

# 배양용기 내 환기와 광도에 따른 도라지 (*Platycodon grandiflorum* A. DC.) 기내 배양묘의 성장반응

최소라<sup>1\*</sup>, 김명준<sup>2</sup>, 은종선<sup>3</sup>, 안민실<sup>4</sup>, 임희춘<sup>4</sup>, 류 정<sup>1</sup>

<sup>1</sup>전라북도농업기술원 진안속근약초시험장, <sup>2</sup>전북대학교 농업과학기술연구소  
<sup>3</sup>전북대학교 원예학과 생물산업연구소, <sup>4</sup>전라북도농업기술원 남원고냉지화훼시험장

## The Growth Response of Balloon Flower (*Platycodon grandiflorum* A. DC.) Plantlets *In Vitro* as Affected by Air Exchanges and Light Intensity

So-Ra Choi<sup>1\*</sup>, Myung-Jun Kim<sup>2</sup>, Jong-Seon Eun<sup>3</sup>, Min-Sil Ahn<sup>4</sup>, Hoi-Chun Lim<sup>4</sup>, Jeong Ryu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Jinan Medicinal Herbs Experiment Station, Jeollabuk-do ARES, Jinan 567-804, Korea

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

<sup>3</sup>Department of Horticulture, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

<sup>4</sup>Namwon Alpine Floricultural Experiment Station, Jeollabuk-do ARES, Namwon 590-832, Korea

**ABSTRACT** Shoots of balloon flower (*Platycodon grandiflorum* A. DC.) derived from *in vitro* germinated seeds were cultured on MS medium containing 0.1 mg/L NAA under various photosynthetic photon flux (PPF) 33, 66, and 99  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  with or without membrane filter. Number of air exchanges per hour (NAEH) of the culture vessel with membrane filter on the lid was 4.9  $\text{h}^{-1}$  and that without membrane filter was 0.1  $\text{h}^{-1}$ . Plantlets grown in 4.9  $\text{h}^{-1}$  NAEH showed greater growth than in 0.1  $\text{h}^{-1}$  NAEH. According to increase of PPF, plantlets growth decreased in 0.1  $\text{h}^{-1}$  NAEH while it increased in 4.9  $\text{h}^{-1}$  NAEH. At the same PPF, fresh weight and sugar content in plantlets in 4.9  $\text{h}^{-1}$  NAEH were above 1.9, 2.0 times higher than those in 0.1  $\text{h}^{-1}$  NAEH, respectively. Also they were enhanced in 4.9  $\text{h}^{-1}$  NAEH by increase of PPF whereas no significance in 0.1  $\text{h}^{-1}$  NAEH. The percentage of water content of plantlets in 4.9  $\text{h}^{-1}$  NAEH was 4.2~5.5% lower than those in 0.1  $\text{h}^{-1}$  and no difference in PPF. The content of total chlorophyll in plantlets in 4.9  $\text{h}^{-1}$  NAEH was higher 0.27~0.79 mg/g F.W. than that in 0.1  $\text{h}^{-1}$  NAEH. By increase of PPF, it was decreased in 0.1  $\text{h}^{-1}$  NAEH while had no significant difference in 4.9  $\text{h}^{-1}$  NAEH. Guard and subsidiary cells of leaves in 4.9  $\text{h}^{-1}$  NAEH were more developed than in 0.1  $\text{h}^{-1}$  NAEH. Especially, in 99  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , leaves in 0.1  $\text{h}^{-1}$  NAEH had undeveloped subsidiary cells and wide open stomata whereas those in 4.9  $\text{h}^{-1}$  NAEH had well-developed subsidiary cells.

**Key words:** Air exchanges, balloon flower, environmental control, light intensity, membrane filter, micro-propagation, photosynthetic photon flux.

### 서 론

일반적인 배양환경에서 미세번식으로 증식된 식물체는 광합성률 저하나 기공개폐 기능 상실 등과 같은 생리적인

문제가 발생하게 되며 (Chung 1995) 형태적으로는 초장이 높고 엽육이 얇은 식물체를 형성하게 된다. 이러한 기내 식물체의 특징 때문에 배양묘를 순화가 가능한 포장이나 온실로 옮기게 되면 생존율은 매우 낮게 된다. 기내 식물체의 순화율을 높이려면 스스로 광합성을 할 수 있도록 배양해야 하는데 이때 요구되는 식물체의 형태적인 특성은 줄기가 짧고 두꺼우며 낮은 T/R 율을 지니고 정상적인 기공을 가지

\*Corresponding author Tel 063-433-7451 ~ 2 Fax 063-433-7454

E-mail sora0909@empal.com

면서 엽면적이 넓어야 하며 두꺼운 큐티클층이 발달해 있어야 한다 (Kozai et al. 1991).

배양환경을 조절하는 목적은 기내 식물체가 순화를 위해 기외로 나왔을 때 생존율을 높일 수 있도록 건전한 배양묘를 생산하는데 있으며 이를 위해 배양용기 내 CO<sub>2</sub>나 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 등의 이동이 가능하게 하고 광합성에 필요한 광 조건을 갖추어주는 등의 연구가 진행되어 왔다.

가스교환을 위해서는 배양용기의 뚜껑에 membrane filter를 부착하는 방법이 Debergh (1991)에 의해 제시되었는데, membrane filter 미부착구는 배양후기로 갈수록 광합성이 불충분하여 고정능력이 떨어지고 호흡에 의해 CO<sub>2</sub> 농도가 올라가며 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 농도는 배양초기에 높았다가 배양기간이 길어짐에 따라 서서히 감소하고, membrane filter 부착구에서 CO<sub>2</sub>와 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 농도는 배양초기와 후기 모두 낮게 나타났으며 가스 농도의 변화가 적은 것으로 밝혀졌다 (Choi et al. 2004; Kwon et al. 2004).

광에 의한 식물체의 성장반응은 광도와 광원, 광주기에 따라 달라지는데 광도에 관한 초기 연구는 조직이나 기관 분화에 적합한 조건을 찾는데 그쳤으나 (Read 1984) 근래에는 이와 함께 배양실 내에 CO<sub>2</sub>를 인위적으로 공급하는 등 (Fujiwara et al. 1987) 다양한 기내 환경 조절방법과 광도를 복합적으로 이해하려는 연구가 수행되고 있다 (Choi et al. 1999; Kim and Jeong 2003).

본 실험은 도라지의 기내 배양묘 생산에 있어 배양환경을 조절하는 방법으로 membrane filter를 이용한 환기횟수와 광도를 달리 처리하여 식물체의 성장반응을 조사함으로써 건전묘 생산에 효과적인 배양방법을 찾고자 하였다.

## 재료 및 방법

시험재료는 전라북도 농업기술원 시험포에서 채종한 도라지 종자를 사용하였으며 종자소독을 위해 호마이수화제 200배액에 24시간 침치, 세척하고 EtOH 70%에 20초 그리고 락스 75%로 15분간 vacuum 하여 살균한 후 멸균수로 4~5회 수세하여 무균 발아시켜 본엽 2매가 완전 전개되었을 때 뿌리가 절단된 shoot를 치상하였다.

배지는 MS 기본배지에 NAA 0.1 mg/L와 sucrose 3.0%를 첨가한 후 pH 5.8로 조절하고 agar 농도는 0.8%로 하였다. 900 mL 사각 배양병에 배지를 100 mL씩 분주하고 121 °C, 1.2기압으로 고압 멸균하여 사용하였다. 배양용기의 뚜껑에 membrane filter (Pore size 0.5 µm, 직경 18 mm, 필터부 10 mm, Millipore, Japan)를 부착하지 않은 구와 3매 부착한 구로 처리하였는데 이때 Kozai 등 (1986)의 방식에 의해 산출된 환기횟수는 각각 0.1 h<sup>-1</sup>과 4.6 h<sup>-1</sup>이었고 PPF를 33, 66, 99 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (16/8 h, light/dark)로 다르게 처리하였으며, 광원은 백색과 적색형광등을 사용하여 1:1로 조사하였다.

**성장량 조사** : 배양묘의 초장, 엽수, 엽면적, 근수, 근장, 생체중 및 건물중을 배양 30일에 처리별로 9개체씩 3반복으로 조사하였다.

**엽록소 함량 분석** : 배양 30일묘의 신선한 잎 1g을 3반복씩 취하고 acetone 80%로 엽록소를 추출한 후 spectrophotometer (Du 650, Beckman, USA)를 이용하여 분석하였다 (Arnon 1959; MacKinney 1941).

**당 및 전분 함량 분석** : 배양 30일묘의 건물중 0.1g을 3반복씩 취하여 당은 EtOH로, 전분은 과염소산으로 분해한 후 anthrone으로 발색시켜 spectrophotometer (Du 650, Beckman, USA)로 분석하였다 (McCready et al. 1950; Morris 1948).

**기공 및 공변세포 관찰** : 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 EtOH에 탈수시킨 후 isoamyl acetate액으로 치환시켜 critical point drying 방식에 의해 건조하고 금으로 sputter coating하여 scanning electron microscope (JSM-5410LV, Jeol, Japan)로 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

### 성장량 조사

환기횟수와 광도를 달리 처리한 도라지 기내 배양묘의 성장반응을 조사한 결과 (Figure 1), 초장은 PPF 33 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>에서 47~52 mm로 가장 높았으며 66 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>은 37~49 mm, 99 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>은 22~40 mm로 감소하여 광도의 효과가 많았으며 동일한 광도에서 환기횟수 4.9 h<sup>-1</sup>은 0.1 h<sup>-1</sup>에 비해 5~18 mm 길었다. 엽수는 환기횟수 4.9 h<sup>-1</sup>에서 0.1 h<sup>-1</sup>에 비해 1.4~3.2매가 더 많았으며 환기횟수 4.9 h<sup>-1</sup>은 광도의 증가에 의해 1.1매가 많아졌으나 환기횟수 0.1 h<sup>-1</sup>에서는 오히려 0.7매가 감소하였다. 엽면적은 환기횟수 4.9 h<sup>-1</sup>에서 0.1 h<sup>-1</sup>에 비해 1.8~3.7배가 높았으며 환기횟수 0.1 h<sup>-1</sup>은 광도 처리에 의한 효과가 없었으나 환기횟수 4.9 h<sup>-1</sup>은 33 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>에 비해 99 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> 처리에서 높게 나타났다. 근장은 환기횟수 0.1 h<sup>-1</sup>에서는 광도에 상관없이 18~19 mm로 거의 비슷하였으나 4.9 h<sup>-1</sup>에서 33 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>는 18 mm, 99 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>는 36 mm로 나타나 엽면적과 마찬가지로 환기횟수 4.9 h<sup>-1</sup>에서만 광도의 증가에 따라 차이가 나타났다. 근수는 환기횟수 4.9 h<sup>-1</sup>, PPF 99 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>인 처리구에서 5.9개로 많았으나 나머지 처리구에서는 차이가 없었다.

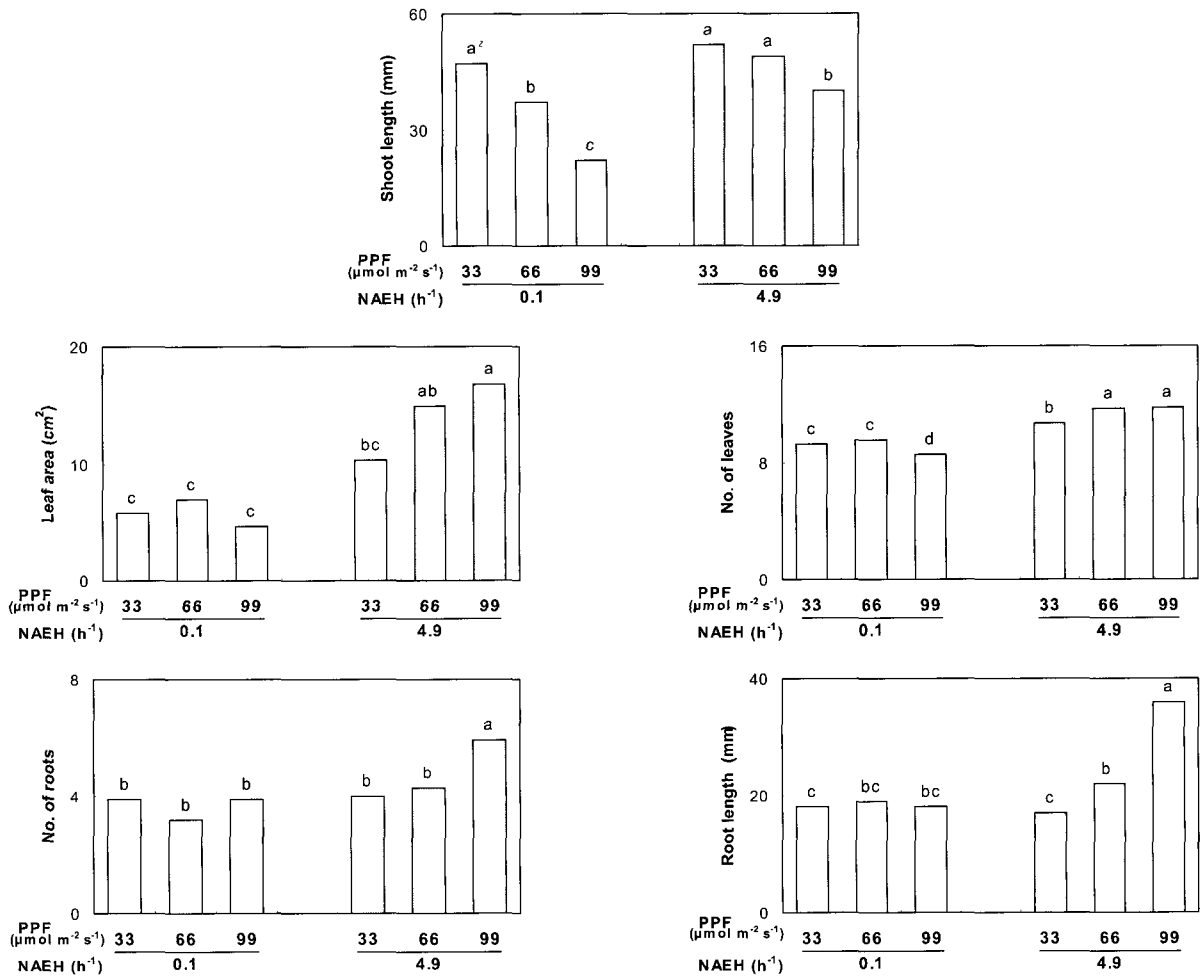


Figure 1. Growth of balloon flower plantlets *in vitro* at 30 days as affected by air exchanges and PPF.

※ NAEH : number of air exchanges per hour of the culture vessel.

※ PPF : Photosynthetic photon flux.

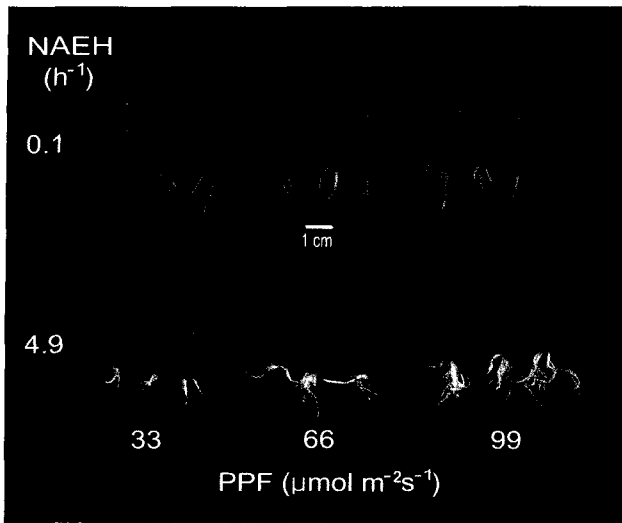
′ Mean separation within columns by DMRT at 5% level.

가스교환이 되지 않는 일반적인 배양환경에서는 1,000~3,000 lux의 낮은 광도가 식물체 증식 (Murashige 1974)이나 발근 (Economou and Read 1986)에 효과적으로 알려져 있으며 Hasegawa 등 (1973)은 1,000 lux에서 아스파라거스 식물의 수가 최대였는데 비해 10,000 lux에서는 기관형성이 억제된다고 하였다. 본 실험에서도 환기횟수 0.1 h<sup>-1</sup>의 경우 2,500 lux에 해당하는 33 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>에서 도라지 기내묘의 생육이 양호하였고 광도가 증가할수록 생육이 좋지 않은 반면 환기횟수를 4.9 h<sup>-1</sup>로 높여주면 광도가 증가할수록 생육이 월등히 좋았다. Kim과 Jeong (2003)은 환기횟수가 높고 PPF 70 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>인 처리구에서 육잡화 배양묘의 생육이 양호하였으며, *syngonium*은 T/R 건물비를 제외한 모든 생육에 광도 효과는 나타나지 않았으나 높은 환기횟수에서 초장, 근장, 생체중, 건물중 및 엽면적이 유의성 있게 커진다고 하였고, Kim과 Jeong (2001)도 *spathiphyllum*의 초장과 최대근장이 PPF보다 환기횟수의 영향을 더 많이 받는다고 하였다. 그러나 Jeong과 Jeong (2002)에 의하면

스타티스의 초장은 CO<sub>2</sub>와 PPF 증가에 의해 거의 영향을 받지 않았다고 하여 다소 다른 결과를 제시하기도 하였다. 또한 Kim과 Jeong (1999)은 봉황국화의 자가영양배양시에는 PPF를 증가시키고 환기횟수를 0.1 h<sup>-1</sup>에서 2.8 h<sup>-1</sup>로 높여주면 소식물체 생장이 매우 촉진된다고 하였으나 이는 자가영양배양의 경우였다.

생육모습을 관찰하였을 때 환기횟수와 광도의 효과가 매우 크게 나타났다 (Figure 2). 환기횟수 0.1 h<sup>-1</sup>에서는 광도가 증가할수록 줄기가 가늘고 잎이 아래로 처지는 현상이 나타났으며 특히 엽수와 엽면적의 감소가 나타났던 99 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> 처리구는 잎의 황화가 심하여 생육이 불량하였다. 반면 환기횟수 4.9 h<sup>-1</sup>에서는 광도가 증가할수록 줄기가 굵고 절간이 단축되었으며 잎도 크고 반듯하게 전개되어 강건해지는 경향이였다.

Kozai 등 (1990)은 *Cymbidium*의 기내 생산에 있어 CO<sub>2</sub> 공급과 높은 광도가 광합성을 촉진시켜 유식물체는 엽록소가 많아져 광독립영양체계를 지니게 된다고 하였다. 본 실험



**Figure 2.** Balloon flower plantlets *in vitro* at 30 days as affected by air exchanges and PPF.

※ NAEH : number of air exchanges per hour of the culture vessel.

※ PPF : Photosynthetic photon flux.

험에서 도라지 배양묘도 환기횟수와 광도 증가에 의해 생육이 양호하여 이들 배양조건이 광독립영양체계를 갖추는데 효과적으로 작용한 것으로 보인다.

생체중과 건물중을 조사한 결과 (Table 1), 동일한 광도에서 생체중은 환기횟수 4.9 h<sup>-1</sup>이 0.1 h<sup>-1</sup>보다 1.9~4.2배가

높았으며, 환기횟수 4.9 h<sup>-1</sup> 처리구는 PPF를 33 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>에서 99 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>로 증가시켰을 때 생체중은 206.0 mg에서 456.8 mg으로 높아졌으나 환기횟수 0.1 h<sup>-1</sup>에서는 광도에 의한 효과가 나타나지 않았다. 건물중 역시 동일한 결과였으며 함수율은 환기횟수 0.1 h<sup>-1</sup>에서 90.5~91.8%인 반면 환기횟수 4.9 h<sup>-1</sup>에서는 84.9~86.6%로 4.2~5.8%가 감소되어 환기횟수 증가에 의해 건전한 묘가 형성되었다.

본 실험과 유사한 결과로 Kim과 Jeong (2001)도 PPF 70과 150 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> 두 처리 모두 환기횟수가 0.1 h<sup>-1</sup>에서 2.8 h<sup>-1</sup>로 증가하였을 때 *spathiphyllum* 지상부 무게가 증가하였는데 그 효과는 PPF 70 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>에서 높았으며 PPF보다는 환기횟수의 영향이 크다고 하였다. Kozai와 Sekimoto (1988)도 딸기의 배양에 있어 환기가 가능한 배양용기를 사용했을 때 기내 CO<sub>2</sub> 농도는 100~300 ppm으로 기외보다 낮았으며 건물중은 높은 PPF와 환기횟수 처리에서 많았다고 하였다.

**엽록소 함량 분석**

배양 30일묘의 생체중 1g 당 총 엽록소 함량은 동일한 광도 조건일 때 환기횟수 4.9 h<sup>-1</sup>에서 0.1 h<sup>-1</sup>에 비해 0.27~0.79 mg/g F.W.가 높았으며 환기횟수 4.9 h<sup>-1</sup>에서는 광도의 증가에 따른 효과가 나타나지 않았다 (Table 2). 그러나 환

**Table 1.** Fresh and dry weight of balloon flower plantlets *in vitro* after 30 days of culture as affected by air exchanges and PPF

NAEH <sup>z</sup> (h <sup>-1</sup> )	PPF <sup>y</sup> (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	Fresh weight (mg)	Dry weight (mg)	Water content (%)
0.1	33	106.1 ± 6.7 d <sup>x</sup>	8.7 ± 0.6 d	91.8
	66	122.7 ± 7.9 d	11.7 ± 0.7 d	90.5
	99	108.8 ± 5.2 d	10.0 ± 0.3 d	90.8
4.9	33	206.0 ± 14.2 c	28.8 ± 1.7 c	86.0
	66	326.8 ± 24.8 b	49.4 ± 2.1 b	84.9
	99	456.8 ± 34.5 a	61.1 ± 4.8 a	86.6

<sup>z</sup> Number of air exchanges per hour of the culture vessel.

<sup>y</sup> Photosynthetic photon flux.

<sup>x</sup> Mean separation within columns by DMRT at 5% level.

**Table 2.** Chlorophyll content of balloon flower plantlets *in vitro* after 30 days of culture as affected by air exchanges and PPF

NAEH <sup>z</sup> (h <sup>-1</sup> )	PPF <sup>y</sup> (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	Content of			Chlorophyll a/b ratio
		total chlorophyll (mg/g F.W.)	chlorophyll a (mg/g F.W.)	chlorophyll b (mg/g F.W.)	
0.1	33	1.84 b <sup>x</sup>	1.34 b	0.50 b	2.74 a
	66	1.48 c	1.08 c	0.40 c	2.69 a
	99	1.38 c	1.03 c	0.35 c	2.91 a
4.9	33	2.11 ab	1.55 ab	0.56 a	2.74 a
	66	2.27 a	1.65 a	0.62 a	2.67 a
	99	2.16 a	1.59 a	0.57 a	2.79 a

<sup>z</sup> Number of air exchanges per hour of the culture vessel.

<sup>y</sup> Photosynthetic photon flux.

<sup>x</sup> Mean separation within columns by DMRT at 5% level.

기윳수 0.1 h<sup>-1</sup>은 33 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> 처리구에서 1.84 mg/g F.W. 이었으나 99 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> 처리구에서 1.38 mg/g F.W.로 오히려 감소하였다. 엽록소 a, b 함량도 총 엽록소 함량과 비슷한 결과를 보였으며 엽록소 a/b율은 생육이 가장 부진하였던 환기윳수 0.1 h<sup>-1</sup>의 99 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> 처리구에서 나머지 처리구보다 2.91로 높게 나타났으나 통계적인 유의성은 없었다. 이 결과로 membrane filter를 부착하지 않는 일반적인 기내환경에서 도라지 배양묘를 높은 광도에 처리하면 오히려 황변과 엽소에 의한 엽록소 함량의 감소로 생육이 저하되기 때문에 적합한 광도는 33 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>로 생각되었으며 환기윳수 4.9 h<sup>-1</sup>의 경우 고광도 99 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>에서도 생육이 양호하였으므로 더 높은 광도에 대한 반응을 조사해야 할 것으로 생각된다.

근래 배양 용기 내 가스교환에 관한 연구가 이루어지면서 배양묘는 스스로 충분한 광합성능을 획득할 수 있음이 밝혀졌으며 Lee 등 (1985)은 sweetgum 배양묘의 광포화점이 PPF 350~450 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>라 하였다. 또한 Kim과 Jeong (2003)은 옥잠화와 syngonium의 엽록소 함량이 PPF보다 환기윳수의 영향을 더 크게 받는다고 하였는데 이는 본 실험결과와 유사하였다. 딸기 배양묘에서도 엽록소 함량은 광도보다는 환기윳수에 의한 효과가 높았으며, PPF 34.3 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>에서 엽록소 a/b율은 환기윳수가 증가할수록 감소하였으나 133 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>에서는 반대로 나타났으며 (Kozai and Sekimoto 1988) 관엽식물인 *Hedera canariensis*, *Pachira aquatica*, *Ficus benjamina*의 엽록소 함량은 CO<sub>2</sub> 농도에 관계없이 35 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>의 낮은 광도에서 가장 높았다 (Choi et al. 1999).

당 및 전분 함량 분석

환기윳수와 광도를 달리한 후 당 및 전분 함량을 조사한 결과 (Table 3), 환기윳수 4.9 h<sup>-1</sup>은 0.1 h<sup>-1</sup>에 비해 동일한 광도에서 당 함량이 2.0~4.2배 높았다. 또한 환기윳수 4.9 h<sup>-1</sup>에서는 저광도인 33 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>보다 고광도인 99 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>

에서 당 함량이 112.8 mg/g D.W. 더 높았으나 환기윳수 0.1 h<sup>-1</sup>에서는 광도처리에 의한 효과가 없었다. 전분 함량도 비슷한 경향이었으나 환기윳수 0.1 h<sup>-1</sup>의 99 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> 처리구에서는 다른 처리에 비해 감소하였는데 이는 엽면적과 엽록소 함량이 낮아 광합성능이 떨어졌기 때문으로 생각된다.

배양환경은 배지 내 가스 교환과 탄수화물 공급 여부에 따라 타가영양 (heterotrophic)과 광독립영양 (photoautotrophic), 광혼합영양 (photomixotrophic)으로 나누어지는데 (Chung 1995) 본 실험의 환기윳수 4.9 h<sup>-1</sup>은 배지 내 sucrose가 첨가된 광혼합영양으로써 엽록소 함량과 광합성 산물인 당과 전분 함량이 높은 것으로 나타났으며 Lee 등 (2001)도 거베라 배양묘의 광혼합영양에서 타가영양에 비해 탄수화물과 sucrose, glucose, fructose 함량이 높다고 하였다.

또한 환기윳수 0.1 h<sup>-1</sup>의 당 함량은 58.6~68.4 mg/g D.W. 이었으나 환기윳수 4.9 h<sup>-1</sup>에서는 130.7~243.5 mg/g D.W.로 매우 높아 광합성에 의한 식물체 내 당의 전류가 매우 활발히 일어나고 있음을 알 수 있었는데 이 결과 기내에서 광합성능을 향상시키기 위해서 가스교환이 매우 중요한 것으로 보인다.

기공 및 공변세포 관찰

배양용기 내 환기윳수와 광도를 달리하여 잎의 기공 및 공변세포를 관찰한 결과 (Figure 3), 포장에서 자란 도라지 잎과는 달리 기내 배양묘의 잎은 공변세포가 작고 둥글며 부세포의 발달이 미흡하여 조직의 발달이 저조해 보였다. 환기윳수 4.9 h<sup>-1</sup> 처리구는 0.1 h<sup>-1</sup>에 비해 공변세포가 크고 주변 부세포가 잘 발달되어 있었으며 고광도일수록 공변세포의 크기가 다소 커지고 부세포의 발달이 뚜렷하였다. 그러나 광도 처리에 의한 기공의 개폐정도는 큰 차이가 없었다. 특히 환기윳수 4.9 h<sup>-1</sup>의 99 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> 처리구에서 기공 주변의 부세포가 잘 발달되어 있었으나 다른 처리구에서는 부세포 발달이 미흡하여 기공이 돌출되어 보였다. 그러나 환기윳수 0.1 h<sup>-1</sup>은 고광도일수록 공변세포 크기가 크고 기

Table 3. Content of sugar and starch in balloon flower plantlets *in vitro* after 30 days of culture as affected by air exchanges and PPF

NAEH <sup>z</sup> (h <sup>-1</sup> )	PPF <sup>y</sup> (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	Content of	
		sugar (mg/g D.W.)	starch (mg/g D.W.)
0.1	33	64.3 d <sup>x</sup>	30.5 b
	66	68.4 d	32.1 b
	99	58.6 d	26.5 c
4.9	33	130.7 bc	42.1 ab
	66	181.7 ab	59.5 ab
	99	243.5 a	68.9 a

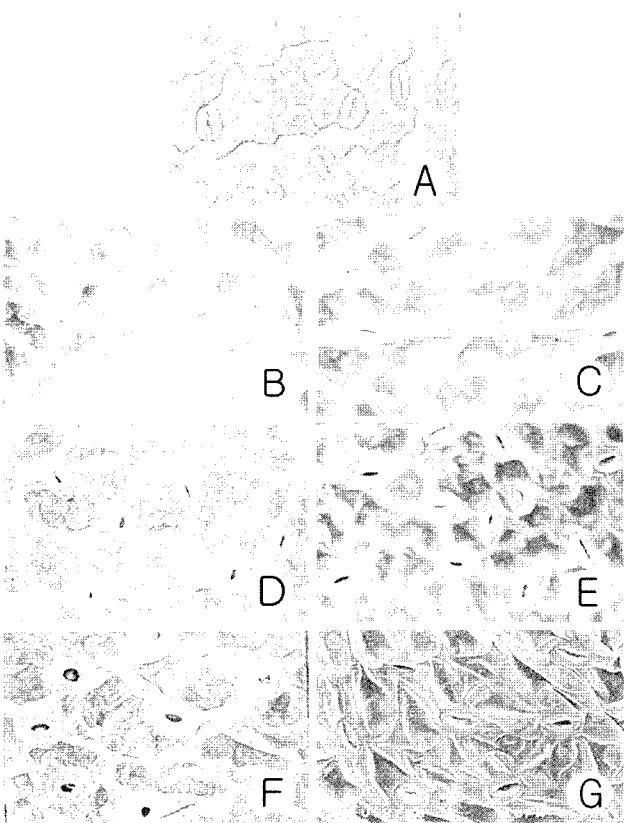
<sup>z</sup> Number of air exchanges per hour of the culture vessel.

<sup>y</sup> Photosynthetic photon flux.

<sup>x</sup> Mean separation within columns by DMRT at 5% level.

공의 수는 작아지는 경향이었으며, 특히 황화가 심하고 잎의 형태가 좋지 않았던  $99 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서는 부세포의 발달이 미흡하고 기공이 많이 열려 있는 상태였다. 이러한 결과로 배양묘를 순화하였을 때 생존율은 상당한 차이가 있을 것으로 생각된다.

Lee 등 (2001)은 거베라를 광혼합영양 조건에서 배양하면 닫힌 상태의 기공과 열린 기공이 혼재하고 잎의 각피층이 다소 발달된 반면 타가영양묘는 잎의 하표피층에 왁스의 결정형이 관찰되지 않았고 기공이 대부분 열려 있다고 보고하였다. 본 실험은 광혼합영양 조건에서 실시되었으며 생육이 가장 좋지 않았던 환기횟수  $0.1 \text{ h}^{-1}$ 의  $99 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 기공이 많이 열려 있었던 것으로 보아 순화시 초기 수분증발량이 많을 것으로 추측되었는데 Paek 등 (1997)은 지황의 조직배양에서 건전묘에 비해 투명묘는 기공이 돌출되어 있고 공변세포나 부세포의 형태가 갖춰있지 않으며 기공이 열려 있음으로 인해 개폐작용 능력을 상실한 것으로 판단하였다. 그러나 광도처리에 따른 배양묘의 기공 형태 비교에 관한 차이는 기존 보고된 바 없다.



**Figure 3.** Scanning electron micrographs of stomata and guard cell on the abaxial surface of balloon flower leaves cultured *in vitro* as affected by air exchanges and PPF. A, Leaf taken from field grown plant; B, D, and F, Leaf in 33, 66,  $99 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  PPF with  $0.1 \text{ h}^{-1}$  NAEH; C, E and G, Leaf in PPF 33, 66,  $99 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  with  $4.9 \text{ h}^{-1}$  NAEH.

※ NAEH : Number of air exchanges per hour of the culture vessel.

※ PPF : Photosynthetic photon flux.

본 실험 결과, 도라지 기내묘의 배양에서 환기횟수  $4.9 \text{ h}^{-1}$ 은  $0.1 \text{ h}^{-1}$ 에 비해 잎의 공변세포가 크고 주변 부세포가 잘 발달되어 있었으며 광도가 증가할수록 생체중, 당과 전분 함량이 높았으나, 환기횟수  $0.1 \text{ h}^{-1}$ 에서는 광도처리에 따른 효과가 적어 건전묘 생산을 위해서 기내 가스교환이 선행된 후 광도를 높여야 할 것으로 생각된다.

## 적 요

기내 배양환경을 조절하여 건전한 유식물체를 획득하기 위해 도라지를 무균밭아시켜 shoot 부분을 NAA  $0.1 \text{ mg/L}$ 가 첨가된 MS 기본배지에 치상한 후 배양용기의 뚜껑위에 membrane filter를 부착하여 환기횟수를 달리하고 광도를 33, 66,  $99 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 처리하여 성장반응을 조사하였다. Membrane filter 부착구의 환기횟수는  $4.9 \text{ h}^{-1}$ 이었으며 미 부착구는  $0.1 \text{ h}^{-1}$ 이었다. 환기횟수  $4.9 \text{ h}^{-1}$  처리구에서  $0.1 \text{ h}^{-1}$  처리구에 비해 전반적으로 생장이 양호하였으며  $0.1 \text{ h}^{-1}$ 에서는 광도가 증가할수록 생장이 저조한 반면  $4.9 \text{ h}^{-1}$  처리구에서는 광도의 증가에 따라 생장이 좋은 경향이였다. 동일한 광도에서 환기횟수  $4.9 \text{ h}^{-1}$  처리구는  $0.1 \text{ h}^{-1}$  처리구에 비해 생체중은 1.9배, 당 함량은 1.4배 이상 높았으며 환기횟수  $4.9 \text{ h}^{-1}$  처리구는 광도의 증가에 따라 생체중과 당 함량이 높아졌으나  $0.1 \text{ h}^{-1}$  처리구는 광도에 의한 효과가 인정되지 않았다. 함수율은 환기횟수  $4.9 \text{ h}^{-1}$  처리구에서  $0.1 \text{ h}^{-1}$  처리구에 비해 4.2~5.8%가 낮았으나 광도 처리에 의한 차이는 없었다. 동일한 광도에서 총 엽록소 함량은 환기횟수  $4.9 \text{ h}^{-1}$  처리구에서  $0.1 \text{ h}^{-1}$  처리구에 비해  $0.27 \sim 0.79 \text{ mg/g F.W.}$ 가 높았으며 환기횟수  $0.1 \text{ h}^{-1}$  처리구는 광도의 증가에 따른 효과가 나타나지 않았으나 환기횟수  $0.1 \text{ h}^{-1}$  처리구는 높은 광도에서 감소하였다. 환기횟수  $4.9 \text{ h}^{-1}$ 는  $0.1 \text{ h}^{-1}$ 에 비해 잎의 공변세포가 크고 주변 부세포가 잘 발달되어 있었다. 특히 PPF  $99 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 환기횟수  $0.1 \text{ h}^{-1}$ 는 부세포의 발달이 미흡하고 기공이 많이 열려 있는 상태인 반면 환기횟수  $4.9 \text{ h}^{-1}$ 는 부세포가 잘 발달된 잎을 지니고 있었다.

## 인용문헌

- Arnon DI (1959) Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol 24: 1-15  
 Choi JI, Hahn EJ, Paek KY (1999) Photosynthetic characteristics and chlorophyll content of *Hedera canariensis*, *Pachira aquatica*, and *Ficus benjamina* in response to photosynthetic photon fluxes and  $\text{CO}_2$  concentrations. J Kor Soc Hort Sci 40: 627-630  
 Choi SR, Kim MJ, Eun JS, Ahn MS, Lim HC, Ryu J, You DH (2004) Effects of membrane filter and sucrose concentrations on the growth of balloon flower (*Platy-*

- codon grandiflorum* A. DC.) plantlets *In Vitro*. Kor J Plant Biotechnol 31: 209-217
- Chung JD (1995) Recent plant biotechnology I. Kyungbuk Univ, Taegu, Korea
- Debergh P (1991) Acclimatization techniques of plants from in vitro. Acta Hort 289: 291-300
- Economou AS, Read PA (1986) Influence of light duration and irradiance on micropropagation of a hardy deciduous azalea. J Am Soc Hort Sci 11: 146-149
- Fujiwara K, Kozai T, Watanabe I (1987) Fundamental studies on environments in plant tissue culture vessels (3) Measurements of carbon dioxide gas concentration in closed vessels containing tissue cultured plantlets and estimates on net photosynthetic rates of the plantlets. J Agr Met 43: 21-30
- Hasegawa PM, Murashige T, Takatori FH (1973) Propagation of asparagus through apex culture. II. Light and temperature requirements, transplant ability of plants and cytohistological characteristics. J Am Soc Hort Sci 8: 143-148
- Jeong GW, Jeong BR (2002) Autotrophic growth of *Limonium* spp. 'Ocean Blue' plantlets in vitro as affected by PPF, NAEH and CO<sub>2</sub> concentration. J Bio Environ Control 11: 115-120
- Kim JS, Jeong BR (2001) Growth, photosynthetic rate and stomatal function of *Spathiphyllum* in vitro as affected by PPF and NAEH. J Kor Hort Sci 42: 351-352
- Kim JS, Jeong BR (2003) Growth of hosta and syngonium in vitro as affected by photosynthetic photon flux and the number of exchange per hour of the culture vessel. J Kor Soc Hort Sci 44: 13-16
- Kim YH, Jeong BR (1999) Autotrophic growth of *Dendranthema grandiflorum* R. 'Bongwhang' plantlets in vitro as affected by PPF, air exchange rate and CO<sub>2</sub> concentration. J Bio-Env 8: 56-66
- Kozai T, Fujiwara K, Giacomelli G (1991) Environmental control in micropropagation. Ann Amer Soc Agr Eng Meeting paper, Chicago, pp 1-13
- Kozai T, Fujiwara K, Watanabe I (1986) Fundamental studies on environments in plant tissue culture vessels (2) Effects of stoppers and vessels on gas exchange rates between inside and outside of vessels closed with stoppers. J Agr Met 42: 119-127
- Kozai T, Oki H, Fujiwara K (1990) Photosynthetic characteristics of *Cymbidium* plantlet in vitro. Plant Cell Tiss Org Cult 22: 205-211
- Kozai T, Sekimoto K (1998) 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 plantlets 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 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 Tissue Culture 28: 117-121
- Lee N, Wetzstein Y, Sommer HE (1985) Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. Plant Physiol 78: 637-641
- MacKinney G (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. J Biol Chem 140: 315-322
- 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
- Murashige T (1974) Plant propagation through tissue cultures. Annu Rev Plant Physiol Acta Hort 36: 206-221
- 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 Tissue Culture 24: 323-327
- Read PE (1984) Environmental effects in micropropagation. In: Ammirato PV, Evans DA, Sharp WR, Bajaj YPS, (eds), *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 5, McGraw-Hill Pub. New York, pp 95-125

(접수일자 2004년 8월 31일, 수리일자 2005년 1월 21일)