

# Gerbera 組織培養苗의 透明化 防止를 爲한 Uniconazole의 效果

張同鎭 · 蘇寅燮 · 康 勳 · 韓海龍

Effect of Uniconazole for Preventing Vitrification  
on *Gerbera jamesonii* 'Sonia' *In Vitro*

Chang, Dong Jim · SO, In Sup · Kang, Hoon · Han, Hae Ryong

## Summary

This study was carried out to prevent vitrification and to promote rooting on 'Sonia' plantlets (*Gerbera jamesonii*) with varied concentrations of plant growth regulators and uniconazole application *in vitro*.

The results obtained are summarized as follows : Combinations of 2mg/l BA and 0.2mg/l NAA were more effective than those of 5μg/l Fulmet and 0.2mg/l NAA for plantlet production from *in vitro* culture of shoot tip. The higher cytokinin level in medium, the more increasing trend of the vitrification of plantlets was observed. High concentrations of gelling agent decreased vitrification while the increased sucrose concentrations promoted vitrification. The low level of gelling agent was less effective in preventing vitrification. Uniconazole at concentration of 0.5mg/l caused significant reductions in preventing vitrification and mass propagation of plantlets. Under the higher sucrose and the lower gelling agent levels in the medium were promoted vitrification, but it might be beneficial to use 0.5mg/l uniconazole to preventing vitrification and to increase chlorophyll synthesis. When silver nitrate at concentration of 1.0mg/l to 7.0mg/l was applied in the medium, ethylene production was decreased in control at 80ppm in cultural vessels 756.4ppm in untreated control, whereas there was no differences in ethylene reduction between AgNO<sub>3</sub> and uniconazole treatments. The best results for rooting response of plantlets were obtained with 0.2mg/l NAA in the medium, but the application of 5μg/l Fulmet known as cytokinin promoted rooting or secondary root formation in addition to mass proliferation of plantlets.

## 緒 論

거베라는 南 아프리카와 熱帶 아시아지역에 自生하는 永年生 宿根草인데 환경만 알맞으면 年中 開化시킬 수 있으며 더구나, 花色이 다양하고 花形 또한 切花用으로도 적합하기 때문에 인기있는 栽培 有望作物이다.

우리나라의 경우에는 '90年을 起點으로 栽培 面積이 35.5ha에 달하여, 카네이션보다 單位 生産額에서 20%가 더 많은 農家소득을 올리고 있는 것으로 보아 앞으로 그 栽培面積은 늘어날 전망이다.<sup>16)</sup>

묘의 공급은 F<sub>1</sub> 種子를 이용하여 實生繁殖하는 品種이 몇가지 있기는 하지만 採花數나 花形, 花色이 단조롭기 때문에 切花生産을 목적으로 하는 栽培에서는 기피되고 있고 주로 分株와 같은 營養繁殖法에 의존하고 있다. 그러나 모든 植物의 경우와 마찬가지로 在來의 營養繁殖을 하는 경우 virus 感染이 문제되어 栽培年數가 오래될수록 收穫量, 品質 등이 현격히 저하되므로 지금으로서는 거의 生長點 培養技術을 이용<sup>18)</sup>한 mericlone 苗를 구입하여 실제 栽培하고 있는 실정이다.

일반적으로 組織培養技術을 이용한 苗의 大量生産의 경우에 나타나는 문제는 苗의 馴化와 透明化現狀<sup>5, 27)</sup>을 들 수가 있는데, 馴化의 경우에는 繼代培養의 횟수를 줄이거나 培養에 사용되는 生長調節物質의 量을 조절함으로써 生長苗의 變異發生을 줄일 수가 있다는 研究報告<sup>11, 18)</sup>가 있기는 하지만, 이 또한 앞으로 深度있게 研究檢討되어야 할 課題로 남아 있다. 그러나, 苗의 透明化現狀은 생산된 苗가 容器內的 過濕狀態<sup>10)</sup>나 培養植物體가 發生

하는 ethylene gas 발생<sup>21)</sup>에 의하여 軟化되기 때문에 健全苗 前 段階인 硬化에 문제가 있어<sup>2)</sup> 組織培養 全過程上 가장 어려운 문제이며 바로 이러한 現狀을 어떻게 防止하고 解決하느냐가 健全苗 育成의 成敗를 좌우한다고 할 수 있다.

지금까지 밝혀진 透明化發生 원인으로는 培養植物體의 葉綠素와 蛋白質의 결핍과 水分過多<sup>12)</sup>, 支持材料의 水分포텐셜 저하<sup>31)</sup>, 培養병마개의 종류에 따른 gas의 交換程度와 増産速度<sup>4)</sup>, 低光度<sup>24)</sup>, 生長調節物質의 첨가비율 등<sup>7)</sup>에 따라서 透明化 현상이 좌우 된다고 하였다. 따라서 본 실험은 生長調節物質別 幼苗 生産力 檢定을 거친 후 培地支持材料의 種類와 濃度에 따른 반응, 植物矮化劑 處理의 효과, 그리고 이에 따른 細胞의 構造의 變化를 관찰하고 AgNO<sub>3</sub>의 處理에 의한 植物의 ethylene gas 發生抑制 정도를 밝히며, 특히, 發根에 관하여는 최근에 개발된 生長調節物質인 fulmet를 사용하여 거베라의 透明化방지에 대한 基礎資料를 얻기 위하여 실험하였다.

## 材料 및 方法

供試材料로는 비닐 하우스 내에서 採花中인 成苗의 거베라(*Gebera jamesonii*) 중 'Sonia' 品種을 선택하여 春季의 採花가 끝난 후 幼苗를 採取하여 사용하였다. 材料植物로부터 生長點 切取를 위하여 採取된 幼苗는 外葉과 뿌리 등을 제거한 후 小形 부러쉬로 가볍게 닦은 다음 98% ethanol 溶液에 3抄 정도 侵漬處理하고 tween 20이 첨가된 10%의 NaClO 溶液에서 20分間 殺菌한 후 滅菌水로 數回 세척하였다.

滅菌된 材料植物들은 20倍의 實體顯微鏡下에서 無菌的으로 生長點을 摘出하여 BA 2mg/l와 NAA 0.2mg/l가 함유된 MS 培地를 300ml flask 當 60ml로 注入한 培地에 置床하여 앞으로의 實驗을 위한 材料植物을 확보하기 위하여 培養에 임하였다. 培養室은 1.5KLux 이상 이 照明되도록 백색 螢光燈을 설치하였으며 室溫이 25±2°C 되고 日長은 16時間의 長日이 되도록 人爲造作된 環境을 주었다.

### 1. 生長點培養을 爲한 Auxin과 Cytokinin 類의 處理

Cytokinin 類로서 kinetin (6-furfurylam-inopurine), Benzyl adenin (6-benzyl amino purine, 이하 BA라 칭함) 그리고 fulmet (N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea 일명 2Cl-4pu)를 사용하였는데 kinetin과 BA는 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0mg/l와 fulmet는 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0μg/l의 濃度 등 모두 15 處理에 의한 生長點培養을 실시하여 個體발생 수, 草長, 生體중 그리고, 透明化發生 程度를 調査였다. 試驗處理當 10회 반복으로 하고 flask當 3개씩의 生長點을 置床 하였는데 초기의 生長點培養은 8주간의 培養을 하였으며 透明化發生은 觀能調査法에 의하여 (-) 정상, (+) 30%미만, (++) 50% 미만, (+++) 60% 이상 등의 기준으로 判호 안의 記號로 표시하였다. 또한 auxin 과의 혼용處理를 보기 위하여 NAA (1-naphthaleneacetic acid, 이하 NAA라 칭함) 0.2mg/l 에 위에 소개된 3種의 cytokinin 류 5 濃度處理와 조합하여 生長點培養에서 얻어진 幼苗를 재료로 置床하였으며 調査內容은 生長點培養試驗과 동일하게 하였다.

### 2. 培地 支持物과 糖濃度差에 依한 透明化發生과 葉綠素含量

培地の 支持物로는 寒天과 gelite (Gellan gum : Kelco, San Diego Calif.)를 사용하였는데 gelite는 1.25, 1.5, 2.0g/l 濃度로, 그리고 寒天은 7.10, 13g/l 되게 支持物의 濃度를 점차적으로 높여 주는 處理와, 糖의 濃度는 10, 20, 30, 50mg/l로 처리하되 生長調節物質 處理로서, 실험 1에서 얻어진 結果를 토대로 선발된 BA 2mg/l+NAA 0.1mg/l와 fulmet 5.0 μg/l+0.2mg/l를 기본으로 하여 배양한 結果를 觀察하였다. 葉綠素의 分析을 위해서는 試料 1g을 5ml phosphate buffer (ph 6.8)와 5ml 80% acetone 溶液에 각각 磨碎한 다음 分光光度計를 이용하여 波長 645nm와 663nm에서 측정<sup>17)</sup>하였다.

한편, 正常苗과 透明化苗의 解剖學的 觀察은 Vibratome (Series 1.000, American Scientific Product)으로 葉組織이 100μm 되도록 longitudinal section 하여 250倍의 光學顯微鏡을 사용하여 細胞構造間 차이를 보았다.

### 3. Uniconazole과 AgNO<sub>3</sub> 處理에 依한 透明化 防止

최근에 개발된 植物矮化劑의 일종인 uniconazole의 效果를 보기 위하여 소량의 acetone에 溶解시켜, 준비한 100mg/l stock solution을 이용하여 그 濃度를 각각 0.1, 0.5, 1.0mg의 3가지 濃度處理를 하되 基本培地로는 BA 2mg/l+NAA 0.2mg/l와 fulmet 5μg+NAA 0.2mg/l가 조합된 MS 基本培地를 사용하여 적정濃度로 하였다. 이어서, 적정수준으로 밝혀진 0.5mg/l의 uniconazole을 기준으

로 하여 糖과 寒天의 濃度를 달리한 조건에서  
의 生育反應과 透明化發生程度를 調査하였으  
며 특히, 正常植物과 透明化植物 間의 葉綠素  
含量도 비교하였다.

또한, 培養植物體가 발생하는 ethylene gas  
의 발생에 대한 生長調節物質別 반응과 發生  
抑制別로 알려진 AgNO<sub>3</sub>의 處理효과를 보기  
위하여 소량의 ethanol(70%, V/V)에 溶解시  
켜 1.000mg/l로 조제한 stock solution을 300  
ml flask당 1, 3, 5, 7mg/l로 培地내에 處理하  
여 培養 4週 후의 器內濃度를 調査하였다.

Ethyene gas 분석에는 Gas Chromatog-  
raph (Pye Unicam Series 304 Chrom-  
atograph philips)를 사용하여 colume 으로는  
25m quarts capillary FFAP column으로, 溫  
도는 100°C에서 또한 injector의 溫度는 固定  
하였으며 detector는 FID를 使用하여 溫度를  
280°C로 하고 N<sub>2</sub> gas를 carrier로 하였으며  
standard를 잡기위한 sample은 45ppm 濃度

의 ethylene gas를 전체 注入量 100μl 되게 하  
였다.

#### 4. 培養苗의 發根을 爲한 生長調節物質 의 處理

係代培養된 苗중에서 透明化하지 않은 苗들  
을 선정하여 MS 기본培地에서 發根促進物質  
인 NAA 0.2mg/l, 活性炭 2g/l 그리고 Fulemt  
5ppb 處理등, 3處理에 대하여 發根數, 根直  
徑, 根長, 新草發生數 그리고 2次根의 발생에  
대하여 4週間 培養한 結果를 관찰하였다.

### 結果 및 考察

#### 1. 生長調節物質의 濃度別 處理時 發生 되는 透明化現狀

(그림 1)은 健全苗와 透明化苗를 확연히 區  
分한 것으로 透明化苗는 葉柄의 길이와 굵고  
잎색깔도 黃化되어 있으며 잎모양도 길게 발

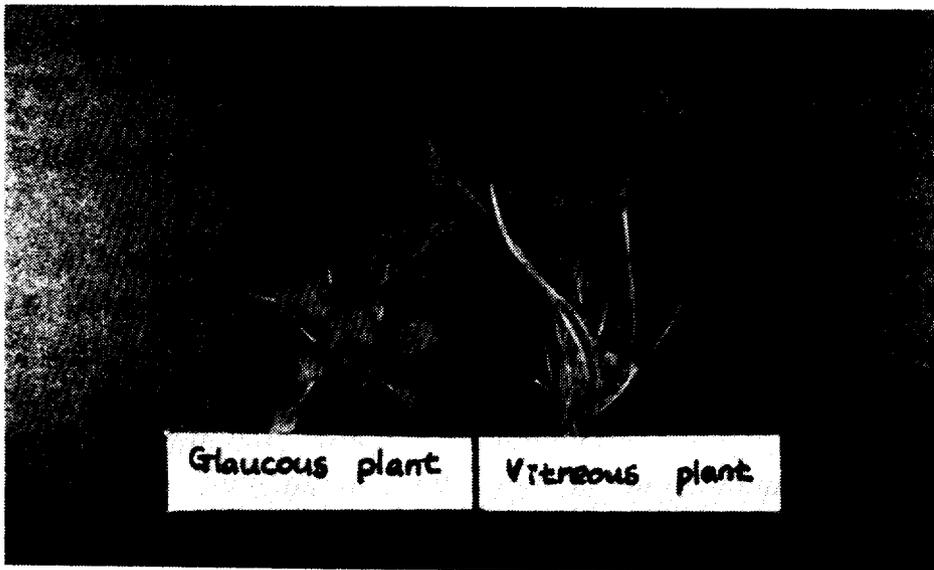


Fig. 1. Normal and vitrified plantlets of *Gerbera* by shoot tip cultured for 8 weeks *in vitro*.

달하여 苗가 徒長되어 있음을 나타내고 있는 반면, 健全苗는 外觀상 모든 生長이 단단하게 발달되어 있음을 볼 수가 있다.

健全苗와 透明化된 苗 간의 잎의 縱斷面을 관찰한 結果는 (그림 2)와 같다. 健全苗는 表皮와 葉肉組織 즉 冊床組織과 海綿組織이 正常的으로 발달되어 있음에 비해 透明化된 苗의 잎은 表皮와 葉肉組織의 구분이 불분명하며 冊床組織에서도 細胞間隙이 넓고 細胞의 모양 또한 不均衡的으로 構成되어 있음을 볼 수가 있다.

組織培養시 發生하는 透明化된 苗의 特徵은 細胞內的 水分含量의 增加<sup>9)</sup>와 그에 따른 셀룰로오스 蛋白質含量<sup>10)</sup>, 리그린 및 홀라보노이드<sup>11)</sup> 合成의 低下 그리고 葉綠素 含量<sup>7, 12)</sup>의 감소등에 관한 여러가지 植物에 대한 報告가 있다. 본문에서도 잎의 構成組織이 형성하며 葉綠體

의 量도 健全苗에 비하여 透明化된 苗에서 현저하게 적게 보이는 현상은 苗의 透明化程度를 확실히 보여주는 단면이라고 생각된다. Debergh<sup>3)</sup> 등은 透明化現狀을 hyperhydricity라고 규정짓고 解剖學的으로는 細胞間隙이 커지며, 非正常的인 혹은 줄어들은 관다발이 형성되고 잎은 冊床組織의 層수가 줄어듬과 表皮의 蠟層도 얇아진다는 報告는 본 실험과 같은 結果를 나타내고 있다.

<표 1>은 cytokinin의 處理시 거베라의 透明化發生 정도를 나타낸 것으로 kinetin에서는 透明化發生정도는 감소하였지만 個體發生數와 生體重은 BA와 fulmet 보다 훨씬 감소하였다. 특히, BA 2.0mg/l 處理와 fulmet 5.0μg/l 處理에서는 個體數와 生體重在 가장 높았고 cytokinin류의 濃度증가는 세가지 供試藥劑 모두에서 透明化發生정도가 증가하였다.

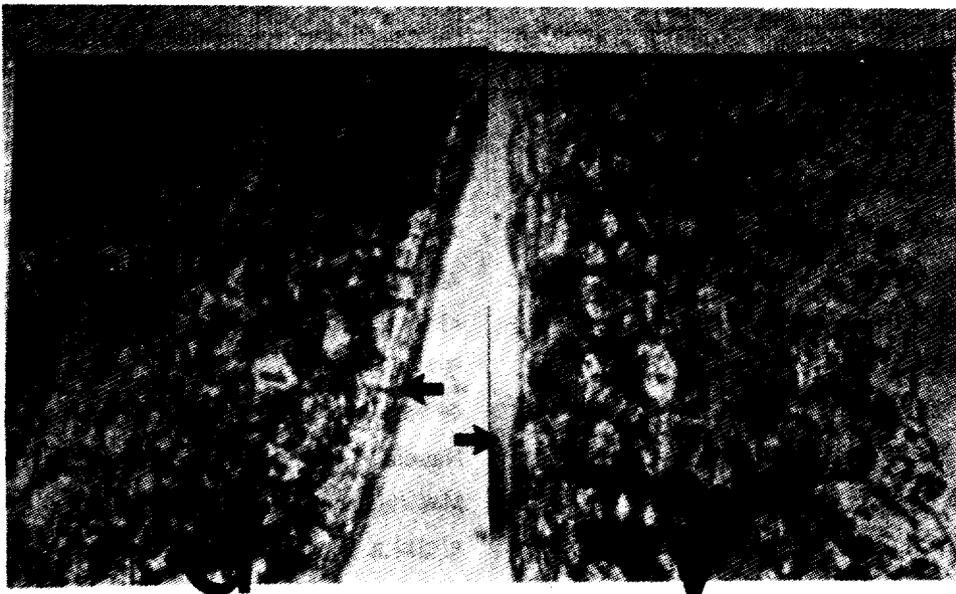


Fig. 2. Transversal sections of glaucous (G) and vitrified (V) leaves of *Gerbera jamesonii* 'Sonia' plants in vitro. Arrows indicate adaxial surface of the leaves. Magnification : 10×40.

Table 1. Effect of cytokinins on plantlet production through shoot tip culture of *Gerbera jamesonii* 'Sonia' after 8 weeks in culture.

Cytokinin (mg/l)	No. Shoots /explant	Mean shoot length (cm)	Fresh wt. /explant (mg)	Vitrification intensity <sup>a</sup>
Control	1.0 g <sup>b</sup>	1.6 e	12.0 i	-
kintin 0.5	2.2 f	2.4 d	18.8 h	-
1.0	2.7 e	2.7 cd	25.4 g	+
2.0	3.3 de	3.0 bc	32.3 f	++
5.0	3.5 d	3.8 a	30.7 f	++
10.0	3.3 de	3.5 ab	24.7 g	++
BA 0.5	3.5 d	2.2 d	32.3 f	+
1.0	3.7 d	2.2 d	42.6 d	++
2.0	5.8 b	3.9 a	60.8 a	+++
5.0	4.6 c	3.2 b	52.3 b	+++
10.0	4.2 cd	2.8 b	48.4 c	+++
Fulmet 1.0	2.8 e	2.3 d	20.2 h	++
( $\mu$ g/l) 5.0	6.5 a	3.5 ab	48.8 c	++
10.0	4.2 cd	3.0 bc	40.3 d	++
20.0	3.8 d	3.2b	36.5 e	+++
50.0	3.0 e	3.6a	30.1 f	+++

<sup>a</sup> -none, +below 30%, ++ below 50%, +++ high 60%

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

Williams와 Taji<sup>31)</sup> 그리고 Dillen과 Buysens<sup>4)</sup>는 과다한 生長調節物質 특히, cytokinin 류의 量的인 증가는 안개초와 *Olearia*에서 透明化를 촉진시킨다고 하여 본 실험과 같은 경향을 나타내었다.

<표 2>는 BA 2mg/l과 fulmet 5mg/l의 水準을 기본으로 하여 NAA와의 혼용處理에 의한 結果를 관찰한 것으로 新草發生과 生體重 모두 NAA와 混用된 cytokinin 處理效果가 우수하였으며 NAA의 濃도가 0.5mg/l 일때 生體重은 증가하였으나 個體 發生數는 감소현상을 보이는 반면, 新草의 길이와 透明和現狀은 증

가함을 보였다. 이는, 韓<sup>7)</sup>의 안개초 培養의 경우에서 BA의 濃도가 증가함으로 生體重이 감소하는 현상과 유사한 結果를 보이고 있어, 어느 정도의 濃도까지는 生體重과 新草發生이 증가되는 반면, 그 이상이나 이하의 濃도에서는 오히려 감소되는 현상을 보였다. 한편, Natalia 등<sup>15)</sup>은 거베라의 組織培養에서 0.02 $\mu$ M의 thidiazuron 처리에서 透明化防止 효과가 있었다고 하였고 또한, 透明和發生 원인으로서 培養容器內的 過濕條件이 細胞內的 lignin과 cellulose의 結晶을 유발하여 水分의 擴散이 촉진되어 새로 분열되는 細胞조차도

Table 2. Effect of cytokinins and auxin in combination on growth response of *Gerbera jamesonii* 'Sonia' after 4 weeks in culture.

Treatment	No. Shoots /explant	Mean shoot length (cm)	Fresh wt. /explant (mg)	Vitrification intensity <sup>1)</sup>
NAA 0.2mg/l				
+BA 1.0mg/l	5.2 de <sup>2)</sup>	3.2 c	657.5 c	+
2.0	9.8 a	3.8 b	824.2 a	+++
5.0	6.0 c	4.2 ab	736.3 b	+++
Fulmet 5.0μg/l	7.8 b	3.6 b	812.7 a	++
10.0	7.5 b	3.5 bc	523.6 d	+++
20.0	5.3 de	3.9 b	554.2 d	+++
NAA 0.5mg/l				
+BA 1.0mg/l	3.6 ef	3.5 bc	732.4 b	++
2.0	5.7 cd	3.5 bc	844.6 a	+++
5.0	6.2 c	4.5 a	812.3 a	+++
Fulmet 5.0μg/l	5.0 de	3.6 b	825.6 a	++
10.0	5.5 cd	4.0 ab	834.3 a	++
20.0	4.8 de	4.2 ab	756.4 b	+++

<sup>1)</sup> -none, +below 30%, ++ below 50%, +++ high 60%

<sup>2)</sup> Mean separation within columns by Duncan's multiple range test 5% level.

vacuolate되기 때문이라고 하였다.

## 2. 培地 支持物과 糖濃度差에 依한 透明化發生과 葉綠素含量

〈표 3〉은 培地の 물리적 堅固度の 差異에 대한 生長反應과 透明和現狀을 관찰한 結果이다. Gelite나 寒天의 添加量을 정상보다 2배로 하였을때 透明化懸賞이 감소하였으나 新草發生과 生體重은 감소되는 傾向을 보였다.

Pasqualetto<sup>29)</sup> 등은 사과의 組織培養에서 支持物의 濃度を 상대적으로 증가시키면 透明化는 방지되지만 生長과 個體分化率이 감소한다고 하여 본 實驗과 유사한 結果를 나타내어 高濃度の 生長調節物質 첨가에서도 透明化防

止 效果가 있음을 報告한 사례들을 많이 찾아 볼 수가 있다.<sup>22, 26)</sup>

〈표 4〉는 糖濃度の 증가에 따른 生育반응과 透明化發生정도를 觀察한 것으로 적정량의 濃度 2~3% 첨가가 가장 좋으나 그 이상 濃도가 증가할수록 生體重과 透明化發生비율이 증가하는 현상을 보였다.

이같은 사실은 金<sup>13)</sup> 등의 카네이션을 대상으로 한 糖濃度の 實驗결과 糖濃도가 2~5%인 高濃度處理로 인한 生育差나 透明化苗 발생에 는 큰 차이가 없었다고 報告하였는데 이는 培地内の 유기물 즉 energy원으로서의 糖濃度 증가에 따라 透明化現狀이 증가된다고 하는 報告<sup>29)</sup>와는 다르지만 本 實驗의 結果와는 일

Table 3. Vitrification response of two type gelling agent on *Gerbera jamesonii* 'Sonia' after 4 weeks in culture.

Treatment	Gelling agent (g/l)	No. Shoots /explant	Fresh wt. /explant (mg)	Vitrification intensity <sup>a)</sup>
BA 2mg/l +NAA 0.2mg	Gelite 1.25	8.4 b <sup>b)</sup>	810.0 a	+++
	1.50	8.2 bc	775.6 b	++
	2.00	7.9 bc	722.3 c	++
	Agar 7.0	9.8 a	821.2 a	+++
	10.0	7.6 cd	800.7 ab	+++
	13.0	6.9 de	692.4 d	++
Fulmet 5μg/l +NAA 0.2mg	Gelite 1.25	7.2 b	758.3 b	+++
	1.50	6.4 e	708.6 cd	+++
	2.00	5.5 f	532.4 f	++
	Agar 7.0	7.8 c	812.7 a	+++
	10.0	6.6 e	637.4 e	+++
	13.0	6.3 e	511.6 f	++

<sup>a)</sup> -none, +below 30%, ++ below 50%, +++ high 60%

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

Table 4. Vitrification response by various sucrose concentration on *Gerbera jamesonii* 'Sonia' after 4 weeks in culture.

Treatment	Sucrose (g/l)	No. Shoots /explant	Fresh wt. /explant (mg)	Vitrification intensity <sup>a)</sup>
BA 2mg/l +NAA 0.2mg/l	10.0	6.4 e <sup>b)</sup>	535.4 e	+
	20.0	9.5 a	801.6 c	++
	30.0	9.8 a	824.2 c	+++
	50.0	8.3 b	936.8 a	+++
Fulmet 5μg/l +NAA 0.2mg/l	10.0	5.3 f	426.5 f	+
	20.0	7.4 cd	715.8 d	++
	30.0	7.8 c	812.7 c	+++
	50.0	7.2 d	893.6 b	+++

<sup>a)</sup> -none, +below 30%, ++ below 50%, +++ high 60%

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

치함을 보여 이러한 현상은 該當植物의 특성 는 糖濃度가 2~3% 程度로 첨가함이 本 實驗에 기인되는 것이 아닌가 생각되며 거베라에 의 결과 좋을 것으로 판단된다.

〈표 5〉는 糖濃도와 透明化發生程度를 나타낸 것으로, 糖濃도가 높아짐으로 透明化現狀이 증가하는 추세로 葉綠素의 含量 또한, 낮아지는 경향을 보였다. 이는 Zimmemann과 Cobb<sup>33)</sup>가 *Petunia*를 대상으로 gelite와 糖濃도를 變量처리한 研究에서와 같이 糖濃도가 높아지면 透明化가 증가하며, 高濃度の gelite 처리에서 透明化가 防止되어 葉綠素의 含量도 正常苗가 透明化된 苗보다 약 4배가량 높다고 報告한 결과는 일치하였다.

이로서, 거베라는 生長調節物質로서 auxin과 cytokinin류 그리고 에너지 供給源으로서 糖이 과다하게 첨가되거나, 培地의 堅固度가 약할 때 즉, 培地의 水分濃도가 과다하게 되면 培養苗의 透明化가 촉진되며 透明化 자체가 葉肉組織內的 葉綠素含量을 저하시키고 苗가

徒長되는 것으로 판단되어 auxin류의 濃도와 處理時期등 세밀한 檢討 실험이 요구 되어진다.

### 3. Uniconazole 處理에 依한 透明化發生 防止

〈표 6〉은 uniconazole 處理시 發生하는 透明化程度를 나타낸 것으로 cytokinin류에서는 fulmet 보다 BA 處理가 新草 發生數에서 약간 증가하였으며 uniconazole 濃도는 0.5mg/l 濃도가 草長도 짧아지면서 透明化防止에 効果적이었다. Uniconazole의 土壤灌注로서 Wang과 Gregg<sup>28)</sup>가 무궁화의 節間伸長을 抑制하는 결과를 報告한 것과, Chin<sup>1)</sup>이 아스파라거스의 組織培養시 矮化劑의 일종인 Ancymidol을 處理하므로 新草發生과 生長 그리고 뿌리의 發

Table 5. Comparison of chlorophyll contents affected by gelling agent and sucrose concentration on *Gerbera jamesonii* 'Sonia' after 4 weeks in culture.

Treatment	Gelling agent (g/l)	Sucrose (g/l)	Chlorophyll ( $\mu\text{g/g}$ FW)	Vitrification intensity <sup>a)</sup>
BA 2mg/l +NAA 0.2mg	Gelite 2.0	2	332.74	++
		3	274.56	+++
		5	213.25	+++
	Agar 13.0	2	364.37	++
		3	301.24	++
		5	236.28	+++
Fulmet 5 $\mu\text{g}$ /l +NAA 0.2mg	Gelite 2.0	2	302.71	++
		3	243.04	+++
		5	183.22	+++
	Agar 13.0	2	323.83	++
		3	274.38	+++
		5	194.36	+++

<sup>a)</sup> -none, +below 30%, ++ below 50%, +++ high 60%

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

Table 6. Effect of uniconazole for the plant production and preventing vitrification on *Gerbera jamesonii* 'Sonia' after 4 weeks in culture.

Treatment	Uniconazole (mg/l)	No. Shoots /explant	Shoot length /explant (cm)	Vitrification intensity <sup>a)</sup>
BA 2mg/l +NAA 0.2mg/l	0	9.8 a <sup>b)</sup>	3.2 a	++
	0.1	9.5 a	3.0 b	+
	0.5	9.0 b	2.4 c	-
	1.0	7.4 c	0.7 d	-
Fulmet 5μg/l +NAA 0.2mg/l	0	7.8 c	3.6 a	++
	0.1	7.5 c	3.2 a	+
	0.5	8.8 b	2.2 c	-
	1.0	3.4 d	0.8 d	-

<sup>a)</sup> -none, +below 30%, ++ below 50%, +++ high 60%

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

\* The medium for this experiment were supplemented with 0.7% agar and 3% sucrose in MS.

育을 촉진시킨 報告와 Mcdaniel<sup>14)</sup> 등이 植物矮化劑 處理로 포인세티아의 줄기組織과 原形細胞를 관찰했을 때에 生育이 停止된다고 보고 하여, 이같은 사실들을 종합해 볼 때에 新種의 植物矮化劑로서의 uniconazole은 培養植物體內에서 GA의 合成을 抑制하고 ent-kaurene, ent-kauranol 그리고, ent-kauranal 등의 酸化를 방지하므로써 培養苗의 透明化를 더욱 抑制하는 作用力을 갖지 않나 생각되어 앞으로 많은 植物을 대상으로 한 폭넓은 適用試驗이 요구된다 하겠다. <표 7>과 <표 8>은 각각 透明化 促進物質로 밝혀진 高濃度の 糖과 低濃度の 寒天濃도에 대하여서도 uniconazole이 어떻게 透明化를 방지하는가를 알아보기 위하여 실험한 것이다.

Uniconazole이 處理되었을 때 5% 수준의 糖濃度에서는 草長의 길이가 약간 길어지고 葉色이 黃化하는 정도의 透明化初期症勢가 나타

난 것으로 보아서 0.5mg/l의 uniconazole 處理가 효과적이었다. 또한 寒天의 濃度 0.7% 에 서와 같이 支持物의 堅固도가 낮은 상태에서도 新草發生에 관계없이 透明化現狀이 방지된 것은 高價의 寒天 값을 節減한다는 側面에서 培養費用을 節減할 수 있는 큰 利點이 있어 uniconazole의 處理效果는 거베라 組織培養에 있어서는 매우 효과적이라고 생각된다.

<표 9>는 uniconazole 處理 有無와 어느정도 苗의 透明化發生을 抑制하는 것으로 나타난 糖과 寒天의 濃度別 葉綠素의 變化를 관찰한 것이다. 寒天의 低濃도와 糖의 高濃度 添加處理에서는 苗의 葉綠素 含量이 가장 감소하였고, 寒天의 高濃도와 糖의 低濃度 透明化가 발생하였다. 그러나, 寒天과 糖의 高低濃度에는 관계없이 矮化劑 0.5mg/l uniconazole 處理는 葉綠素含量이 550μg/g FW 이상 함유되어 植物矮化劑 uniconazole 處理는 거베라

Table 7. Preventing effect of vitrification with uniconazole and varied sucrose concentration on *Gerbera jamesonii* 'Sonia' after 4 weeks in culture.

Treatment	Uniconazole (mg/l)	Sucrose (g/l)	No. Shoots /explant	Shoot length /explant (cm)	Vitrification intensity <sup>1)</sup>
BA 2mg/l +NAA 0.2mg/l	0.5	10.0	3.2 d <sup>2)</sup>	2.2 bc	-
		20.0	5.8 c	2.2 bc	-
		30.0	9.0 a	2.4 abc	-
		50.0	8.2 b	2.7 a	+
Fulmet 5μg/l +NAA 0.2mg/l	0.5	10.0	3.8 d	2.0 c	-
		20.0	5.3 c	2.2 c	-
		30.0	8.8 ab	2.2 c	-
		50.0	8.3 b	2.6 ab	+

<sup>1)</sup> -none, +below 30%, ++ below 50%, +++ high 60%

<sup>2)</sup> Mean separation within columns by Duncan's multiple range test 5% level.

\* The medium for this experiment were supplimented with 0.7% agar sucrose in MS.

Table 8. Preventing effect of vitrification with uniconazole and varied gelling agent treatment on *Gerbera jamesonii* 'Sonia' after 4 weeks in culture.

Treatment	Uniconazole (mg/l)	Gelling agent (g/l)	No. Shoots /explant	Shoot length /explant (cm)	Vitrification intensity <sup>1)</sup>
BA 2mg/l +NAA 0.2mg/l	0.5	Agar 7.0	9.0 a <sup>2)</sup>	2.4 a	-
		10.0	7.5 c	2.2 a	-
		13.0	6.8 d	2.2 a	-
Fulmet 5μg/l +NAA 0.2mg/l	0.5	Agar 7.0	8.8 a	2.2 a	-
		10.0	8.2 b	2.0 a	-
		13.0	7.3 cd	2.0 a	-

<sup>1)</sup> -none, +below 30%, ++ below 50%, +++ high 60%

<sup>2)</sup> Mean separation within columns by Duncan's multiple range test 5% level.

\* The medium for this experiment were supplimented with 3% sucrose in MS.

의 透明化防止에 큰 효과를 나타내었다.

아스파라거스의 培養에서 ancymidol 處理는 新草생산과 callus 유기에 효과적이며 특히, 굵은 뿌리의 발생도 유도되어 苗의 透明化防

止 뿐만 아니라 土壤移植을 위한 發根효과도 양호하였다는 報告<sup>1)</sup>와 本 研究 結果가 일치되고 있음을 알 수 있었지만 金<sup>13)</sup> 등과 Zimmermann과 Cobb<sup>14)</sup>의 結果에서와 같이 糖

Table 9. Comparison of chlorophyll contents between normal and vitreous leaf tissue affected by uniconazole on *Gerbera* after 4 weeks in culture.

Treatment	Agar (g/l)	Sucrose (g/l)	Uniconazole (mg/l)	Chlorophyll ( $\mu\text{g/g}$ FW)
BA 2mg/l+NAA 0.2mg/l	7	30	0.5	546.35
			none	154.27
	7	50	0.5	513.43
			none	107.43
	13	30	0.5	622.46
			none	236.47
13	50	0.5	582.63	
		none	183.54	

과 寒天의 量的인 변화에 의한 透明化防止效果와 비교할 때에는 오히려, 그러한 효과가 뚜렷치 못하고 矮化劑로서의 uniconazole 處理가 더욱 큰 요인으로 作用하고 있음을 알 수가 있었다. 한편, 本 實驗結果에는 表示되지 않았지만 藥劑處理의 殘留效果(carry over effect)로서 土壤에 植栽하여 開花할 때까지도 植物體가 矮化되는 현상은 없었으며 培養과정에서도 8週日이 경과되었을때 新草의 草長이 길어지는 경향을 나타내어 殘留效果가 6週 이내 임을 알 수가 있었다. 또한 거베라의 培養에서는 幼苗의 早期 老化현상 때문에 係代培養期間임을 4週까지 한정해야만 했지만 uniconazole을 處理했을때에는 培養後 8週가 경과되었어도 老化현상이 관찰되지 않았던 것으로 나타나서 長期培養이 가능함을 발견할 수 있었다.

#### 4. Uniconazole과 AgNO<sub>3</sub> 濃度別 處理時 Ethylene gas 發生抑制效果

<표 10>은 透明化發生 원인이 培養植物體가

Table 10. Ethylene generation during subculture for *Gerbera* plantlets as affected by AgNO<sub>3</sub> and growth regulator.

Treatment	AgNO <sub>3</sub> (mg/l)	Ethylene (ppm)
BA 2mg/l+NAA 0.2mg/l	none	756.4
BA 2mg/l+NAA 0.2mg/l+Uni. 0.5mg/l	none	85.8
	1	87.6
	3	85.4
	5	78.9
	7	79.7
Fulmet 5 $\mu\text{g}$ /l+NAA 0.2mg/l	none	683.7
	none	82.7
Fulmet 5 $\mu\text{g}$ /l+NAA 0.2mg/l+Uni. 0.5mg/l	1	80.5
	3	80.8
	5	75.4
	7	72.8
	7	72.8
NAA 0.2mg/l+AC 2g/l	none	354.7
	1	195.7
	3	182.8
	5	180.3
	7	164.5

발생하는 ethylene gas의 발생에 의한 것인지 그리고 透明化防止효과가 뚜렷한 uniconazole 이 處理되었을 때, gas 발생은 어떠한지를 알기 위하여 AgNO<sub>3</sub> 와의 병행 처리시에 그 결과를 관찰한 것이다. Uniconazole과 AgNO<sub>3</sub>을 培地에 첨가하지 않은 상태에서는 ethylene gas의 발생량이 증가하였고 BA 處理보다는 fulmet 處理區에서 ethylene gas의 발생량이 100ppm 정도가 더 감소하였으며 또한, 活性炭 處理區에서도 400ppm 정도가 더 감소하였다. 또한 Uniconazole이 處理되면 AgNO<sub>3</sub>의 첨가 없이도 ethylene gas 발생량이 9배 이하로 감소되어 AgNO<sub>3</sub>와 별 차이가 없었다.

Reid<sup>25)</sup> 등은 장미식 切花 壽命연장에 AgNO<sub>3</sub>의 효과를 보고하여 Ag<sup>+</sup>이온이 植物細胞內에서 ethylene gas가 生合成되는 場所에서 合成 中間段階를 차단하므로 인해서 老化가 방지된다고 하였으며, Williams<sup>39)</sup> 등은 배추의 캘러스培養에서 1~10mg/l의 AgNO<sub>3</sub>가 첨가하였을 때에 長期 培養의 가능성과 함께 新草의 發生촉진을 소개하였다.

한편, Dillen과 Buysens<sup>4)</sup>는 培養植物體가 발생하는 ethylene gas가 苗의 透明化를 촉진

하는 주원인이므로 容器內의 空氣를 換氣시켜 주는 것이 좋다고 報告한 바 있고 그 외에도 ethylene gas 發生抑制에 대한 AgNO<sub>3</sub>의 효과는 數種의 植物에서도 報告된바 있다.

본 實驗의 결과 uniconazole 處理區에서 ethylene gas의 발생량이 감소한 것은 Reid 등<sup>25)</sup>의 AgNO<sub>3</sub> 處理결과와 마찬가지로 uniconazole 處理 자체가 培養植物體의 ethylene gas 發生을 차단하는 것으로 보이며, 培地의 支持物濃度 즉, 과다한 水分에 의한 透明化發生과는 무관하다고 할 수가 있다.

또한, 活性炭處理區에서도 ethylene gas 量이 無處理의 절반 수준으로 나타난 것은 活性炭 자체의 기능인 gas 흡수력과 관계가 있었던 것으로 보여진다.

## 5. 培養苗의 發根을 爲한 生長調節物質 Fulmet의 利用

끝으로 培養苗에서 얻어진 幼苗의 發根에 대한 결과는 <표 11>에서 보는 바와 같다 (그림 3). 앞서 新草의 發生促進效果로서의 BA와 fulmet를 계속적으로 비교한 것은 fulmet가 發根촉진에도 효과가 크며 (그림 3과 표

Table 11. Root morphology as affected by several chemicals on *Gerbera* after 4 weeks in culture.

Treatment	Root			Shoots /explant	Secondary roots <sup>a)</sup>
	number (ea)	dia. (mm)	length (cm)		
NAA 0.2ppm	12.4 a <sup>b)</sup>	1.3 a	1.54 c	1.4 b	no
AC 2mg/l	7.8 b	0.2 a	4.95 a	1.8 a	no
Fulmet 5μg/l	5.2 c	1.1 b	2.57 b	1.3 b	yes

<sup>a)</sup> -none, +below 30%, ++ below 50%, +++ high 60%

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

\* The medium for this experiment were supplemented with 0.7% agar and 3% sucrose in MS.

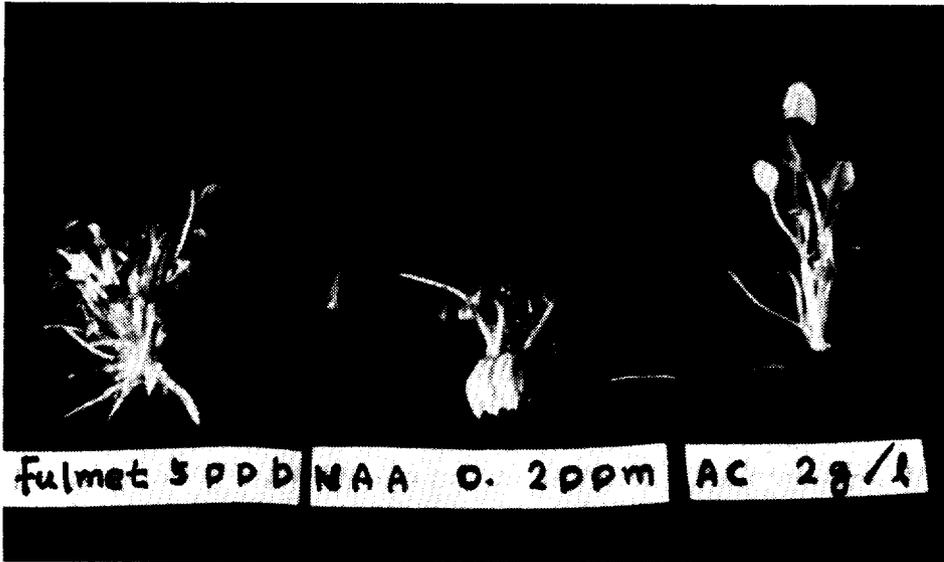


Fig. 3. Comparison of root formation with several chemical treatments on *Gerbera jamesonii* 'Sonia' after 4 weeks in culture.

11) 굵은 뿌리와 次根의 발생에 효과적이기 때문에 苗의 土壤移植性이 가장 좋다고 생각되어진다. 최근에, 新種 cytokinin 류로는 thidiazuron과 Fulmet를 들 수가 있으며 이들의 活性 또한, 기존의 BA 보다 매우 우수하여 新草 발생이 어려웠던 木本類의 繁殖에도 효과적임이 報告된 바 있다.<sup>1), 9), 32)</sup>

Preece 등<sup>23)</sup>은 銀단풍의 組織培養에서 10 $\mu$ M의 thidiazuron 處理에서 다수의 新草發生 효과를 나타내어 phenylurea 化合物이 특별한 cytokinin의 活性을 갖는다고 한바, 本 實驗에 사용된 fulmet 또한 phenylurea 化合物인 점을 감안할 때에 新種 cytokinin류로서 그 효과가 크다고 생각된다. 또한, cytokinin의 活性을 가지면서도 auxin의 活性 즉, 發根을 촉진하는 효과는 더욱 fulmet의 價値가 크다고 인정되어 앞으로 많은 종류의 植物에서도 동일한 효과를 갖는지 檢討되어 그 利用性을 넓혀

야 할 것으로 생각된다.

지금까지 檢討된 모든 實驗의 결과를 要約해 볼때, 거베라에서 다량의 新草를 발생 시키기 위해서는 2mg/l BA와 0.2mg/l의 NAA가 기본 生長調節物質로 처리되어야 하고 또한, 透明化現狀을 방지하기 위해서는 0.5mg/l uniconazole을 첨가하는 것이 매우 효과적이었으며, 마지막으로 土壤移植이 가능하도록 5 $\mu$ g/l fulmet 處理를 하므로서 우량한 發根과 함께 다수의 新草發生 효과까지도 얻을 수 있었다.

## 摘 要

*In vitro* 거베라 (*Gerbera jamesonii*)의 透明化를 방지하고 發根을 촉진하기 위하여 'Sonia' 品種을 대상으로 적정 生長調節物質의 종류와 농도 그리고, 矮化劑로서의 Uniconazole과 發根

劑로서의 Fulmet 處理 效果를 檢討하였다.

1. 生長點培養으로부터의 幼苗生産에는 2mg/l BA와 0.2mg/l NAA의 조합과 그리고, 5.0μg/l Fulmet와 0.2mg/l NAA 조합에서 좋았으나 cytokinin의 處理濃度가 높아질수록 透明化 현상이 심하였다.

2. 高濃度의 支持物의 첨가는 幼苗의 透明化를 감소시킨 반면, 고농도 糖의 첨가는 透明化를 촉진시켰지만, 이러한 處理가 透明化를 방지하는데에는 主導的인 역할을 하지 못하였다.

3. 植物矮化劑로서 0.5mg/l Uniconazole 處理에서는 적합한 新草發生과 透明化防止 效果

를 얻을 수 있었다.

4. 高濃度의 糖과 低濃度의 支持物處理 즉, 透明化現狀을 촉진하는 조건에서도 0.5mg/l의 Uniconazole이 處理되면 透明化防止효과가 뚜렷하고 특히, 葉綠素의 含量도 5배 정도 증가하였다.

5. 培養器内에서 AgNO<sub>3</sub>를 處理하였을 때에는 無處理 756.4ppm과 비교할 때에 80ppm 정도로 감소하지만 Uniconazole 처리시의 85ppm과 별 차이를 나타내지 못하였다.

6. 幼苗의 發根에는 0.2mg/l NAA 處理가 좋았으나 5μg/l Fulmet 處理는 新草의 發生과 더불어 2次根까지 양호하게 발생되었다.

## 引 用 文 獻

1. Chin, C. K. 1982. Promotion of shoot and root formation in *Asparagus in vitro* by ancymidol. HortSci. 17(4) : 590-591.
2. 鄭桂泳, 李宗錫, 金映來, 1986. Silver nitrate와 Silver thiosulfate가 切花 카네이션의 壽命과 老化에 미치는 影響. 韓園誌 27(3) : 275-282.
3. Debergh, P., J. A. Christie, D. Cohen, B. Grout, S. von Arnold, R. Zimmermann, and M. Ziv. 1992. Reconsideration of the term vitrification as used in micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 30 : 135-140.
4. Dillen, W. and S. Buysens. 1989. A simple technique to overcome vitrification in *Gypsophila paniculata* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 19 : 181-188.
5. Elaine F. S., A. V. Roberts and J. Mottley. 1990. The Preparation *in vitro* of *Chrysanthemum* for transplanation to soil. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 21 : 141-145.
6. Gavinlertvatana, P., D. E. Read, and H. F. Wilkins. 1980. Control of ethylene synthesis and actions by silver nitrate and rhizobitoxine in *Petunia* leaf section cultured *in vitro*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105(3) : 307-309.
7. 韓鳳熙. 1990. 頂端培養에 의한 안개초 (*Gypsophila paniculata* L.)의 大量繁殖과 透明化防止에 관한 研究. 忠北大學校 農學 博士學位論文

8. Hyndman, S. E., D. M. Hasegawa and R. A. Bressan. 1982. Stimulation of root initiation from cultured rose roots through the use of reduced concentrations of mineral salts. Hort-Sci. 17(1) : 82-83.
9. Jones, O. P. 1976. Effects of phloridizin and phloroglucinol on apple shoots. Nature 262 : 392-393.
10. Kevers, C., M. Coumans, M. F. Coumans-Gilles and Th. Gaspar. 1984. physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. Physiol. Plant. 61 : 69-74.
11. 金圭元, 邊美順, 1985. 莖頂培養에 의한 카네이션 無病柱의 獲得과 大量增殖. 韓園誌 26(1) : 76-82.
12. 金圭元, 邊美順, 1988. 카네이션 器內培養時 發生하는 強健 및 透明苗의 生理 및 形態의 特性. 韓園誌 29(3) : 216-223.
13. 金圭元, 邊美順, 1988. 器內培養 카네이션의 透明化防止를 위한 ABA 및 寒天의 效果. 韓園誌 29(3) : 208-215.
14. Mcdaniel, G. I., E. T. Graham, and K. R. Maleug. 1990. Alternation of poinsettia stem anatomy by growth-retarding chemicals. HortSci. 25(4) : 433-435.
15. Natalia, J., I. G. Irena, R. G. Alexandrova, B. G. Butenko, and V. D Elena. 1991. Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plant culcured *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 27 : 149-154.
16. 농림수산부, 1991. '90 花卉産業 現況. pp. 41-73.
17. 白基燁, 李旺榮, 黃周光, 趙永換. 1988. 배추 頂端培養時 NaCl과 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 添加가 生長과 代謝物質 含量에 미치는 影響. 韓園誌 29 : 159-170.
18. 백기엽, 오문목, 최주건, 1985. 組織培養에 의한 코르딜리네와 스킨답스의 大量繁殖. 韓園誌 26(1) : 83-92.
19. Pasqualetto, P. L., R. H. Zimmermann, and I. Fordham. 1986. Gelling agent and growth regulation effects on shoot vitrification of 'Gala' aApple *in vitro*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 111(6) : 976-980.
20. Pasqualetto, P. L., R. H. Zimmermann, and I. Fordham. 1988. The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 14 : 31-40.
21. Perl, A., D. Aviv, and E. Galun. 1988. Ethylene and *in vitro* culture of potato : suppression of ethylene generation vastly improves protoplast yield, planting efficiency and transient expression of an alien gene. Plant Cell Reports 7 : 403-406.
22. Preece, J. E. 1987. Treatment of the stock plant with plant growth

- regulators to improve propagation success. HortSci. 22(5) : 754-759.
23. Preece, J. C., C. A. Huetterman, W. C. Ashby, and P. L. Roth. 1991. Micro and cutting propagation of silver maple I. Results with adult and juvenile propagules. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116(1) : 142-148.
  24. Reed, D. W. and H. B. Tukey, Jr. 1982. Light intensity and temperature effects on epicuticular wax morphology and brussels sprouts leaf culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107(3) : 417-420.
  25. Reid, M. S., R. Y. Evans, and L. D. Dodge. 1989. Ethylene and silver thiosulfate opening of cut rose flowers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 114(3) : 436-440.
  26. Taji, A. M & R. R. Williams. 1989. *In vitro* propagation of *Cianthus formosus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 16 : 61-66.
  27. Turner, S. R. and S. Singha. 1990. Vitrification of crabapple, pear, and Geum, on Gellan Gum, solidified culture medium. HortSci. 25(12) : 1648-1050.
  28. Wang, Y. T. and L. L. Gregg. 1989. Uniconazole affects vegetatively growth, folwering, and stem anatomy of *Hibiscus*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 114(6) : 927-932.
  29. Werner, E. M. and A. A. Boe. 1980. *In vitro* propagation of Mailling-7 apple rootstocks. HortSci. 15 : 509-510.
  30. Williams, J., D. A. C. Pink. and N. L. Biddington. 1990. Effect of silver nitrate on long-term culture and regeneration of callus from *Brassica oleracea var. gemmifera*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 21 : 61-66.
  31. Williams, R. R, and A. M. Taji. 1991. Effcet of temperature, gel concentration and cytokinins on vitrification of *Olearia microdisca*(J.M. Blask) *in vitro* shoot culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 26 : 1-6.
  32. Zimmermann, R. H. and O. C. Broome. 1981. Phloroglucinol and *in vitro* rooting of apple cultivar cuttings. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106(5) : 648-652.
  33. Zimmermann, T. W. and Cobb. 1989. Vitrification and soluble carbohydrate levels in *Petunia* leaves as influenced by media gelite and sucrose concentrations. Plant Cell Reports. 8 : 358-360.
  34. Ziv, N., G. Meir and A. H. Halevy. 1983. Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2 : 55-65.