗를 계획生産해 낼 수 있다.

培養苗의 virus 감식에 對하여는 현재 안개초의 경우 쉽게 감식할 수 있는 檢定植物이 있는 것도 아니고 ELISER test나 hybridomal method를 도입할 기술도 없고 또한 전자 현미경에 依한 virus體의 확인 역시 할 수 없었지만 韓(1982)에 依하면 비록 virus에 감염되어 있다 하더라도 grow-divide-grow法에 依하여 잠복해 있는 잠아를 계속적으로 出現시키는 계대배양을 8代 정도 하면 virus가 자연 소멸된다고 한 바 있기 때문에 生長點 절취時 조직편을 가능한 한 0.2mm 되게 절단하여 배양하게 되면 virus-free苗를 얻을 수 있으리라 생각된다.

그러나 生産된 苗들은 대체로 연화 도장하여 硬化 단계에서 생존율이 상당히 떨어질 것으로 사료되는바 強建苗生産을 위한 anti-GA 처리, 高光度처리 및 低溫처리에 관한 후속 實驗이 절실히 요구되는 바이다.

## 摘 要

안개초의 生長點 배양을 利用한 virus 無毒株 生産을 위하여 NAA와 BA의 組合에 따른 生育 調査와 幼苗의 發根에 對한 실험을 3種의 培地를 對象으로 活性炭 처리와 NAA 처리를 실시한 바 그 結果는 다음과 같다.

1. 生長點 배양에 가장 적합한 生長調節物質의 組合은 개량 MS培地에 NAA 0.1mg/l에 BA 1.0mg/l 混用 處理區에 설탕 30g/l, 寒天 7g/l, inositol 100mg/l 를 첨가하므로서 나타났다.
2. 幼苗의 發根은 MS培地에서 活性炭 2g/l 첨가구에서 가장 좋았다.
3. 幼苗의 줄기 마디를 1cm로 하여 MS培地에 活性炭 2g/l 첨가구에서 배양할 경우 잠아가 모두 出現하여 生長調節物質을 첨가되지 않고도 대량증식을 위한 계대배양 체제를 확립할 수 있었다.

參 考 文 獻

- Conger, B. V. 1981. Cloning agricultural plants via in vitro techniques. CRC Press, Inc. Florida p.14.
- Fridborg, G., Pederson, M., Landstrom, L., and T. Erksso. 1978. The effect of activated charcoal on tissue culture: Absorption of metabolites inhibiting morbjogenesis. *Physiol. Plant.* 43: 104-112.
- Grinblat, U. 1972. Differentiation of Citrus stem in vitro. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 97: 599-603.
- Hedteich, C. M. 1977. Differentiation of cultivated leaf discs of *Prunus mahaleb*. *Acta Hort.* 78: 177-182.
- 韓昶烈. 1982. 植物組織培養. 一潮閣, pp.51-67.
- 金奎元·邊美順. 1985. 莖頂培養에 의한 카네이션 無病株의 획득과 대량번식. *韓園誌*. 14(1): 76-82.
- Kusey, W. E., Hammer, P. A., and T. C. Weiler, 1980. Invitro propagation of *Gypsophila paniculata* L. 'Bristol Fariry'. *Hort Sci.* 15(1): 600-601.
- Tatsuya, S., Sango, B., and W. R. Lorin, 1982. A revised medium for the enhancement of in vitro xylogenesis in the presence of auxin and cytokinin. In: *Plant tissue and cell culture*. Printed by Abe Photo Printing Co. Ltd., Tokyo, Japan. pp.99-100.
- Yokoyama, T. and M. Tacheuchi, 1976. Organ and plantlet formation from callus in Japanese persimon (*Diospyros kaki*). *Phytomorphology* 26: 273-276.

A Study for Clonal Mass Propagation of Virus Free Stocks through Meristem Tip Culture of the Gypsophila paniculata 'Bristol fairy'

*So In-sup*

Summary

This experiment was conducted to study the rapid clonal mass propagation of virus-free stocks on the *Gypsophila paniculata* 'Bristol Fairy' in vitro with various combinations of varied BA and NAA concentrations in MS medium, and to elucidate the rooting response of internodal explants at three kinds of medium contained with several rooting agent treatments respectively.

The results obtained are as follows:

1. The maximum number of multiple shoots from meristem tips were proliferated on modified MS salts, 30 g / ℓ sucrose, 7 g / ℓ agar, 100mg / ℓ myo-inositol, with 0.1mg / ℓ NAA plus 1.0mg / ℓ BA.
2. In addition of activated charcoal 2 g / ℓ to MS medium was apparently promote the *in vitro* rooting and shoot growth of explants proliferated from meristem tips.
3. *In vitro* rooting of 1cm internodal explants proliferated from meristem tips, namely *in vitro* micro-cuttings, was formulated a subculturing system for rapid clonal mass propagation of *Gypsophila* without any plant growth regulators supplimented.