碩 士 學 位 論 文

黃金夏橘의 大量繁殖을 爲한 茎頂培養에 關한 硏究

Studies on the mass propagation of *Citrus natsudaidai* CV. 'Hwang Kum' by shoot tip culture.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

濟州大學校大學院

園藝學科

全 昇 鍾

1984年 12月 日

認　　准　　書

碩 士 學 位 論 文

黃金夏橘의 大量繁殖을 爲한 莖頂培養에 關한 硏究

Studies on the mass propagation of *Citrus natsudaidai* CV. 'Hwang kum' by shoot tip culture.

指導敎授　蘇　寅　燮

이　論文을　農學碩士學位　論文으로　提出함.

1984年　　12月　　日

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

濟州大學校 大學院

園藝學科

全　　昇　　鍾

위　農學碩士學位　論文을　認准함.

1984年　　12月　　日

委 員 長 : _____

委　　員 : _____

委　　員 : _____

目　　次

Summary ····· 2

Ⅰ. 緖　　論 ····· 3

Ⅱ. 硏　究　史 ····· 4

Ⅲ. 材料 및 方法 ····· 8

Ⅳ. 結果 및 考察 ····· 13

摘　　要 ····· 23

參　考　文　獻 ····· 25

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Summary

In order to establish the shoot tip culture method for the mass propagation of 'Hwang Kum Ha Kyul' (*Citrus natsudaidai*) the effects of sterilizing methods and various combination of growth requlators were tested on the shooting and rooting of the explant in MS medium.

The results obtained are summarized as fallows;

1. The least contamination and browning die-back occured in the shoot tips with 10% Yuhanrox added 1% Tween-20 as surfectant.

2. The best shoot multiplication was achieved in MS medium added BA 10㎎/ℓ alone, and 5 shoots were normally obtained from one explant.

3. Most shoot tips survived when collected on Aug. 20.

4. The effects of NAA on shooting, and of NAA, IBA, GA_3 and minimal medium on rooting were not recognized.

5. MS medium added with the activated carbon (2g/ℓ), was concluded to be the best rooting medium.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅰ. 緖　　論

오늘날 柑橘栽培에 있어서 品種을 更新하는 方法으로서는 高接更新과 改植의 두가지 方法이 있다. 高接更新 方法은 많은 人力과 virus傳染과 같은 問題點이 대두되고 있고 改植은 長期間을 通한 莫大한 投資가 뒤따라야하는 短點이 있다.

零細農家가 많은 本道의 立場에서는 형편상 高接更新法을 利用한 品種更新이 주로 實施되고 있는데, 이러한 점을 감안할때 早期에 優良苗木을 大量生產할 수 있는 技術體系의 確立이 切實히 要求되고 있는 實情이다.

外國에서는 數年前부터 組織培養을 通하여 사과, 포도, berry 等 몇몇 果樹의 大量繁殖은 물론 virus 無病株를 急速度로 增殖시키는 方法[18,19,20,41]을 開發하여 商業化段階에 들어가 있는 反面, 우리나라에서는 草本性植物類, 特히 一部 花卉類에서 組織培養을 利用한 大量增殖體系가 어느 程度 이루어져 있으나, 木本性植物 特히 果樹類에 있어서는 組織培養技術을 利用하여 苗木生產을 시도한 結果가 거의 없는 實情이다.

本實驗은 柑橘의 組織培養에 關한 基礎資料를 얻고자 實施하였으며, 特히 供試된 黃金夏橘[23]은 濟州試驗場에서 選拔해낸 夏橘 新系統으로서 夏橘에 比하여 品質이 優秀하기 때문에 早期 大量繁殖을 하기위한 效果的인 方法을 究明하고자 本實驗을 實施하였다.

제주대학교 중앙도서관

Ⅱ. 研 究 史

今世紀에 始作된 植物組織培養法은 그 技術에 있어서 뿐만아니라 應用分野에 있어서도 急速한 發展을 해온 結果 오늘날에는 植物生理學, 病理學, 育種學 및 植物繁殖學 等에 널리 利用되고 있으며 特히 새로운 學問으로 대두되고 있는 遺傳工學(genetic engineering)의 가장 必須的인 技術로서 評價받고 있다.[34]

이러한 組織培養法은 初期에는 繁殖이 매우 어려운 蘭類나 草本植物을 繁殖시키는데 使用되어 오다가 近來에 와서는 草本, 木本을 莫論하고 모든 植物의 大量繁殖手段으로 利用되고 있다.[5,16,31,42,47]

組織培養에 使用되는 培地의 組成은 여러 研究者들에 의해서 多樣하게 報告[29,31,44,46,50]되고 있으나, 1962年 T. Murashige와 F. Skoog[30]가 담배組織을 生物檢定(bioassay)하기 위하여 組成한 培地(Murashige and Skoog培地)가 가장 一般的인 基本培地로 使用되고 있으며, 1965年 Linsmaier와 Skoog[27]는 담배組織의 生物檢定(bioassay)을 通하여 培地에 있어서 有機物質(Organic elements)의 適定量을 報告하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

生長調節物에 있어서 auxin은 一般的으로 뿌리의 發生을 促進시킨다는 事實은 여러 學者들에 의해에 確認되었던 한편 눈(芽)의 發生에는 抑制的으로 作用한다는 것으로 알려져 왔다.[15,17] 한편 cytokinin은 細胞分裂을 促進시켜주고 切片組織의 分化를 調節한다고 하였는데 Lethan[26]은 低濃度의 Zeatin處理가 담배와 당근組織의 細胞分裂에 促進的이었다고 報告하였고, Skoog와 Miller[43]는 cytokinin - auxin 平衡의 變化가 植物의 生育相에 미

치는 影響을 調査한 結果 callus의 增殖을 위해서는 auxin의 存在가 必須的이지만 少量의 cytokinin과 混用하면 오히려 生育이 促進되며 auxin보다 cytokinin含量이 많으면 눈(芽)과 새순(shoot)이 發生된다. 反對로 cytokinin보다 auxin含量이 많으면 뿌리의 分化가 일어난다고 報告하였다. 이와같은 事實은 組織培養에 있어서 植物組織의 器管分化 즉 callus의 形成, 發根 新梢發生을 人爲的으로 調節하기가 容易하게 되었다.[35,36,39]

果樹에 있어서 組織培養法이 利用된 것은 不過 10여년전의 일로서 1967年 Pieniazek[37]는 사과 矮性台木의 莖頂을 培養하는데 있어서 低濃度의 benzyl adenine處理는 側芽의 發生을 誘發시키는 效果가 있다고 하였다. 1971年 Elliott[10]는 사과나무의 分裂組織(meristerm)部位를 組織 培養하여 新梢를 發生시켰으며, 같은 해에 Altman과 Goren[1]은 柑橘나무의 腋芽培養(bud culture)에서 abscisic acid가 側芽의 callus形成을 促進시키는 效果가 있었다고 報告하였다. 1972年 Roger等[40]은 사과나무의 腋芽를 生物檢定(bioassay)한 結果 餘他 生長促進物質의 含量에 比하여 相對的인 ABA(abscisic acid)의 濃度가 높기때문에 腋芽發育이 抑制됨을 報告하였다.

Jones[21]는 사과나무의 樹液의 成分을 分析하여 樹液中의 cytokinin 含量이 높을 때 新梢의 生長을 促進시킨다고 發表하였다.

이어서 1974年 Altman과 Goren[2]은 休眠中에 있는 柑橘나무의 눈(芽)을 組織培養한 結果, auxin類는 腋芽의 發芽를 遲延시켰으나 GA_3 및 cytokinin類는 눈(芽)의 發芽를 促進시켰으며, abscisic acid의 경우 高濃度에서는 callus形成에 抑制的이었으나 低濃度일때는 促進的이었고, 特히 ABA를 GA_3와 混用處理했을 때는 callus形成을 促進시켰다고 하여 生長抑制物

質로 알려진 ABA도 濃度의 變化에 따라서, 혹은 內生 hormone의 相對的인 量에 따라 分化를 抑制 또는 促進시키는 性質을 가지는 것으로 밝혀졌다.[3] 莖頂의 消毒方法에 있어서 1964年 Nekrosova[33]는 lemon의 莖頂을 昇汞水($Hgcl_2$) 0.1% 溶液에 4分間, 배나무의 莖頂은 6分間, 側芽는 20～25分間 沈漬시키는 것이 汚染率을 減少시키는데 效果的임을 報告하였고, 사과나무에서는 0.1% 溶液에 8分間 沈漬한 것이 가장 좋았다고 報告하였다.

1977年 Jones[20]는 사과나무 莖頂을 3～5 *cm*로 採取한 後 Manoxol wetter 0.01%에 1～2秒동안 沈漬한 後 sodium hypochlorite 3%溶液에 1分間 消毒하고 滅菌水로 3～4回 洗滌한 後에 MS 基本培地 위에서 24時間 經過시켜서 다시 sodium hypochlorite 10%溶液에 40分間 沈漬한 후 洗滌하여 置床한 것이 가장 效果的이었다고 報告하였다. 위에서 나타난 結果를 바탕으로 Jones等[21]은 사과 M_7 矮性台木을 組織培養해서 完全히 幼木을 만드는데 成功하였으며 1977年 Burger와 Banks[7] 그리고 Button과 Borman[8] washington Navel orange의 줄기를 組織培養해서 完全한 植物體를 獲得하였다고 報告하였다.

培地에 添加한 生長調節物質의 適定 濃度에 對해서는 1972年 Grinblat[13]가 calamondin(*Citrus madurensis L.*) 줄기를 組織培養하는데 있어서 MS培地에 BA 10*mg*/*ℓ* + NAA 0.1*mg*/*ℓ* + malt extract 500 *mg*/*ℓ* 을 添加한 培地에서 新梢가 發生되었고, 뿌리의 發生은 NAA 0.1*mg*/*ℓ* + malt extract 500*mg*/*ℓ* 添加培地에서 빈약하나마 發達하였다고 報告하였다. 1974年 Chaturvedi와 Mitra[9]도 新梢의 誘起에는 BA가, 發根에는 NAA가 效果的이었다고 報告하

였다.

한편 1980年 Wener[49]는 사과 M_7 矮性台木의 組織培養에서 MS基本培地의 half-strength에 BA 0.5㎎/ℓ를 添加한 培地에서 뿌리發生이 가장 좋았다고 報告하였으며, 1981年 Rugini와 Fontanazza[43]는 Olive나무의 組織培養에서 knop's 液의 多量原素와 Heller의 微量原素의 half-strength 培地에 NAA 2～4㎎/ℓ를 添加한 培地에서 發根시키는데 成功하였다. 그후 1982年 Kitto와 Young[24]은 Ms 培地에 BA 5㎎/ℓ 添加가 carizo citrange의 新梢 生長에 가장 效果的이었고, MS+NAA 1㎎/ℓ 處理에서 80%가 發根되었다고 報告하였다. 또한 Barles와 Skene[4]은 carizo citrange, trifoliate orange, cleopatra mandarin, rangpur lime, symon's sweet orange 等 5種類의 莖頂培養에서 MS基本 培地에 BA 10㎎/ℓ를 添加한 處理가 多量의 新梢를 發生하였으며, NAA 1㎎/ℓ를 添加한 培地에서 뿌리가 發生하여 土壤에 移植도 可能하였다고 報告하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

이와 같은 BA와 NAA의 效果는 Wood[52]가 Pecan을 材料로하여 實驗한 結果와, Hammerschlag[14]의 복숭아 實驗結果 및 Muriithi와 Waite[32]의 無花果의 組織培養實驗에서도 그러한 結果가 나타났다.

Ⅲ. 材料 및 方法

供試材料는 農村振興廳 濟州試驗場 西歸浦圃場에서 高接更新하여 栽培되고 있는 12年生 黃金夏橘[23] (*Citrus natsudaidai* cv. 'Hwang kum')을 供試하여 必要한 實驗에 따라서 莖頂을 採取하여 濟州試驗場 組織培養室內에서 實驗을 實施하였다.

培地는 Murashige and skoog[30] (以下 MS라 表示) 培地에 myo-inositol 100 ㎎/ℓ, nicotinic acid 0.5㎎/ℓ, glycine 2.0㎎/ℓ, thiamine Hcl 0.1㎎/ℓ, pyridoxin HCl 0.5㎎/ℓ에 sucrose 30g/ℓ, Difco-bactor agar 9 g/ℓ를 添加한 것을 基本培地로 使用하였으며, 培地의 酸度는 寒天을 넣기 전에 5.8로 調整하였고 培地의 殺菌은 1.2 Lb(㎏/㎠)에서 15分間 滅菌하였다. 生長調節物質處理로는 auxin類로는 NAA(naphtalene acetic acid)를, cytokinin 類로는 BA(6-benzyl amino purine)를 使用하여 適合한 濃度를 調査하였다. 培養의 條件은 培養溫度를 25℃±2℃, 光度는 1.5 KLux 前後가 되도록 調節하였으며, 白色螢光燈下에서 1日 16時間의 長日條件을 주었다. 그리고 莖頂의 길이는 1㎝로 切斷하여 100㎖들이 Gerber 容器에 培地의 量을 20㎖로 注入하고 容器當 各各 3個씩 置床하였다. 그러나 供試植物이 木本性이므로 後期生長速度가 완만하기때문에 Murashige[31]가 設定한 것과 같이 3段階를 두어 아래와 같이 實驗하였다.

제주대학교 중앙도서관

試驗 1. 莖頂의 消毒方法에 關한 實驗

莖頂의 가장 效果的인 消毒方法을 究明하고자 圃場에서 자라고 있는 黃金夏橘의 莖頂을 1983年 5月 10日에 切取하여 實驗室內에서 蒸溜水로 數回 洗滌한 다음 莖頂을 中心으로 1*cm*되게 切取하여 calcium hypochlorite, sodium hypodorite, yuhanrox 各 10% 溶液과 yuhanrox 10% 溶液에 Tween-20 1%를 添加한 것等 모두 4가지 處理로 沈漬時間을 5, 10, 15, 30分으로 하여 滅菌水로 數回 洗滌한 다음 置床하였다. 모든 處理는 各各 20反復씩 두었으며 置床후 4주만에 汚染率과 枯死率을 調査하였다.

試驗 2. 生長調節物質의 組合에 따른 生長反應 實驗

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

生長調節物質은 Table 1과 같이 對照區를 包含하여 MS基本培地에 NAA와 BA를 各各 代數常數(logarithm)로 組合하여 16處理 30反復으로 두고 어떠한 組合이 植物體의 器管分化에 適合한가를 調査하였다. 實驗期間은 1983年 5月 20日 置床하여 8月 30日까지 培養한 後 新梢發生數, 葉數, 草長, 生體重을 調査하였다.

그리고 新梢의 發育狀態는 Rao와 Harada[38]의 方法으로 +符號를 使用하여 肉眼으로 判斷할 때 가장 좋은 狀態를 5個(+++++), 普通을 3個(+++), 貧弱한 것을 1個(+)로 表示하였으며 置床할 때보다 못한 狀態는 − 符號를 使用하였다.

莖頂의 消毒은 試驗 1의 結果에 따라 Yuhanrox 10% 溶液에 Tween-20 1%를 添加한 溶液에서 15分間 殺菌하였다.

Table 1. Combination of BA and NAA concentrations applied for the present studies of *Citrus natsudaidai* cv. 'Hwang Kum' shoot tip culture.

Treatment	
NAA (㎎/ℓ)	BA (㎎/ℓ)
0	0
	1
	5
	10
1	0
	1
	5
	10
5	0
	1
	5
	10
10	0
	1
	5
	10

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

試驗 3. 莖頂의 採取時期에 따른 新梢의 發生 및 幼植物의 發根에 關한 實驗

1. 莖頂의 採取時期에 따른 新梢의 發生에 關한 實驗

本實驗은 試驗 2의 結果에서 나타난 바와 같이 新梢의 發育狀態가 가장 良好하였던 MS+BA 10㎎/ℓ 培地에 材料植物의 新梢를 1984年 5月

20日 (春枝), 8月 20日 (夏枝), 9月 20日 (秋枝)에 採取하여 容器當 3個씩 置床하였으며, 置床後 10週만에 培養植物의 生存率 및 新梢發生數를 調査하였다.

2. 幼植物의 發根에 關한 實驗

1983年度 豫備實驗 當時 Table 1과 같은 處理에 活性炭을 2g/ℓ 되게 添加하였던바 全處理 모두 新梢가 發生되지 않았고 發根만 되었기 때문에 發根에 對한 活性炭의 効果를 考慮하여 發根培地로 活性炭 2g/ℓ 添加區를 두었으며, MS基本培地의 strength를 full strength, $\frac{1}{2}$ strength, $\frac{1}{3}$ strength의 3水準으로하고 또한 木本性植物의 發根効果가 認定된 生長調節物質로서는 NAA, IBA, GA_3를 添加하여 아래와 같이 12個處理에 各各 20反復으로 實驗하였다. IBA와 GA_3處理는 0.45μm(pore size)의 millipore filter를 使用하여 注入하였으며 莖頂의 消毒은 試驗1 結果와 같은 方法으로 하였다.

1) MS + NAA 1mg/ℓ
2) MS + NAA 1mg/ℓ + GA_3 0.1mg/ℓ
3) MS + NAA 1mg/ℓ + GA_3 0.1mg/ℓ + IBA 1mg/ℓ
4) $\frac{1}{2}$ MS + NAA 1mg/ℓ
5) $\frac{1}{2}$ MS + NAA 1mg/ℓ + GA_3 0.1mg/ℓ
6) $\frac{1}{2}$ MS + NAA 1mg/ℓ + GA_3 0.1mg/ℓ + IBA 1mg/ℓ
7) $\frac{1}{3}$ MS + NAA 1mg/ℓ

8) $\frac{1}{3}$ MS+NAA 1㎎/ℓ +GA_3 0.1㎎/ℓ

9) $\frac{1}{3}$ MS+NAA 1㎎/ℓ +GA_3 0.1㎎/ℓ + IBA 1㎎/ℓ

10) MS + activated carbon 2g/ℓ

11) $\frac{1}{2}$MS + activated carbon 2g/ℓ

12) $\frac{1}{3}$MS + activated carbon 2g/ℓ

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅳ. 結 果 및 考 察

試驗 1. 莖頂의 消毒方法에 關한 實驗

一般的으로 材料植物의 消毒藥劑로서는 calcium hypoclorite 와 sodium hypoclorite 를 使用하고 있는데, 本實驗에 앞서 Nekrosova[33] 와 Kitto와 Young[24] 의 方法대로 豫備實驗을 해본 결과 枯死率이 매우 높아서 calcium hypoclorite 외 3種類의 消毒藥劑를 利用하여 實驗한 結果는 Table 2와 같다.

Table 2. Contamination and browning die-back ratio of explants to various sterilizing agents and time treatments.

Sterilizing agents	Time			
	5	10	15	30 min.
Calcium hypochorite 10 %	82(1)	45(15)	28(45)	8(82) (%)
Sodium hypochorite 10 %	84(1)	50(10)	25(40)	10(80)
Yuhanrox 10 %	63(-)	30 (8)	23(12)	10(76)
Yuhanrox 10 %+Tween-20 1 %	47(-)	22 (-)	10 (-)	5(35)

( ) : Browning die-back ratio.

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

藥劑處理時間이 5分일때는 藥害가 전혀 나타나지 않았지만 10分間 處理한 것은 3가지 藥劑 모두가 藥害가 나타났다. 그러나 Tween-20 1%를 添加한 處理에서는 藥害가 전혀 나타나지 않았고 10% 程度 汚染率만 나타나고 있어서 가장 좋은 結果를 보였다.

Fig. 1에서 나타난 바와 같이 處理時間이 오래 經過함에 따라 汚染率과 藥害가 反比例하는 現象은 많은 實驗結果[24,25,33] 에서 證明된바 있었으며, 展

着劑를 添加하여 藥害를 줄일 수 있었던 効果는 아직 밝혀진바가 없다. Yuhanrox는 有効鹽素 4% 濃度로써 殺菌하는 効果를 가지는데 Yuhanrox의 有効鹽素 以外의 어떤 物質이 相助的으로 作用하여 殺菌力을 增進시킨 것으로 思料된다.

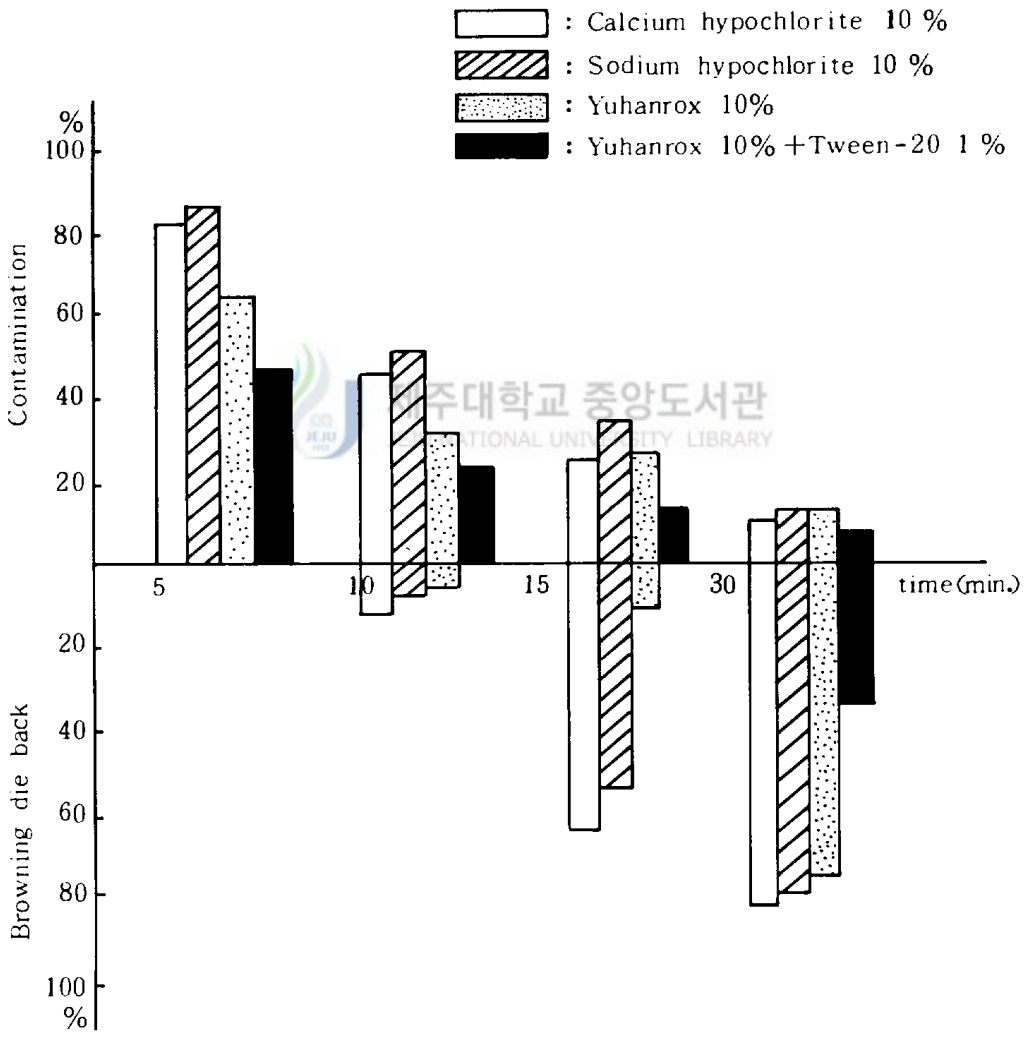

Fig.1. Browning die back and contamination by various sterilizing agents and treated time.

또한 植物組織 表面에 cutin 質을 많이 含有하고 있는 供試植物의 경우, 消毒藥劑에 沈漬했을때 組織의 表面은 藥劑가 골고루 퍼지지 못하여 氣胞를 形成하게 되므로 滅菌效果가 減少되는데 이러한 境遇에 展着劑를 添加하면 組織表面에 藥劑가 골고루 퍼지게 되어 消毒效果를 높인 것으로 思料된다.

한편 長期間의 消毒에도 불구하고 莖頂의 枯死率이 적었던 것은 展着劑 그 自體가 莖頂의 表面과 毒性이 强한 消毒藥劑 사이를 緩衝시키므로서 毒性을 減少시키는 效果가 있는 것으로 思料되며, 이는 蘇[45], Kitto와 Young[24]의 結果와도 一致됨을 알 수 있었다.

試驗 2. 生長調節物質의 組合에 따른 生長反應 實驗

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

置床後 10 週만에 發生한 新梢의 數, 葉數, 新梢의 길이 및 生體重을 調査한 結果는 Table 3와 같다.

16 個處理中 BA 10㎎/ℓ 單用處理區에서는 新梢의 數가 平均 5 個, 葉數가 15.6個 新梢의 길이가 3.3㎝ 그리고 生體重이 2.85g 程度 되었는데 이러한 結果로 미루어 보아서 黃金夏橘의 新梢發生에는 가장 效果的인 培地로 나타났다.

이와 같은 BA의 效果는 Kitto 와 Young[24]이 carrizo citrange 의 莖頂培養에서 MS+BA 5㎎/ℓ 培地에서 新梢가 發生하였다는 報告와는 多少 差異가 있었지만, Grinblat[13]는 calamondin (*Citrus madurensis* L.)의 줄기를 培養한 結果 MS+BA 10㎎/ℓ +malt extract 500㎎/ℓ의 培地에서. 그리고 Barlass

와 Skene[4]는 carrizo citrange (*Citrus sinensis* L.)外 4品種의 組織培養에서 MS+BA 10㎎/ℓ의 培地에서 多數의 新梢가 誘起되었다는 報告와 一致하는 結果를 나타내었다.

또한 cytokinin과 auxin은 單用으로 使用할때보다 서로 混用하여 處理되어야 callus 및 植物體의 新梢發生에 좋다는 點은 몇몇 硏究結果에서도 確認된바 있었다.[6,8,22]

Table 3. The growth response of *Citrus natsudaidai* cv. 'Hwang Kum' in vitro with various combination of BA and NAA concentrations.

Treatment		No. of shoots	No. of leaves	Shoot length	Fresh weight	Intensity a) of shoot development
NAA (㎎/ℓ)	BA (㎎/ℓ)	(ea)	(ea)	(cm)	(g)	
0	0	1.1	5.5	2.3	0.70	+
	1	2.5	8.4	2.8	1.83	+++
	5	2.8	9.6	2.5	2.73	++++
	10	5.0	15.6	3.3	2.85	+++++
1	0	0.0	0.0	0.0	0.00	-
	1	1.0	5.6	2.2	2.24	++
	5	2.8	9.0	2.4	2.12	+++
	10	3.4	11.4	2.8	2.59	++++
5	0	0.0	0.0	0.0	3.02	-
	1	0.0	0.0	0.0	3.32	-
	5	0.6	4.0	0.6	2.20	+
	10	0.8	4.2	1.8	1.26	++
10	0	0.0	0.0	0.0	0.00	-
	1	0.0	0.0	0.0	3.20	-
	5	0.0	0.0	0.0	2.20	-
	10	0.0	0.0	0.0	0.54	-

a) See 'materials and methods' in the text.

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

그러나 本實驗에서는 BA와 NAA를 混用處理한 結果는 BA 10㎎/ℓ + NAA 1㎎/ℓ 處理區에서 新梢의 數가 平均 3.4個, 生體重이 2.54g으로 나타났으나 BA 10㎎/ℓ 單用處理區보다 못한 生育狀態를 보이고 있었다.

또한 NAA 5㎎/ℓ + BA 1㎎/ℓ 處理區는 發根이나 新梢發生이 전혀 되지 않았고 培養植物體의 切斷部位에서 callus만 增殖하여 脫分化 樣相을 보여주었으며 生體重은 平均 3.23g으로 가장 많이 增加되었다. 그리고 auxin 處理 즉 NAA單用處理區에서는 뿌리가 전혀 발생되지 않았고 處理濃度(NAA)가 높아질수록 callus形成만 旺盛하게 이루어졌으며 特히 NAA 10㎎/ℓ 處理區에서는 新梢가 전혀 발생되지 않았다.

그러나 Kitto와 Young[24]은 carrizo citrange의 組織培養에서 MS+ NAA 1㎎/ℓ 處理에서 平均 80%가 發根되었다고 했으며, 그리고 Barless와 Skene[4]도 MS+NAA 5㎎/ℓ 處理에서 平均 5個의 뿌리가 發生하여 土壤에 移植도 可能하였다고 報告하였으나, 本實驗에서는 전혀 發根效果가 없었다. 이와 같이 各 硏究者들의 硏究結果가 서로 다르게 나타나는 것은 各各의 實驗들이 서로 다른 環境條件 아래에서 이루어졌기 때문이며, 또한 材料植物의 營養狀態가 各各 다르기 때문에 內生(endogenous) hormone의 差異에 起因되는 것으로 思料되었다.

그리고 培養對象品種에 따라서 또는 培養對象組織의 部位에따라서 分化程度가 이미 分化된 組織이 脫分化하여 再分化하는 特性을 가지는 것인지, 아니면 切斷된 組織에서 脫分化가 없이 器管이 分化되는 것인지 不明確하기때문에 앞으로 細分된 硏究가 遂行되어야할 것으로 思料된다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

試驗 3. 莖頂의 採取時期에 따른 新梢의 發生 및 幼植物의 發根에 關한 實驗

1. 莖頂의 採取時期에 따른 新梢의 發生에 關한 實驗

莖頂의 採取時期에 따른 新梢의 發生程度를 究明하고자 實施한 實驗結果는 Table 4와 같다.

Table 4. The effect of shoot collection time and number of shoot formation in vitro

	Shoot collection time		
	May 20	Aug. 20	Sep. 20
No. of shoot*	5.0	4.3	2.0 (ea)
% of suyving **	70	80	30 (%)

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

* : 30 shoot tips per each treatment.
** : 100 shoot tips per each treatment.

莖頂의 採取 適期는 8月 20日에 採取한 莖頂(夏枝)에서 新梢의 生存率이 80%로 가장 높았으며, 新梢의 發生數에 있어서는 5月 20日(春枝)에 採取한 莖頂에서 平均 5.0個로 가장 많았다.

이와 같은 結果는 Altman과 Goren[2]가 休眠中인 柑橘나무의 눈(芽)을 培養한 結果, 봄에 採取한 莖頂은 腋芽의 發芽에 多少 抑制的이었으나 여름에 採取한 莖頂은 腋芽의 發芽에 促進的이었다고 報告하였고, Whyte와 Luckwill[51]은 사과나무의 木部樹液을 通한 cytokinin의 上向移動은 봄철 滿開期頃에 最高에 達했다가 늦여름에 낮은 水準으로 減少하고 겨울동안 낮

은 狀態로 維持한다는 報告와 本實驗結果와 비슷한 傾向으로 나타났으며, 9月 20日(秋枝)에 採取한 莖頂은 生存率도 낮았고 新梢의 發生數도 적었다. 이러한 結果는 高와 鄭[25]이 사과 M_{26}矮性台木의 組織培養에서 밝힌 바와 같다.

2. 幼植物의 發根에 關한 實驗

1983年度에 實施한 豫備實驗에서 試驗2와 같이 NAA와 BA를 濃度別로 組合한 16個의 모든 處理區에서 活性炭 2g/ℓ를 添加한 結果 NNA와 BA의 濃度別 組合에 關係없이 全處理區에서 모두 發根을 促進하는 効果가 認定되었는데 培養後 10週만에 나타난 結果는 Table 5와 같다.

제주대학교 중앙도서관

Table 5. The growth response of *Citrus natsudaidai* cv. 'Hwang Kum' in vitro with various media.

Treatment	Shoot length (cm)	No. of leaves (ea)	No. of roots (ea)	Root length (cm)
NAA 1(mg/ℓ)	3.4	4.1	—	—
MS+NAA 1(mg/ℓ)+GA 0.1(mg/ℓ)	3.5	4.2	—	—
NAA 1(mg/ℓ)+GA 0.1(mg/ℓ)+IBA 1(mg/ℓ)	3.8	5.8	—	—
NAA 1(mg/ℓ)	3.5	4.2	—	—
$\frac{1}{2}$MS+NAA 1(mg/ℓ)+GA 0.1(mg/ℓ)	3.4	4.6	—	—
NAA 1(mg/ℓ)+GA 0.1(mg/ℓ)+IBA 1(mg/ℓ)	4.0	5.4	—	—
NAA 1(mg/ℓ)	3.8	1.2	—	—
$\frac{1}{3}$MS+NAA 1(mg/ℓ)+GA 0.1(mg/ℓ)	3.8	2.0	—	—
NAA 1(mg/ℓ)+GA 0.1(mg/ℓ)+IBA 1(mg/ℓ)	4.0	2.2	—	—
MS + activated carbon 2g/ℓ	7.4	13.4	3.2	5.8
$\frac{1}{2}$ MS + activated carbon 2g/ℓ	5.0	11.2	2.5	4.2
$\frac{1}{3}$ MS + activated carbon 2g/ℓ	4.4	10.0	2.2	3.4

MS 基本培地의 strength 差異에따른 處理와 NAA, GA_3, IBA를 添加한 培地에는 뿌리의 發生이 전혀 없었으나, MS 基本培地에 活性炭 2g/ℓ를 添加한 培地에서 平均 3.2個의 뿌리가 發生하였고, MS基本培地에 half-strength, $\frac{1}{3}$ strength 培地에 活性炭 2g/ℓ를 添加함으로써 2個 이상의 뿌리가 發生하였다.

Charcoal 0.2%　　Without charcoal

Fig. 2. Difference in comparative rooting reponse on the added charcoal or without charcoal medium.

特히 Fig. 2에서 보는 바와 같이 MS+活性炭 2g/ℓ 培地에서 新梢의 길이가 平均 7.4cm, 葉數가 17.4個, 뿌리數가 3.2個 그리고 뿌리길이가 5.8cm로 자라서 完全한 幼植物을 얻는데 成功하였으며, MS 基本培地에 活性炭 2g/ℓ를 添加한 培地가 黃金夏橘의 發根에 가장 效果的인 培地로 나타났다.

一般的으로 植物의 發根에는 auxin 特히 NAA가 效果的이라는 것은 잘 알려진 事實인데, Grinblat[14]은 calamondin (*Citrus madurensis* L.)의 組織培

養에서 MS+NAA 0.1㎎/ℓ 處理가 貧弱하기는 하지만 發根效果가 있다고 報告하였으며, Chaturvedi와 Hitra[9]도 文旦(*Citrus grandis* L.)의 組織培養에서 MS+NAA 1㎎/ℓ 處理에서, Kitto와 Young[24]은 carrizo citrange의 組織培養에서 MS 基本培地에 NAA 1㎎/ℓ를 添加한 培地에서 80%의 發根效果가 있었다고 報告하였으나, 本實驗에 있어서는 전혀 NAA 效果를 찾아볼 수 없었다.

1980年 Werner와 Boe[49]는 사과 M_7 矮性台木의 組織培養에서 MS 基本培地의 half-strength 培地에서 뿌리의 發生을 誘起시켰으며, Rugini와 Font-anazza[41]도 knop's 液의 多量要素와 Heller의 微量要素의 half-strength 培地에 NAA 2~4㎎/ℓ를 添加하여 Olive 나무의 뿌리를 誘起시키는데 成功하였다.

제주대학교 중앙도서관

그러나 本實驗에 나타난 MS 基本培地의 strength에 따른 效果는 오히려 培地의 最小(minimal) 程度와 比例하게 全體生育이 低下됨을 보이고 있으며 오직 活性炭을 添加함으로써 發根效果가 認定되었고 이러한 發根效果도 培地의 strength에 따라서 減少되는 傾向을 보였다.

이와같이 活性炭의 效果에 關하여 Ernst[11,12]는 蘭種子의 發芽에는 植物活性炭이 效果的인데 그 理由로서는 活性炭의 여러가지 有機, 無機物質을 吸着하고 培地內에서 緩衝作用을 하기때문이라고 하였으며, Wang와 Huang[48]은 活性炭을 培地에 添加하게 되면 植物에 있어서 土壤과 같은 역할을 한다고 報告하였다.

그리고 Meir와 Halevy[28]는 Strelitzia (Strelitzia reginae)의 培養에서 培地에 活性炭을 添加함으로써 培地 內容物質이 酸化하는 것을 防止할 수가

있었다고 報告하였다.

이와같이 培地에 活性炭을 添加하면 幼植物의 屈地性(geotropism)을 誘導하며 培地內에 含有되어있는 物質들이 選擇的으로 吸收될 수 있기 때문에 發根이 促進되었다고 推測할 수 있었으며, 本實驗의 結果와 같이 다른 硏究者들에 依하여 提示된 發根促進物質處理에 對한 反應이 전혀 없었던 점은 供試된 黃金夏橘의 地下部 分化 能力이 까다롭기 때문이라 思料된다.

試驗 2의 結果에서도 考察한바 있었지만 培養 對象組織이 auxin類에 對하여 敏感하게 反應하지 못하고 脫分化에만 反應하여 再分化하기 어려운 callus만 形成하는 것이 特異한 現象으로 나타났다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

摘　　要

莖頂培養에 依한 黃金夏橘의 大量繁殖을 위하여 適合한 莖頂의 消毒方法과 新梢發生 및 發根에 미치는 生長調節物質의 影響을 알아보고자 實施한 實驗結果는 다음과 같다.

1. 莖頂의 消毒方法은 Yuhanrox 10% 溶液에 Tween-20 1%를 添加한 것이 汚染率과 枯死率이 가장 적게 나타났다.

2. 生長調節物質 處理에 따른 新梢發生은 BA 10㎎/ℓ 單用處理區에서 平均 5.0個로 가장 많았다.

3. 莖頂의 生存率은 8月 20日(夏枝)에 採取한 것이 가장 좋았다.

4. 新梢發生을 위한 NAA處理 效果와 發根에 對한 NAA, IBA, GA_3및 最少培地效果는 認定되지 않았다.

5. 發根培地로는 MS 基本培地에 活性炭 2g/ℓ를 添加한 區에서 가장 效果가 좋았다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

謝　　辭

本研究를 遂行함에 있어서 始終 細心한 指導와 鞭撻을 아끼지 않으신 蘇寅燮 指導教授님과 韓 海龍, 白 子勳, 張 田益, 文 斗吉, 李 宗錫, 朴 庸奉教授님들께 深甚한 謝意를 表하며 本 試驗의 遂行을 爲하여 實驗材料를 비롯한 推進過程에서 積極 協助하여주신 金 容培 濟州試驗場長님을 비롯하여 文 德永 園藝科長님, 金 漢鏞 研究士님 그리고 모든 研究士님들과 園藝科職員 여러분들께 感謝 드립니다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

參 考 文 獻

1. Altman, A. and R. Goren. 1971. Promotion of callus formation by abscisic acid in citrus bud culture. Plant Physiol. 47 : 844 - 846.
2. Altman, A. and R. Goren. 1974. Growth and dormancy cycles in citrus bud culture and their hormonal control. Physiol. Plant. 30 : 240 - 245.
3. Altman, A. and R. Goren. 1974. Interrelationship of abscisic acid and gibberllin acid in the promotion of callus formation in the abscission zone of citrus bud cultures. Physiol. Plant. 32 : 55 - 61.
4. Barlass, M. and K. G. M. Skene. 1982. In vitro plantlet formation from citrus species and hybrids. Scientia Horticulture. 17 : 333 - 341.
5. Boxus, R. 1974. Rapid production of strawberry plant by in vitro micro propagation. J. Hortic. Sci. 49 : 209.
6. Bucher, D. N. and D. S. Ingram. 1976. Plant tissue culture. The camelot press Ltd, Southampton. UK pp : 19 - 21.
7. Burger, D. W. and M. S. Banks. 1979. Regenerration in citrus tissue cultures. Hortscience. 14 (3) : 101.
8. Button, J. and Borman, C. H. 1971 a. Development of nucellar plants from unpo inated and unfertilized ovules of the Washigton Navel Orange in vitro. J. S. Afr. Bot. 37 : 127.
9. Chaturredi, H. C. and G. C. Mitra. 1974. Clonal propagation of citrus from somatic callus cultures. Hortscience. 9 (2) : 188 - 120.

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

10. Elliot, R. F. 1971. Aceptic culture of shoot apices of apple. New zealand J. Botany. 10 : 254 - 258.

11. Ernst, R. 1974. The use of activated charcoal in asymbiotic seedling culture of "paphiopedilum". Amer. Orchid Soc. Bull. 43 : 35 - 38.

12. Ernst, R. 1975. Studies in asymbiotic culture of orchid. Amer. Orchid Soc. Bull. 44 : 32 - 35.

13. Grinblat, U. 1972. Diffentiation of citrus stem in vitro. J. Amer. Soc. Hor. Sci. 97(5) : 599 - 603.

14. Hammerschlag, F. 1982. Factors affecting establishment and growth of peach shoots in vitro. Hortscience. 17(1) : 85 - 86.

15. Honak, J., J. Lustined, J. Mesicek, M. Kaminek and D. Plackova. 1975. Regeneration of diploid and polyploid plants kale (*Brassica oleracea* L.). Ann., Bot. 39 : 571 - 577.

16. Hussey, G. 1974. In vitro methods of plant propagation. HEA, Antumn Conforence, Norwich : 4 - 5.

17. Jacob, W. P. 1952. The role of auxin in diffentiation of xylem around a wound. Amer. J. Bot. 39 : 301 - 309.

18. James, D. J. and I. J. Thurbon. 1979. Rapid in vitro rooting of the apple rootstock "M 9". J. Hort. Sci. 56(1) : 15 - 20.

19. Jones, O. P. 1976. Effects of phloridzin and phloroglucinol on apple shoots. Nature. 262 : 392 - 393.

20. Jones, O. P. and S. G. S., Hatfield. 1976. Root initration in apple

제주대학교 중앙도서관

shoots cultured in vitro with auxins and phenolic compound. J. Hort. Sci. 51 : 495-499.

21. Jones, O. P., Magaret and E. Hopgood, Farrell. 1977. Propagation in vitro of "M 26" apple rootstock. J. Hort. Sci. 52 : 235-238.

22. Kano, Y. and Asahira, T. 1978. Effects of some plant growth requlators of the development of strawberry fruit in vitro cultures.

23. Kim, H. Y., Hong, S. B., Kim, Y. Y. and H. R. Han. 1978. A new natsudaidai strain "Jeju No. 1". The research report of O. R. D. 20 : 7-9.

24. Kitto, S. L. and M. J, Young. 1981. In vitro propagation of carrizo citrange. Hortscience. 16 (3) : 305-306.

25. 高光出·鄭 革. 1981. 사과矮性台木의 組織培養에 關한 硏究. 產學協同 '81-21 : 8-9.

26. Letham, D. S. 1969. Cytockinins and their relation to other phyto-hormones. Bioscience. 19 : 309-316.

27. Linsmaier, E. M. and Skoog. F. 1965. Organic growth factor requirement of tabacco tissue culture. Physiol. Plant. 18 : 100-127.

28. Meira Z. and A. H. Halevy. 1983. Control of oxidative browing and in vitro propagation of *strelitzia reainae*. Hortscience 18 (4) : 434-436.

29. Mon cousin, C. 1978. Prefecting a growing medium for in vitro propa-gation of gesneriads. Revue Horticole suisse. 51 : 295-301.

30. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth

제주대학교 중앙도서관

and bioassays with tabacco tissue cultures. Physiologia plantarum. 15 : 437-497.

31. Murashiga, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Annual Review of plant Physiol. 25 : 135-166.

32. Muriithi, L. M and B. H. Waite. 1982. In vitro propagation of fig through shoot tip cultures. Hortscience. 17(1) : 86-87.

33. Nekrosova, T. V. 1964. The culture of isolated buds of fruit trees. Sov. Plant Physiol. 11 : 107.

34. Nickell, L. G. and Torry, T. G. 1969. Crop improvement through plant cell and tissue culture. Science. 166 : 1088.

35. Okasawa, Y. Katsura, N. and Tagawa, T. 1967. Effects of auxin and kinetin on the development and differentiation of potato tissue cultured in vitro. Physiol, Plant. 20 : 862-869.

36. Paterson, K. E. and T. L. Rost. 1981. Callus formation and organogenesis from cultured leaf segment of *Crassula argentea* : Cytokinin-induced developmental pattern change. Amer. J. Bot. 68 : 965-972.

37. Pieniazek, J. 1967. The growth in vitro of isolated apple shoot tip from young seedlings on media containing growth requlators. Bull, Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol. 16 : 179-183.

38. Rao, P. S. Handro, W. and Harada, H. 1973. Hormonal control of diff diffention of shoots, root and embryos in leaf and stem cultures of *Petunis inflata* and *Petunis hybrida*. Physiol. Plant. 28 : 458-463.

제주대학교 중앙도서관

39. Roest, S. and Bokelman, G. S. 1981. Vegetative propagation of carnation in vitro through multiple shoot development. Sci. Hort. 14 : 357 - 366.

40. Roger, D. Dutcher and Lord, E. Powell. 1972. Culture of apple shoots from buds in vitro. J. of Amer. Soc. Hort. Sci. 97(4) : 511 - 514.

41. Rugini, E. and G. Fontanazza. 1981. In vitro propagation of "*Dolce Agogia*" olive. Hortscience. 16(4) : 492 - 493.

42. Schenk, R. U. and Hildebrandt, A. C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell culture. Can. J. Bot. 50 : 199 - 204.

43. Skoog, F. and Miller, C. O. 1957. Chemical requlation of growth and organ formation on plant tissues cultured in vitro. SEB symposium, XI. The biological action of growth substances. pp. 118 - 131.

44. Snir, I. and A. Erez. 1980. In vitro propagation malling merton apple rootstock. Hortscience. 15(5) : 597 - 598.

45. 蘇寅燮. 1982. *Saintpaulia ionanta* Wedle의 組織培養中 各種 突然變異 誘發源 處理에 따른 變異發生에 關한 硏究. 高麗大學校大學院 農學博士 學位論文. 61 - 62.

46. Street, H. E. 1977. Plant tissue and cell culture. 1 - 59.

47. Torry, J. G. 1977. Cyto-differentiation in cultured cell and tissue. Hortscience. 12 : 138.

48. Wang, P. J. and L. C. Huang. 1976. Benificial effects of activated charcoal on plant tissue and organ cultures. In vitro. 12(3) : 260 - 262.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

49. Werner, E.M. and Boe, A.A. 1980. In vitro propagation of malling 7 apple rootstock. Hortscience. 15(4) : 509-510.

50. Whit, P. R. 1939. Potentially unlimited growth of excised tomato root tip in a liguid medium. Plant physiol (Lancaster) 9 : 585-600.

51. Whyte, P and L. C. Luckwill. 1968. Hormones in the xylem sap of apple trees. Soc. Chem. Industry Monograph 31 : 87-101.

52. Wood, B. W. 1982. In vitro proliferation of pecan shoots. Hortscience. 17(6) : 890-891.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY