

Membrane Filter와 Sucrose 농도가 도라지 (*Platycodon grandiflorum* A. DC.) 기내 배양묘의 생장에 미치는 영향

최소라^{1*}, 김명준², 은종선³, 안민실⁴, 임희춘⁴, 류 정¹, 유동현⁵

¹전라북도농업기술원 진안속근약초시험장, ²전북대학교 농업과학기술연구소, ³전북대학교 원예학과 생물산업연구소, ⁴전라북도농업기술원 남원고냉지화훼시험장, ⁵전라북도농업기술원

Effects of Membrane Filter and Sucrose Concentrations on the Growth of Balloon Flower (*Platycodon grandiflorum* A. DC.) Plantlets *In Vitro*

So-Ra Choi^{1*}, Myung-Jun Kim², Jong-Seon Eun³, Min-Sil Ahn⁴, Hoi-Chun Lim⁴, Jeong Ryu¹, Dong-Hyun You⁵

¹Jinan Medicinal Herbs Experiment Station, Jeollabuk-do ARES, Jinan 567-804, Korea

²Institute of Agricultural Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

³Department of Horticulture, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

⁴Namwon Alpine Floricultural Experiment Station, Jeollabuk-do ARES, Namwon 590-832, Korea

⁵Jeollabuk-do Agricultural Research and Extension Services, Iksan 570-704, Korea

ABSTRACT The shoots of balloon flower (*Platycodon grandiflorum* A. DC.) *in vitro* germinated from seeds were cultured on MS basal medium containing 0.1 mg/L NAA under the various sucrose concentrations and with/without membrane filter (MF) on the lid of vessel. The growth responses were checked to obtain healthy plantlets. The CO₂ and C₂H₄ concentration in vessel without MF were higher than those with MF. The CO₂ concentration without MF was increased as days in culture went by whereas the C₂H₄ concentration was decreased. The plant growth with MF and high sucrose concentration was good. Fresh and dry weight of plantlets cultured in sucrose 4.5% with MF were higher than those in no sucrose without MF. Also the content of chlorophyll of plantlets cultured with MF was high and the content of sugar was shown a similar results and a remarkable difference between MF treatments, especially. Stomata cultured with MF was closer than that without MF and mesophyll of leaf were more developed with MF or in high sucrose concentration. When the plantlets were transplanted in the pot at 25±2°C, 75% relative humidity and low PPFD (photosynthetic photon flux density), the percentage of survival after 13 days without MF was 0% but it was 100% with MF regardless of sucrose concentrations.

Key words: Balloon flower, environmental control, membrane filter, micropropagation, sucrose concentration

서 론

식물조직배양은 무병주 획득, 미세번식 등 여러 가지 장점이 있기 때문에 광범위한 식물의 대량증식에 유용하게

사용되며 특히 원예분야에서 많이 이용되고 있다. 일반적으로 조직배양은 밀폐된 용기 안에서 당과 무기물이 인위적으로 공급된 상태에서 이루어지고 이때의 배양환경은 상대습도가 포화상태이며 CO₂와 C₂H₄의 농도가 비정상적이고, 배지 내 당이 오염의 원인이 되기도 하며 생장조절제가 첨가된 상태이기 때문에 배양묘의 생리적, 형태적 변형을 일으켜 생육부진과 변이를 발생시키는 요인이 된다

*Corresponding author Tel 063-433-7451~2 Fax 063-433-7454
E-mail sora0909@empal.com

(Kozai 1991). 그 결과 조직배양묘는 표피와 엽육조직이 충분히 발달하지 못하여 (Sutter and Langhans 1979) 낮은 광합성능을 가지므로 탄소원으로써 배지 내 공급된 sucrose를 이용하는 타가영양체계를 이루어 왔으며 이를 포장에서 순화할 경우에 급격한 환경 변화로 심한 스트레스를 받게 된다 (Grout and Aston 1977).

그러나 엽록소를 가진 절편체나 신초는 비교적 높은 광합성능을 가지고 있음이 알려졌으며 광합성에 적합하도록 배양환경을 조절함으로써 기내에서도 광자가영양이 가능하다는 연구가 1980년대 중반부터 활발히 진행되어 Kozai 등 (1994)에 의해 다수의 논문이 발표되었다. 또한 Debergh (1991)는 용기의 뚜껑에 membrane filter 장치를 설치, 호흡률을 높여 용기 내 생성 가스의 배출을 원활하게 해 주는 방안을 제시하였으며 현재 국내에서도 배양환경에 따른 식물의 성장반응에 대한 연구가 꾸준히 진행되고 있다 (Goo 1999; Lee and Jeong 1999; Han et al. 1996).

본 실험은 도라지의 기내 배양묘 생산에 있어 배양환경을 조절하는 방법으로 가스 교환이 되는 membrane filter를 이용하고 sucrose 농도를 달리 처리하여 타가영양 (heterotrophic) 과 광자가영양 (photoautotrophic), 광혼합영양 (photomixotrophic) (Chung 1995)을 통한 식물체의 성장반응을 조사하여 건전묘 생산에 효과적인 배양방법을 찾고자 하였다.

재료 및 방법

시험재료는 전북 농업기술원 시험포에서 채종한 도라지 종자를 사용하였으며 종자소독을 위해 호마이수화제 200배액에 24시간 침치, 세척하고 에탄올 70%에 20초 그리고 락스 75%로 15분간 vacuum 하여 살균한 후 멸균수로 4~5회 수세하여 무균발아시켜 본엽 2매가 완전 전개되었을 때 뿌리를 절단하고 shoot만을 치상하였다.

MS 기본배지에 NAA 0.1 mg/L를 첨가하고 sucrose 농도를 0, 1.5, 3.0 및 4.5%로 처리하여 배양용기의 뚜껑에 membrane filter (Pore size 0.5 μm , 직경 18 mm, 필터부 10 mm, Millipore, Japan) 3매를 부착한 구와 부착하지 않은 구로 구분하여 치상하였다. 배지의 pH는 5.8로 조절하고 agar 0.8%를 첨가하여 900 mL 사각 배양병에 100 mL씩 분주하고 121°C, 1.2기압으로 고압멸균한 후 사용하였다. 광원은 백색과 적색형광등을 사용하여 1:1의 비율로 조사하였으며 PPF는 일반 배양환경의 약 2배인 66 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (16/8 h, light/dark)로 처리하였다.

기내 CO₂ 및 C₂H₄ 농도 변화 : Sucrose 3.0% 처리구의 배양용기에서 배양 30일 동안 1~3일 간격으로 1회용 주사기를 사용하여 명기가 시작된 후 3시간이 경과되었을때 1 mL의 공기를 채취하고 gas chromatography (Varian 3300,

Varian, USA)를 이용하여 CO₂ (TCD : themer conductive detection, column : activated charcoal)와 C₂H₄ (FID : flame ionization detector, column: alumina 60/80 mesh) 농도를 3반복씩 측정하였다.

배지량, pH 및 EC 변화 조사 : Membrane filter 처리에 의한 배지의 변화를 살펴보고자 배양 30일된 배지를 1시간 동안 고압멸균하여 agar를 액화한 후 배지량, pH 및 EC (Electrical conductivity)의 변화를 3반복씩 측정하였다.

생장반응 조사 : 30일된 배양묘의 초장, 엽수, 엽면적, 근수, 근장, 생체중 및 건물중을 처리별로 9개체씩 3반복으로 조사하였다.

엽록소, 당 및 전분 함량 분석 : 엽록소 함량을 조사하기 위해 배양 30일묘의 신선한 잎 1 g을 3반복씩 취하고 acetone 80%를 이용하여 엽록소를 추출한 후 spectrophotometer (Du 650, Beckman, USA)를 이용하여 분석하였다 (Arnon 1959; MacKinney 1941). 또한 당 및 전분 함량 변화는 30일묘의 건물중 0.1g을 3반복씩 취하여 당은 에탄올로, 전분은 과염소산으로 분해한 후 anthrone으로 발색시켜 spectrophotometer (Du 650, Beckman, USA)로 분석하였다 (McCready et al. 1950; Morris 1948).

기공, 공변세포 및 잎 구조 관찰 : 기공과 공변세포를 살펴보고자 포장과 배양 30일묘의 잎을 5×5 mm로 절단하여 glutaraldehyde 2%액에 전고정한 후 완충액으로 3회 수세하고 osmium tetroxide 2%액에 후고정하여 완충액으로 다시 수세하였다. 이를 연속 농도의 에탄올에 탈수시킨 후 isoamyl acetate액으로 치환시켜 critical point drying 방식에 의해 건조하고 금으로 sputter coating하여 SEM (JSM-5410LV, Jeol, Japan)으로 관찰하였다. 또한 잎을 탈수시켜 paraffin으로 치환한 후 microtome을 사용하여 8 μm 로 절단하고 toluidine blue로 염색하여 현미경으로 잎구조를 관찰하였다.

상토 이식 후 생존율 조사 : 배양 30일묘를 원예용 상토로 충전한 4×4식 pot에 이식한 후 온도는 25±2°C, 습도는 75%로 조절하고 PPF는 이식 직후부터 1주일까지 13 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 조절한 다음 1주일 후부터 33 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 처리하였으며 식물체 3/4 정도의 황변을 고사주로 판정하였다.

결과 및 고찰

기내 CO₂ 및 C₂H₄ 농도 변화

일반적으로 배양용기 내의 CO₂, O₂ 및 C₂H₄의 비율은 식

물 생육에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Fujiwara and Kozai 1995). Membrane filter 부착구와 미부착구의 기내 CO₂ 및 C₂H₄ 농도 변화를 조사한 결과 (Figure 1), 치상 당시 배양용기 내의 CO₂ 농도는 membrane filter 미부착구에서 2370 ppm이었고 배양 7일에 1437 ppm으로 점차 감소하다가 식물체가 발근하여 생장이 이뤄지기 시작하는 8일부터 다시 증가하기 시작하여 20일 이후부터는 3346 ppm 이상으로 높게 나타났다. 이는 충분한 광합성이 이뤄지지 못하여 CO₂ 고정능력이 떨어지면서 호흡에 의한 CO₂ 생성으로 보여졌으며 이 결과 일반적인 기내 배양환경에서 CO₂가 부족하지 않음을 알 수 있었다. 또한 membrane filter 부착구의 CO₂ 농도는 배양 전반에 걸쳐 391~1037 ppm으로 나타났는데 이는 membrane filter에 의한 가스교환으로 생각되었으며 membrane filter를 부착해도 기내 CO₂ 농도는 대기보다 약간 높았다. 본 실험 결과는 가스교환이 이뤄지지 않는 배양용기 내 명기의 CO₂ 농도가 100~300 ppm으로 대기 중의 300~400 ppm보다 낮다는 보고 (Kozai and Sekimoto 1988)와 상반된 결과였으나 사과 대목의 배양시 비통기성 마개를 사용하였을 때 통기성 마개에 비해 CO₂와 C₂H₄ 농도는 높았으며 통기성 마개가 배양 28일째에 가스 농도의 변화가 적었던 반면 비통기성 마개의 CO₂ 농도는 약 2배 증가하고 C₂H₄ 농도는 1/3 이하로 감소한다는 보고 (Kwon et al. 2004)와 유사하였으며 Han 등 (1996)도 숙근 안개초의 배양에서 배양용기를 알루미늄 호일로 밀폐하였을 때 milli wrap에 비해 CO₂ 농도가 월등히 높았고 기내의 식물체는 CO₂ 부족으로 광합성을 못하는 것이 아니며 C₂H₄ 농도는 milli wrap에서 배양기간 전체에 걸쳐 다소 낮다고 하였다. 일반적으로 C₂H₄은 식물체의 절단시 발생하는 식물호르몬으로 알려져 있으며 (Hakkaart and Versluijs 1983) DNA polymerase의 활력을 감소시켜 DNA 합성을 방해하고 세포분열의 저해를 일으키는데, 배양할 때 알콜램프나 가스버너로 배양용기를 가열할 때 발생되어진다고 알려져 있다 (Chung 1995). 본 실험의 C₂H₄ 농도는 membrane filter

부착구에서 0.56~1.00 ppm으로 배양 전반에 걸쳐 비슷하여 역시 가스교환이 이뤄지고 있음이 확인되었다. 반면 membrane filter 미부착구에서는 치상일에 3.64 ppm으로 높다가 배양기간이 경과할수록 서서히 감소하여 배양 18일에 0.80 ppm으로 낮아져 30일까지 비슷한 수준이었지만 배양 18일 이후에도 membrane filter 부착구보다 0.15~0.23 ppm이 높았다.

배지량, pH 및 EC 변화 조사

Membrane filter와 sucrose 농도를 달리 처리하여 배양 30일 후 배지량, pH 및 EC 변화를 살펴본 결과는 Table 1과 같다. 식물체를 배양하지 않은 배양병의 배지량은 초기 100 mL에서 82.5 mL로 감소되어 배지 조제시 autoclave에 의한 멸균과정에서 증발된 양을 고려한다 하더라도 실험에 사용된 배양용기가 완전히 밀폐된 상태가 아님을 확인하였다. Membrane filter 미부착구의 배지량은 79.0~81.0 mL

Table 1. Changes of medium at 30 days after membrane filter and sucrose concentration treatment.

Membrane filter	Sucrose conc. (%)	Medium quantity (mL)	EC (mS/cm)
Medium ^z		82.5±2.5	7.1±0.0
No attachment	0	81.0±0.6	7.6±0.0
	1.5	80.3±0.9	6.9±0.1
	3.0	79.0±2.1	6.5±0.1
	4.5	79.0±0.6	5.8±0.1
Attachment	0	42.3±2.9	11.6±0.5
	1.5	43.7±1.3	9.8±0.5
	3.0	41.3±2.2	9.4±0.2
	4.5	41.3±3.7	8.0±0.4

^z The MS basal medium contained sucrose 3% on which were not cultured plantlet and without membrane filter.

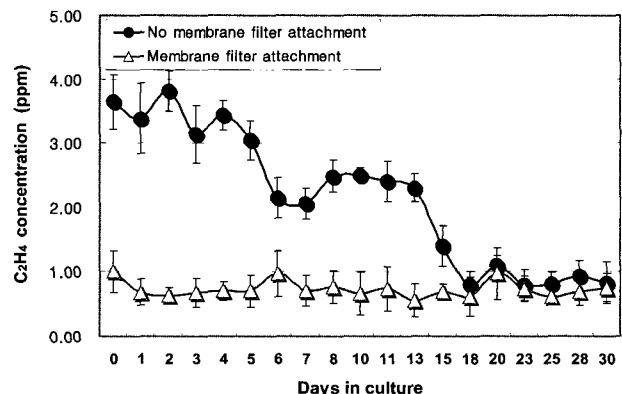
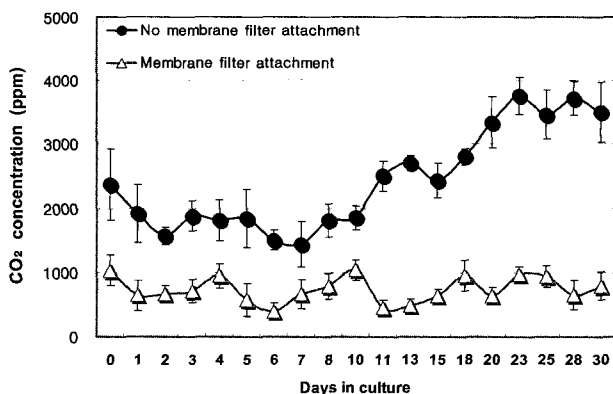


Figure 1. Changes of CO₂ and C₂H₄ concentration in vessels with or without membrane filter and sucrose 3.0% in which balloon flower plantlets were cultured.

로 식물체 생육에 의해 약간 감소되었으며 membrane filter 부착구는 41.3~43.7 mL로 줄어들었는데 이와 같은 결과는 membrane filter에 의한 가스교환에 따른 수분증발과 기내 유식물체의 생육에 의한 것으로 보인다. EC는 배지량의 감소가 많았던 membrane filter 부착구에서 높았으며 sucrose 농도의 증가에 따라 membrane filter 부착구는 11.6 mS/cm에서 8.0 mS/cm로, membrane filter 미부착구는 7.6 mS/cm에서 5.8 mS/cm로 감소하였는데 배지 내 어느 성분 때문인지는 알 수 없었다. Park과 Kim (1998)은 용액속의 EC 값이 4~8 mS/cm에서는 내염성 작물만이 생육이 가능하며 8~16 mS/cm에서는 작물의 생육이 불량하다고 하였는데 배양시 membrane filter 부착은 과도한 배지량의 감소와 함께 EC의 증가로 인해 장기간 배양에는 좋지 않을 것으로 생각된다.

생장반응 조사

Membrane filter 부착 유무와 sucrose의 농도를 달리 처리한 후 성장반응을 조사한 결과 (Figure 2), 초장은 membrane filter를 부착하지 않고 sucrose 농도를 증가할수록 15 mm에서 42 mm로 커져 sucrose의 영향을 많이 받는데 비해 membrane filter를 부착했을 경우에는 sucrose 무첨가구에서 43 mm로 가장 컸으며 sucrose 농도의 증가에 따라 비슷하거나 오히려 감소하는 경향이였다. 엽수는 membrane filter 미부착시에는 sucrose 농도의 증가에 따라 6.9매에서 12.0매로 증가하였고 membrane filter 부착시에는 sucrose 3.0, 4.5% 처리구에서 13.4, 12.4매로 많았으나 sucrose 농도에 따른 엽수의 차이가 2.4매로 적어 membrane filter를 부착하면 초장과 엽수의 변화가 sucrose 농도에 크게 영향을

받지 않는 것으로 나타났다. 엽면적은 membrane filter 미부착구에서는 sucrose 무첨가구에서 1.2 cm²로 적었으나 4.5%에서 9.4 cm²로 나타나 sucrose 농도의 증가에 따라 큰 폭으로 증가한 반면 membrane filter를 부착한 모든 sucrose 처리구에서 13.0~15.4 cm²로 높아 sucrose 농도에 따른 차이보다 오히려 membrane filter의 효과가 더 컸다. 이 결과 배양시 공기 순환이 이루어지지 않는 용기를 사용하였을 경우에 정상적인 식물체 생육을 위해서는 sucrose를 필수적으로 공급하여 타가영양체계를 갖추어 주어야 하며 더 나은 생육을 위해서는 외부와의 가스교환에 의해 스스로 광합성을 하는 광자가영양체계가 두 영양체계가 혼합된 광혼합 영양체계가 필요할 것으로 생각된다. 근장은 membrane filter 부착유무에 상관없이 sucrose 농도의 증가에 따라 길어졌으며 membrane filter 부착구가 미부착구보다 길거나 비슷하였다. 근수는 membrane filter를 부착하지 않은 경우 sucrose 농도의 증가에 따라 1.1개에서 7.4개로 증가하였고 membrane filter를 부착한 경우에는 sucrose 0~3% 처리구에서 4.6개에서 10.3개로 증가하다가 4.5%에서 7.0개로 오히려 감소하였는데 근장이 가장 양호하였던 것과 대조적이어서 고농도의 당이 새로운 뿌리의 생성보다는 신장에 영향을 미친 것으로 생각되었다.

배양 30일묘의 생육모습을 비교해 보면 (Figure 3), membrane filter를 부착하지 않았을 경우에는 저농도의 sucrose 처리에서 엽이 얇고 백화되는 특징을 보이다가 4.5%에서는 줄기 하단부에 부착된 엽의 엽록소가 파괴되고 아래로 처지는 현상이 나타났는데 이는 일반적인 광도로 도라지 기내묘를 배양하였을 때에 볼 수 없었던 모습으로 (결과 미제시) membrane filter를 부착하지 않은 상태에서 일반적인 배양환경보다 높은 광도를 조사하였을 때 광자가영양체

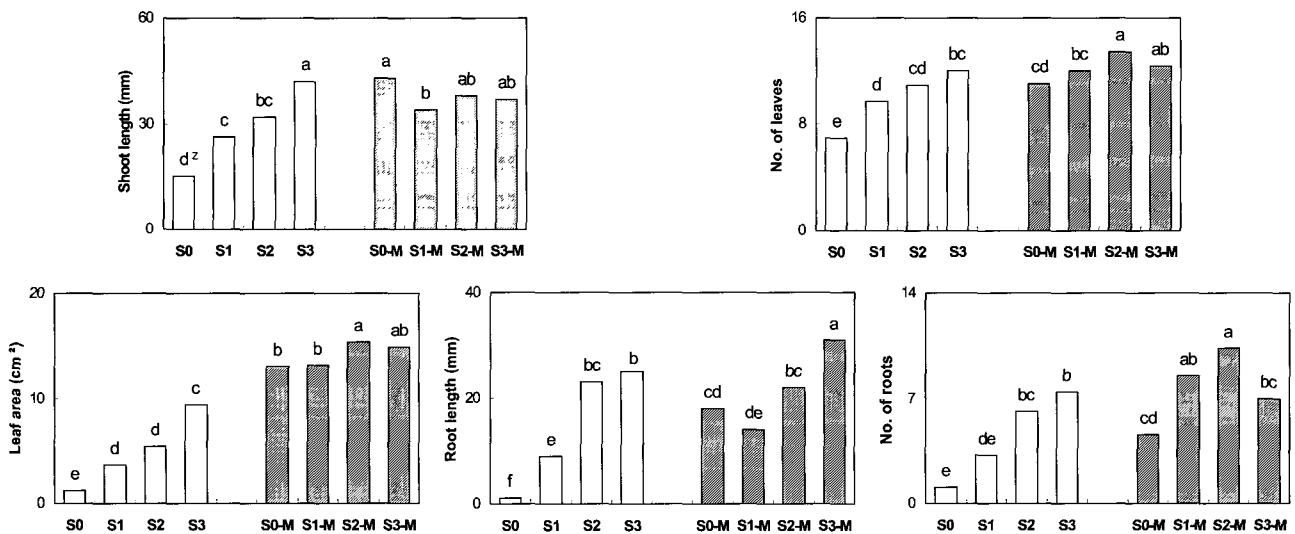


Figure 2. Effects of membrane filter and sucrose concentrations on the growth of balloon flower plantlets at 30 days after treatment. S0, S1, S2 and S3, no membrane filter attachment and sucrose 0, 1.5, 3.0, 4.5%; S0-M, S1-M, S2-M and S3-M, membrane filter attachment and sucrose 0, 1.5, 3.0, 4.5%.

^z Mean separation within columns by DMRT at 5% level.

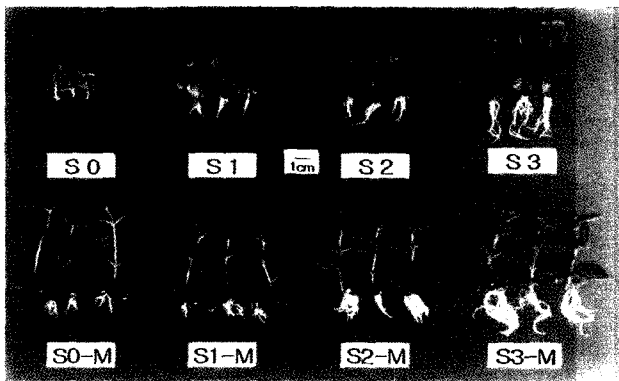


Figure 3. Balloon flower plantlets *in vitro* at 30 days after membrane filter and sucrose concentrations treatment. S0, S1, S2 and S3, no membrane filter attachment and sucrose 0, 1.5, 3.0, 4.5%; S0-M, S1-M, S2-M and S3-M, membrane filter attachment and sucrose 0, 1.5, 3.0, 4.5%.

를 갖지 못한 상태이기 때문에 과도한 호흡을 유발하는 스트레스원으로 작용되는 것으로 생각된다. 또한 membrane filter 처리구에서는 sucrose 농도의 증가에 따라 절간이 단축되고 엽이 두꺼웠으며 뿌리의 발달도 양호하였다. 이는 기내 환기가 식물 생육에 매우 중요한 요소임을 나타내는 결과로 membrane filter를 부착하지 않아 가스교환이 이뤄지지 않는 일반배양환경의 식물체는 배지 내 sucrose에 의해 의존하여 성장하는 타가영양체계를 갖게 되지만 membrane filter를 사용하면 식물체 스스로 광합성을 활발히 하여 광자가 영양체계를 갖추고 이를 통해 생육이 이뤄지며 sucrose는 보조적인 역할에 그치는 것으로 판단된다.

생체중과 건물중을 조사한 결과 (Table 2), membrane filter 부착과 sucrose 농도 증가의 효과가 뚜렷하게 나타났다. 생체중은 membrane filter 미부착구에서 sucrose 농도의 증가에 따라 41.4 mg에서 289.7 mg으로, 부착구에서는 257.7 mg에서 445.1 mg으로 증가하였으며 동일 sucrose 농도에서 membrane filter 부착구는 미부착구에 비해 생체중이 1.5배 이상 높았는데 특히 sucrose 무첨가구의 membrane filter 부착구와 미부착구의 차이는 6.2배로 두드러진 차이를 보였다.

건물중 역시 생체중과 비슷한 경향이었으며 특히 membrane filter를 부착한 sucrose 무첨가구는 membrane filter를 미부착한 sucrose 4.5% 처리구에 비해 생체중은 32 mg이 낮았으나 건물중은 오히려 6.3 mg이 더 높았다. 본 실험 결과는 배양용기 내 가스교환이 배지 내 sucrose를 공급하는 것보다 광합성에 효과적임을 의미하며 스타티스 (Lee and Jeong 1999), 카네이션(Kozai and Iwanami 1988)의 결과와 유사하였다. 함수율은 membrane filter 미부착구에서 91.6~94.4%였으나 membrane filter 부착구에서는 86.2~88.1%로 나타났으며 sucrose 농도 증가에 따라 대체로 감소하여 더욱 강건한 식물체를 얻을 수 있었다.

엽록소, 당 및 전분 함량 분석

생체중 1 g 당 엽록소 함량을 조사한 결과 (Table 3), membrane filter 미부착구에서 엽록소 a, b 및 총엽록소 함량은 sucrose 농도의 증가에 따라 높게 나타났으며 membrane filter 부착구에서는 다소 감소하는 경향이었으나 유의성은 없었다. 또한 membrane filter를 부착한 sucrose 무첨가구는 membrane filter를 부착하지 않은 sucrose 4.5% 처리에 비해 오히려 높은 엽록소 함량을 나타내 광합성능이 높을 것으로 예상되었다. 따라서 배지 내 첨가된 sucrose를 영양분으로 하는 타가영양보다 통기성이 가능한 배양용기를 사용하여 광자가영양상태로 만드는 것이 엽록소 함량을 높여 광합성능을 증가시키는데 효과적이라고 생각한다. 또한 엽록소 a/b율은 membrane filter 미부착구에서 sucrose 농도의 증가에 따라 2.76 mg/g F.W.에서 2.94 mg/g F.W.로 높아졌으나 membrane filter 부착구는 sucrose 농도에 상관없이 3.01~3.07 mg/g F.W.로 나타나 광합성능이 높아질수록 엽록소 a의 함량이 높아졌는데 딸기의 배양묘에서도 높은 광도와 강제순환이 되는 배양환경에서 자란 묘에서 엽록소 a/b율이 높아진다고 보고된 바 있다 (Kozai and Sekimoto 1988).

Membrane filter와 sucrose 농도에 따른 당 및 전분 함량은 Table 4와 같다. 당 함량은 동일한 sucrose 농도일 때

Table 2. Effects of membrane filter and sucrose concentrations on fresh and dry weight of balloon flower plantlets at 30 days after treatment.

Membrane filter	Sucrose conc. (%)	Fresh weight (mg)	Dry weight (mg)	Water content (%)
No attachment	0	41.4 d ^z	2.5 g	94.0
	1.5	107.6 c	6.1 g	94.4
	3.0	167.2 c	11.4 f	93.2
	4.5	289.7 b	24.4 e	91.6
Attachment	0	257.7 b	30.6 d	88.1
	1.5	311.6 b	39.2 c	87.4
	3.0	393.4 a	46.7 b	88.1
	4.5	445.1 a	61.3 a	86.2

^z Mean separation within columns by DMRT at 5% level.

Table 3. Effects of membrane filter and sucrose concentrations on chlorophyll content of balloon flower plantlets at 30 days after treatments.

Membrane filter	Sucrose conc.(%)	Content of			Chlorophyll a/b ratio
		total chlorophyll (mg/g F.W.)	chlorophyll a (mg/g F.W.)	chlorophyll b (mg/g F.W.)	
No attachment	0	0.75 d ^z	0.55 d	0.20 c	2.76 b
	1.5	1.16 c	0.86 c	0.30 b	2.86 ab
	3.0	1.93 b	1.44 b	0.50 a	2.90 ab
	4.5	2.09 ab	1.56 ab	0.56 a	2.94 ab
Attachment	0	2.31 a	1.74 a	0.57 a	3.05 a
	1.5	2.21 ab	1.67 ab	0.54 a	3.07 a
	3.0	2.10 ab	1.58 ab	0.52 a	3.04 a
	4.5	2.06 ab	1.54 ab	0.52 a	3.01 a

^z Mean separation within columns by DMRT at 5% level.

membrane filter 부착구가 미부착구에 비해 2.0~4.4 배 높아 광합성에 의한 물질전이가 활발히 이뤄지고 있었다. 또한 membrane filter 미부착구에서는 sucrose 농도에 따른 차이가 12.6 mg/g D.W.이었으나 membrane 부착구에서 sucrose 농도에 따른 차이는 87.0 mg/g D.W.로 변화의 폭이 크고 sucrose 3% 처리구에 비해 4.5%에서 오히려 감소하였다. 특히 타가영양구의 하나인 membrane filter를 부착하지 않은 sucrose 4.5% 처리구에 비해 광자가영양구인 membrane filter를 부착한 sucrose 무첨가구에서 당 함량이 1.6배가 더 많아 sucrose 첨가보다 membrane filter 부착이 광합성에 효과적이었음을 알 수 있었다. 전분 함량도 비슷한 경향이었으며 membrane filter 미부착구에서는 당 함량의 46~53%이었으나 membrane filter 부착구는 26~31%로 낮아 상대적으로 광합성 산물이 다른 기관의 발달에 활발히 사용되고 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과로 타가영양보다는 광자가영양이, 광자가영

양보다는 광혼합영양이 효과적이었으며 광혼합영양에 있어서도 일정량 이상의 sucrose 공급은 오히려 광합성 산물 축적에 좋지 않음을 알 수 있었다.

기공, 공변세포 및 잎구조 관찰

Membrane filter와 sucrose 농도를 달리 처리하여 기공 및 공변세포를 관찰한 결과는 Figure 4와 같다. 포장에서 생육 중인 도라지의 잎은 불균등형인 기공으로 공변세포와

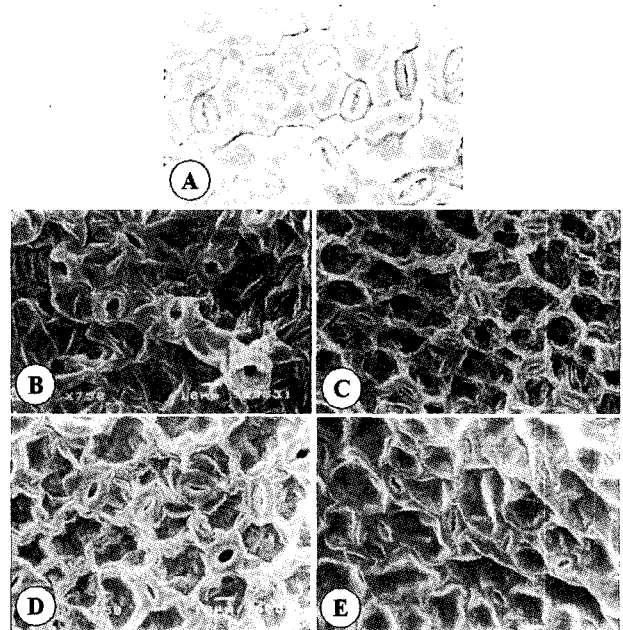


Figure 4. Scanning electron micrographs of stomata and guard cell on the abaxial surface of balloon flower leaf cultured *in vitro* with membrane filter and sucrose concentration. A, Leaf taken from field grown plant; B, Leaf in the sucrose 0% without membrane filter; C, Leaf in the sucrose 0% with membrane filter; D, Leaf in the sucrose 4.5% without membrane filter; E, Leaf in the sucrose 4.5% with membrane filter.

Table 4. Effects of membrane filter and sucrose concentrations on content of sugar and starch of balloon flower plantlets at 30 days after treatments.

Membrane filter	Sucrose conc. (%)	Content of	
		sugar (mg/g D.W.)	starch (mg/g D.W.)
No attachment	0	56.7 f ^z	25.9 b
	1.5	60.2 ef	31.8 b
	3.0	67.3 de	31.5 b
	4.5	69.3 d	35.8 b
Attachment	0	111.1 c	34.0 b
	1.5	145.8 b	38.3 b
	3.0	198.1 a	59.6 a
	4.5	150.7 b	41.0 b

^z Mean separation within columns by DMRT at 5% level.

부세포의 구분이 뚜렷하고 대체로 기공이 닫힌 상태였으며 잘 발달된 표피조직과 그 위로 잔주름처럼 형성되어 있는 epicuticular wax rod가 관찰되었다. 이러한 epicuticular wax rod는 환경요인에 의해 형성되며 가스의 교환 등 잎의 기능을 조절하는데 중요한 역할을 한다 (Hull et al. 1975; Martin and Juniper 1970). 반면 기내 유식물체의 잎은 기공이 작고 다소 열려있었으며 주변의 부세포들의 발달이 미흡하여 기공이 돌출되어 있었다. 또한 membrane filter 부착구는 미부착구에 비해 대체로 기공이 닫혀 있었고 sucrose 무첨가구에 비해 4.5%에서 기공이 더 닫혀 있었으며 주변세포가 발달하였지만 전반적으로 기내 배양묘에서는 표피가 발달하지 못하여 epicuticular wax rod를 찾아볼 수 없었다. Kim과 Byun (1988)도 카네이션 배양에서 온실묘는 잎의 표면에 wax rod가 잘 발달되어 있으나 기내 건전묘는 거의 없다고 보고하였다. 또한 Paek 등 (1997)은 지황의 순화된 식물체의 잎을 보면 기내 건전묘의 잎보다 기공수도 많고 기공이 크며 타원형으로 되어있는데 반해 기내 건전묘는 기공이 돌출되어 있으며 둥근모양을 하고 있는 것이 특징이라 하였는데 이는 본 실험과 동일한 결과였으며 Han 등 (1992)도 안개초를 이용한 실험에서 유사한 결과를 발표하였다. 그러나 Lee 등 (2001)은 거베라의 기내 배양시 타가 영양묘의 기공수가 가장 많고 혼합영양묘, 자가영양묘 그리고 온실묘의 순으로 감소한다고 하였는데 이는 본 연구와

는 다른 결과로 배양식물에 따른 차이로 생각되었다.

일반적으로 기내 배양묘는 외부로 옮긴 뒤 12~24 시간 이내에 기공이 닫혀지지만 기공이 닫히기까지 기공을 통해 증발되는 수분의 총량은 초기 식물 중량의 2~3배에 달하며 이로 인해 수분 스트레스를 일으킨다고 한다 (Shackel et al. 1990). 본실험에서 membrane filter를 부착하였을 때 미부착구에 비해 기공이 닫혀있었던 것으로 보아 상토에 이식한 후 수분 증발량이 적어 생존율이 높을 것으로 예상되었다.

또한 잎을 횡으로 절단하여 관찰한 결과 (Figure 5), 포장에서 재배된 잎은 주맥의 유관속이 잘 발달되어 있었으며 형성층을 중심으로 윗부분에 약간의 목부와 아랫부분에 치밀한 사부조직이 존재하고 그 상하에는 세포가 큰 유조직들이 발달되어 있었으며 책상조직과 해면조직이 뚜렷하고 표피의 wax층이 단층으로 관찰되었다. 하지만 기내묘는 전반적으로 엽조직이 얇고 엽육조직이 잘 발달되지 않은 상태였으며 membrane filter 부착구가 미부착보다 잎이 두껍고 조직이 더 발달되어 있었다. Sucrose 무첨가구에서는 표피가 분간이 안 될 정도로 윤곽만 확인되었으며 대부분 넓은 세포간극만 크게 보일 뿐 유관속의 발달을 확인할 수 없었다. 그렇지만 sucrose 4.5%에서는 표피가 다소 형성되어 있었으며 포장에서 재배된 잎과는 달리 상표면 표피가 기공이 있는 하표면 표피보다 큰 세포로 구성되어 있었고 희미하게나마 책상조직과 해면조직을 확인할 수 있었다. 본 연구와 비슷한 결과로 Paek 등 (1997)은 지황의 조직배양시 포장묘보다 기내 건전묘에서 잎의 조직 내 치밀도는 떨어지지만 세포간극이 차지하는 면적이 적고 책상세포의 발달은 불량하나 해면세포가 잘 발달되어 있다고 하였다.

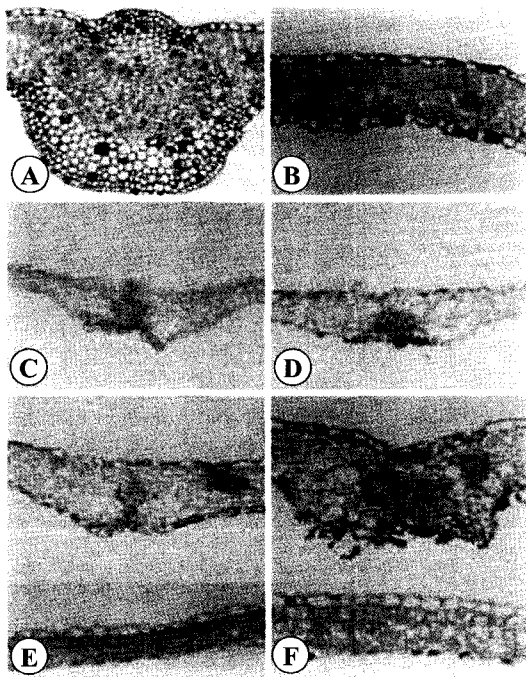


Figure 5. Transverse section of balloon flower leaf cultured *in vitro* according to membrane filter and sucrose concentration treatment. A and B, Leaf taken from field grown plant; C, Leaf in the sucrose 0% without membrane filter; D, Leaf in the sucrose 0% with membrane filter; E, Leaf in the sucrose 4.5% without membrane filter; F, Leaf in the sucrose 4.5% with membrane filter.

상토 이식 후 생존율 조사

각 처리구의 배양 30일 된 기내 유식물체를 원예용상토에 이식한 결과 (Table 5 and Figure 6), 기외로 유식물체를 이

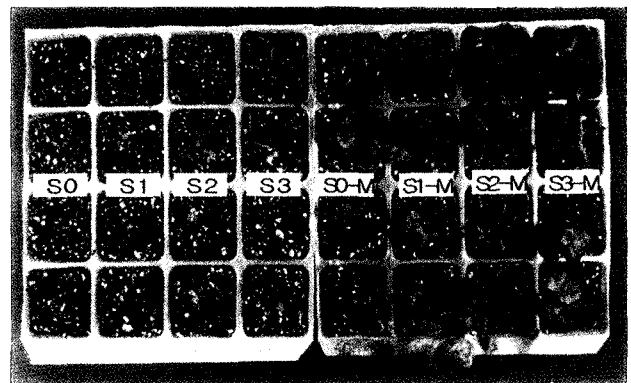


Figure 6. Figure of balloon flower plantlets at 7 days after transplant in the pot. S0, S1, S2 and S3, no membrane filter attachment and sucrose 0, 1.5, 3.0, 4.5%; S0-M, S1-M, S2-M and S3-M, membrane filter attachment and sucrose 0, 1.5, 3.0, 4.5%.

Table 5. Effects of membrane filter and sucrose concentrations on the percentage of survival of balloon flower plantlets at days after transplant.

Membrane filter	Sucrose conc. (%)	No. of transplant plantlets	No. of dead plantlets at days after transplant						Percentage of survival (%)
			1	3	5	7	10	13	
No attachment	0	14	6	8	10	11	14	14	0
	1.5	12	9	9	10	10	12	12	0
	3.0	13	4	9	11	12	13	13	0
	4.5	14	7	7	8	9	12	14	0
Attachment	0	14	0	0	0	0	0	0	100
	1.5	14	0	0	0	0	0	0	100
	3.0	14	0	0	0	0	0	0	100
	4.5	14	0	0	0	0	0	0	100

식한 후 3일째 membrane filter 미부착구에서 sucrose 농도에 관계없이 50% 이상 고사하였으며 7일째 64% 이상, 13일째 모두 고사한 반면 membrane filter 부착구에서는 13일째 까지도 모든 개체가 생존하였다. 그러나 sucrose 농도에 따른 생존율의 차이는 확인할 수 없었다. 이는 membrane filter를 통한 가스교환과 배양용기 자체의 증발에 따른 기내 변화에 식물체가 적응한 결과로 보인다. Earle과 Langhans (1975)는 carnation 배양묘를 토양에 순화시켰을 때 생존율이 50% 정도였으며 Broome과 Zimmerman (1978)도 blackberry의 경우 60% 만이 생존하였다고 보고하여 본 연구와 상당한 차이를 나타냈는데 이는 순화환경의 차이로 생각된다. Membrane filter 부착여부에 따라 생존율의 차이가 뚜렷했던 이유는 membrane filter에 의해 광자가영양체계를 갖춰 건전한 묘가 형성되었고 이로 인해 외부의 환경에 쉽게 적응하였기 때문이라고 보여지며 금후 다른 작물의 배양묘 생산에 있어 순화 후 생존율을 높이기 위해서는 배지 내 sucrose 농도를 높이는 것보다 membrane filter를 사용하는 것이 효과적일 것으로 생각된다.

적 요

기내 배양환경을 조절하여 건전한 유식물체를 획득하기 위해 도라지를 무균발아시켜 shoot 부분을 NAA 0.1 mg/L가 첨가된 MS 기본배지에 치상한 후 membrane filter 부착 유무와 sucrose 농도를 달리 처리하여 성장반응을 조사하였다. Membrane filter 미부착구에서는 배양용기 내의 CO₂와 C₂H₄ 농도가 membrane filter 부착구에 비해 높았으며 membrane filter가 부착되지 않았을 때 CO₂ 농도는 배양기간이 경과될수록 증가하였으나 C₂H₄ 농도는 감소하는 경향이였다. 식물체 생장은 membrane filter 부착구가 미부착구에 비해 양호하였고, 미부착구에서는 sucrose 농도가 증가할수록 생육이 양호하게 나타났다. 생체중과 건물중은 membrane filter를 부착하지 않은 sucrose 4.5% 처리구에

비해 membrane filter를 부착한 sucrose 무첨가구에서 비슷하거나 높았다. 엽록소 함량은 membrane filter 부착구에서 미부착구에 비해 높았으며 당 함량도 비슷한 경향이었는데 두 처리간 차이는 더 컸다. 기공은 membrane filter 부착구에서 미부착구에 비해 닫혀 있었으며 엽육조직은 membrane filter를 부착하거나 sucrose 농도가 높을수록 잘 발달하였다. 또한 상토에 이식한 후 13일째 생존율은 sucrose 처리 농도에 관계없이 membrane filter 미부착구는 0%인데 비해 부착구는 100%로 나타났다.

인용문헌

- Arnon DI (1959) Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol 24: 1-15
- Broome O, Zimmerman R (1978) *In Vitro* propagation from shoot tips of blackberry. Hort Sci 13: 151-153
- Chung JD (1995) Recent Plant Biotechnology, Vol I. Kyungbuk Univ., Taegu, Korea
- Debergh P (1991) Acclimatization techniques of plants from in vitro. Acta Hort 289: 291-300
- Earle ED, Langhans RW (1975) Carnation propagation from shoot tips cultured in liquid medium. Hort Sci 10: 608-610
- Fujiwara K, Kozai T (1995) Physical microenvironment and its effects. In : Aitken-Christie J, Kozai T, Lila Smith M (eds), Automation and environmental control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publishers, Netherlands pp 319-369
- Goo DH (1999) Growth characteristics of lily by the treatment of aeration *in vitro*. Kor J Plant Tiss Cult 26: 241-244
- Grout BWW, Aston H (1977) Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. Hort Res 17: 1-7
- Hakkaart FA, Versluijs JMA (1983) Some factors affecting glassiness in carnations meristem tip culture. Neth J Plant Path 89: 47-53.
- Han BH, Joung HY, Choi JK, Paek KY (1996) Effect of

- different sealing materials on CO₂ and ethylene concentration in culture vessel, and growth and vitrification on *Gypsophila paniculata* 'Bristol Fairy'. J Kor Soc Hort Sci 37: 118-122
- Han BH, Paek KY, Choi JK (1992) Structural characteristics of vitrified and glaucous plantlets, in *Gypsophila paniculata* L. *in vitro*. J Kor Soc Hort Sci 33: 177-189
- Hull HM, Morton HL, Wharrie JR (1975) Environmental influences on cuticle development and resultant foliar penetration. Bot Rev 41: 421-451
- Kim KW, Byun MS (1988) Physiological and morphological characteristics of the glaucous and vitreous carnation plantlets obtained *in vitro*. J Kor Soc Hort Sci 29: 216-223
- Kozai T (1991) Controlled environments in conventional and automated micropropagation. Cell Cult Somatic Cell Genet Plants 8: 213-230
- Kozai T, Fujiwara K, Hayashi M, Kitaya Y (1994) Collected papers on environmental control in micropropagation. Vol. I, II. Faculty of Horticulture Chiba Univ., Matsudo, Japan
- Kozai T, Iwanami Y (1988) Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. J Jap Soc Hort Sci 57: 279-288
- Kozai T, Sekimoto K (1988) Effects of the number of air changes per hour of the closed vessel and the photosynthetic photon flux on the carbon dioxide concentration inside the vessel and the growth of strawberry *in vitro*. Environ Control Biol 26: 21-29
- Kwon SI, Jeong HK, Kang IK, Kim MJ (2004) Effects of growth regulators and culture environment on *ex vitro* rooting and acclimatization of apple rootstock *in vitro* propagated. Kor J Plant Biotechnol 31: 133-138
- Lee EJ, Jeong BR (1999) Growth of *Limonium* 'Misty Blue' as affected by culture environment *in vitro* and level of shading during *ex vitro* acclimatization. J Kor Soc Hort Sci 40: 623-626
- Lee HS, Lim KB, Chung JD, Kim CK (2001) Structural characteristics of leaves and carbohydrate content of propagules grown at different culture conditions in *Gerbera hybrida* 'Beauty'. Kor J Plant Tiss Cult 28: 117-121
- MacKinney G (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. J Biol Chem 140: 315-322
- Martin JT, Juniper BE (1970) The cuticles of plants. Edward Arnold, London, England
- McCready RM, Guggolz J, Silveria V, Owens HS (1950) Determination of starch and amylose in vegetables. Anal Chem 22: 1156-1158
- Morris DL (1948) Quantitative determination of carbohydrates with drywood's anthrone reagent. Science 107: 254-255
- Paek KY, Yu KJ, Park SI, Shin SR (1997) Anatomical observation of vitrified and glaucous leaf from *Rehmannia glutinosa* plant produced *in vitro*. Kor J Plant Tiss Cult 24: 323-327
- Park KW, Kim YS (1998) Hydroponics in Horticulture. Academy Publisher, Seoul, Korea
- Sharkel KA, Novello V, Sutter EG (1990) Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue cultured apple plants. J Amer Soc Hort Sci 115: 468-472
- Sutter EG, Langhans RW (1979) Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. J Amer Soc Hort Sci 104: 493-496

(접수일자 2004년 8월 9일, 수리일자 2004년 9월 16일)