

T00151703

국화의 우량 무병묘를 이용한
삼목묘 산업화 기술 개발

Technology for Industrialization of
Chrysanthemum Transplants by Applying
High-Quality Seedlings

연구기관
경북대학교
(영주농업기술센터)

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “국화의 우량 무병묘를 이용한 삼목묘 산업화 기술 개발에 관한 연구”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 6 월 5 일

주관연구기관명 : 경북대학교

총괄연구책임자 : 정 재 동

세부연구책임자 : 정 재 동

연 구 원 : 이 기 운

연 구 원 : 김 창 길

연 구 원 : Allan B. Siano

협동연구기관명 : 영주시 농업기술센터

협동연구책임자 : 이 갑 수

연 구 원 : 박 재 석

요 약 문

I. 제 목

국화의 우량 무병묘를 이용한 삼목묘 산업화 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

국화(*Dendranthema grandiflorum* R. Kitamura)는 장미, 카네이션과 더불어 세계 3대 절화 작물중의 하나로 가을에 개화하는 전형적인 단일식물이다. 또한, 국화는 내한성이 강한 속근초로 절화, 분화 및 화단용으로 생산되고 있으며 1999년도 기준 국화재배 면적은 672.0ha로서 전체 절화재배 면적의 27.8%를 점유하고 있고 생산량은 408백만 분, 생산액은 452억 원에 달하고 있어 농가소득 증대에 크게 기여하고 있는 화훼작물이다(농림부, 1999).

최근 화훼산업은 국민소득의 향상에 따른 꽃 소비 증가 추세와 개방화에 대비한 농가의 안정된 소득원으로서 국제경쟁력 확보가 가능한 산업으로 인식되면서 품질과 생산성이 크게 향상되어 대부분의 화훼작물 수요가 증가추세에 있으며 수출 또한 매년 증가되고 있어 수출농산물로 급부상하고 있다. 특히, 국화재배는 수익성에 있어 전망이 밝으나 재배농가의 가장 큰 문제점은 재배시기가 연중 분산되지 못하고 일정시기에 편중되어 있어 노동력이 집중되고 이로 인하여 재배면적 확대에 제한을 받고 있을 뿐 아니라 수확기의 집중으로 가격폭락의 위험은 물론 단순한 재배작형과 고품질 절화 생산을 위한 재배기술향상에 관한 대책이 필요하다.

이러한 원인의 해결하기 위해서는 묘 생산 전업화를 통한 양질의 우량 삼목묘를 년중 생산 공급하는 것이 가장 중요하다. 왜냐하면 양질의 묘의 사용은 생육과 생산량 및 절화의 품질을 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라 생산비를 대폭 줄일 수 있기 때문이다. 지금까지 국화의 우량종묘생산은 주로 삼목번식에 의한 삼목묘에 의존하여 왔으며 양질의 삼목묘를 생산하기 위해 적정환경 조건(Buwalda and kim, 1994 ; Buwalda et al., 1995 ; Hughes and Tsuvfita, 1981 ; Mackenzie, 1995 ; Yoon and Ahn, 1987; Yoshida et al., 1992), 발근 및 생육촉진(Konishi, 1975 ; Schuch, 1994 ; Shirakawa, 1978), 모주

관리 및 삼수 조제(De Ruiter, 1993 ; Hiens and Wilkins, 1979)등에 관한 연구가 수행되어져 왔다. 그러나 지상부 및 지하부 환경조건을 동시에 최적화시키거나 무병주의 플러그 삼목묘 대량생산기술개발 등에 관한 연구는 거의 없는 편이다. 최근 플러그 삼목묘 생산을 위한 적정환경 조건 구명을 위한 연구는 몇몇 시험연구기관에서 단편적으로 수행되고 있으나 이 또한 삼수 채취를 위한 모주관리 및 채취시기의 제한 등의 문제점이 있는 것이 사실이다.

현재 우리나라 실정에서 볼 때 플러그묘 생산 체계가 국화의 경우는 거의 없는 실정이므로 삼목묘를 이용한 종묘 생산 보급형태의 실용화는 물론 산업화 위한 방안이 시급한 실정이다. 영양번식에 의존하는 국화의 경우 종자과중으로 이루어지는 작물과는 구분되어 종묘생산체계가 이루어져야 할 것이므로 먼저 외부와는 격리되어 바이러스의 감염위험을 줄일 수 있는 방법이 모색되고, 묘의 균일도를 높이고 다양한 재배일정을 맞추기 위한 생산 및 공급체계가 확립되어야 하며, 성장속도가 빠른 묘의 생리기작에 대한 대처능력 등에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다. 또한 노동집약적인 우리나라 재배형태로 볼 때 공간 이용효율을 높일 수 있는 생산 자동화는 필수요건이라고 볼 수 있다.

따라서 본 연구에서는 앞서 2001년도에 이미 보고 된 바가 있는 ‘고부가 고품질의 화훼종묘 생산효율향상을 위한 신기술 개발’에서 얻은 결과를 토대로 ‘연속 순환식 자동 식물배양 시스템’(특허 제 0303893호)을 이용, 무병주 국화 삼목묘의 대량 생산기술을 개발하여 첫째, 생산 효율성 증가 및 생산비 절감을 통한 고효율 종묘 생산체계를 구축하고 둘째, 농가실증시험을 통한 새로운 공정육묘 체계를 확립함으로써 우량 삼목묘의 실용화 및 산업화를 이룩하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

국화의 플러그 삼목묘를 이용한 자동화 공정육묘 생산기술을 개발의 핵심은 자동화 배양기내 자동조절된 배양환경조건을 이용하여 삼목묘의 지상부 및 지하부 환경조건을 동시에 최적화시키고 조직배양에 의해 생산된 무병주로부터 1회 삼수를 채취한 다음 배양기내에서 연속으로 우량 플러그 삼목묘를 대량생산하는데 있다. 또한, 감자가 경삼

에 매우 용이한 점을 활용하여 기내 바이러스 무독의 미세번식 묘종을 자동화배양기내 플러그 셀에 바로 삽목하여 7~10일 마다 연속적으로 대량생산하여 바로 정식이 가능한 플러그 삽목묘를 양성하고자 하였다.

가. 무병묘 생산 체계확립 및 자동화배양 증식효율 향상을 위한 배양기술 구명

본 실험에 사용될 국화의 무병주 생산체계를 확립하고자 성장점배양에 적합한 배지 조건 및 배양방법을 구명하고 아울러 열처리와 항바이러스제를 병행 처리함으로써 무병주생산 효율을 향상시키고자 한다. 기내에서 생산된 무병주는 바이러스 검정을 통하여 일차적으로 바이러스 감염여부를 확인한 다음 자동화배양기내에서 대량증식을 위한 재료로 활용코자 한다. 또한, 본 연구에서 활용할 연속순환배양기(특허 : 0303893호)의 시스템 기본개념은 배양을 단순화 또는 효율화하여 경비를 절감하고 타가영양(heterotrophic)과 혼합영양(mixotrophic) 상태의 배양체를 광자가 영양(photoautotrophic)상태로 전환시킴으로써 저가이면서 묘 소질이 우량한 유묘를 대량 증식하는데 있다. 본 연구진에서 기 고안한 자동화 배양기는 환경조절(온도, 광도, 습도, CO₂농도, 공기 순환)이 가능하도록 하여 기내(in vitro)에서 배양된 유식물을 배양 chamber(ex vitro)내로 이식했을 때 stress를 최소화하여 조기 활착에 필요한 환경조건을 설정할 수 있도록 고안되어져 있다.

따라서 성장점 배양을 통해 일차적으로 얻어진 기내 무병 종묘를 이용하여 배양기내에서 증식재료의 재 확보 및 플러그 삽목묘의 연속적인 대량생산에 필요한 환경조건을 설정하고 아울러 자동화 배양기의 대형화 및 공장화에 적합한 다양한 배양 환경조건을 구명하고자 한다.

나. 플러그 삽목묘 재배·관리기술 개발

플러그 삽목묘를 포장에서 사용될 수 있기 위해서 필요한 가장 중요한 조건은 균일성과 강건성이다. 플러그묘는 어리고 고밀도하에서 육묘되기 때문에 환경에 매우 민감하게 반응하며 쉽게 절간 신장이 일어난다. 따라서 플러그묘의 절간신장억제를 위한 연구로 화학적 방법이 많이 사용되고 있는데 paclobutrazol과 uniconazol과 같은 성장조절제가 절간신장억제 효과가 있었다는 예비실험을 기초로 하여 균일하고 강건한 국화 플러그 삽목묘 생산기술을 개발을 위해 보다 많은 종류의 성장조절제를 처리하여 처리시

기, 농도 및 처리횟수 등을 구명하고자 한다. 뿐만 아니라 플러그 삽목묘의 품질에 미치는 온도, 시비, 관수, 광(광도, 일장, 광질) 등에 대한 요인들에 대하여 최적조건을 구명하고 한다. 또한 적정 육묘온도 및 주야간온도차 등을 구명하고 온도와 화학적처리를 혼합 처리함으로써 고품질 플러그 삽목묘 생산에 효율성을 높이는 방안을 강구하고자 한다.

다. 플러그 삽목묘의 포장생산력 검토

생산된 플러그 삽목묘는 재배작형별로 수량성과 품질 등을 조사한다. 진딧물방제를 위해서 주기적(10~15일 간격)으로 방제약제를 살포하며 포장의 퇴비 양은 10a 당 1.5 톤, 화학비료는 N-P-K = 11 - 11 - 17(kg/10a)을 시용하고, 생육특성 조사 및 기타 재배법은 농촌진흥청 표준 재배법에 준한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

자동화배양기를 이용한 국화 무병묘의 대량생산 체계를 확립하고 다양한 배양환경에 대한 실험을 수행하였다.

경정배양 또는 항바이러스제와 병행한 경정배양방법을 통해 CVB바이러스를 100% 제거할 수 있었다. 경정배양만을 하였을 경우 생존율이 80%로 가장 높았으며 Ribabirin 또는 Amantadine을 병행하여 처리하였을 때 상대적으로 생존율은 낮았으나 바이러스 제거율은 높았다. 경정배양으로부터 형성된 single shoot로부터 다신초형성에는 kinetin 2 mg/L와 NAA 0.02 mg/L가 첨가된 배지에서 촉진되었으며 신초당 평균 18.6개의 새로운 신초가 형성되었다. 광자가영양배양과 혼합영양배양한 유묘는 타가영양배양한 유묘에 비하여 초장, 마디수 및 경경이 모두 증가하였으며, 생체중과 건물중은 2배 이상 증가하는 것으로 나타났다. 특히, 광자가영양배양한 유묘의 초장이 가장 길었고 마디수도 다른 배양방법에 비하여 많아져 자동화배양기내에서 삽목에 의한 배양체 재증식에 유리할 것으로 판단되었다. 뿐만 아니라, 모든 배양방법에서 CO₂를 시비하는 것이 무처리에 비해 생육이 양호하였으며 엽록소의 함량도 증가하는 것으로 나타났다.

국화 증식효율 향상을 위한 자동화 배양기술 연구에서는 기내배양묘의 자동화배양기

로의 삽목은 기내배양 30일묘를 사용하는 것이 가장 좋은 것으로 나타났다. 상토처리는 TKS2:PL =6:4에서 수분 공급 시간에서는 TKS2:PL=6:4처리구에 70ml/tray/4hr처리구가 주야온도차에서는 23/20℃에 TKS2:PL=6:4, TKS2:PL=7:3, 광도는 1,500lux 처리에 TKS2:PL=7:3처리가 그리고 삽목 후 20일이 근수, 근장, 엽장 생장이 촉진되었다. 플러그 삽목묘의 수량성 조사에서는 IBA 처리구가 근장이 가장 길었으며 근수, 생체중과 발근율도 높았다. 플러그 셀 128구에서 TKS2:PL=7:3와 TKS2:PL=6:4는 전반적 생육이 좋았다. '백선'에서 삽수를 10회 채취시 경장이 6.5±0.4로 1회처리 보다도 15%이상 신장하였고 경장도 17%이상 신장하였다. 국화 엽과 줄기에 Paclobutrazol 10mg/L⁻¹회 처리구에서는 건물중이 424.5±11.7로 무처리구보다 5.4% 증가하였고 5mg/L⁻¹ 2회처리에서는 435.4±11.4로 8.2%나 증가하였다. 삽목묘와 플러그묘 생산비 경제성분석 결과는 삽목묘 처리구에서의 생산비 원가는 34.8원이고 플러그묘는67원으로 32.2원 높게 나왔다. 재배실증 시험은 평균 생산절화량은 50,000본/300평, 수익은 8,970천원/300평으로 조사 되었다. 국화 'Baekwha'에서 셀 크기, 시비농도 및 시기는 정식 후 30일까지는 생존율, 경장, 경경, SPAD에서 초기 활착과 토양환경 적응차이로 처리간 차이가 있으나 60일, 100일뒤에는 경장과 경경이 차이가 없었다.

2. 활용에 대한 건의

자동화배양기를 이용한 국화 shoot의 대량증식 시스템은 국화 뿐만아니라 묘의 안정적인 공급을 필요로 하는 주요 원예작물의 공정묘 생산에 유용하게 활용할 수 있고 특히, 관엽식물, 팔레놉시스, 거베라, 탈라, 사과, 포도 등의 원예작물의 경우, 농민이나 묘 공급업자들이 필요로 하는 만큼의 균일한 소질의 묘를 적절한 시기에 공급할 수 있어 묘 생산의 산업화가 가능할것으로 기대된다.

현재 조직배양의 국제적 추세는 배양환경 개선 및 scale up생산 시스템 과 자동화를 통한 공정묘(transplant)생산으로 바뀌고 있다. 이런점에서 국내에서는 생물반응기를 이용한 scale up 생산에 관한 보고외에 자동화 생산 시스템에 관한 묘의 고품질 및 대량 생산에 관한 연구는 전무한 실정이다. 본 연구 결과를 기존의 국화 삽수 생산 방법(기외 이식 후 동일한 식물체에서 지속적으로 삽수를 생산)을 대체하는 새로운 묘 생산에 적용한다면 생산기간, 노동력을 줄이고 항상 일정한 소질의 고품질묘를 생산자에게 필요한 시기에 공급할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 자동화배양기를 이용한 생산 시스

템은 국화묘의 생산뿐만 아니라 single shoot 또는 multiple shoot를 증식에 이용하는 다양한 원예작물(거베라, 칼라, 팔레놉시스, 감자, 사과 등)의 증식에 다양하게 활용할 수 있기 때문에 현재 가장 문제시되고 있는 공정묘 생산체계를 새롭게 확립할 수 있다고 판단된다. 따라서 본 연구를 통하여 개발된 플러그 삽목묘의 실용화는 첫째, 국화 우량종묘의 주년 안정생산 공급 모델로 활용이 가능할 것이며 자동화와 관련된 기술은 특허출원이 가능할 것이고, 둘째, 저렴한 가격의 국화 우량 종묘가 국내 재배작형에 따라 수요자 주문방식의 생산공급이 가능하게 됨으로써 생산성 및 품질면에서 국제 경쟁력을 제고시킬 수 있을 것이며. 셋째, 조직배양묘의 조기 활착기술 및 자동화 배양기내에서의 급속 대량증식 생산기술개발 연구는 공장형 공정육묘 생산 시스템의 실용화를 위한 기초자료로 유용하게 활용되어질 수 있을 것이다.

SUMMARY

(영문 요약문)

The main objective of this study was to establish an efficient production system for pathogen-free stocks of chrysanthemum. This was achieved by establishing shoot tip culture for virus elimination and multiplication of propagules, improvement of the different culture conditions in vitro, and the use of an automatic culture chamber for mass propagation of materials. Then, the transplants were finally transferred to field to determine growth and flower quality compared with those of conventionally produced chrysanthemum plants. The results are as follows;

1. Establishment of shoot tip culture and chemotherapy for virus elimination, and multiplication of propagules

Virus elimination through tissue culture techniques has been successful in many plant species. ELISA test showed that 100% of the cultured chrysanthemums were freed from CVB after shoot tip culture and chemotherapy. The results indicate that shoot tip culture alone is effective in eliminating CVB. But the result would not give clear conclusion if the addition of antiviral chemicals was also effective in virus elimination, since the shoot tip culture technique alone already obtained 100% virus elimination. The presence of plant growth regulators (PGRs) in the culture medium greatly enhanced the growth of the shoots. MS medium supplemented with 0.02 mg/L NAA and 1.0 mg/L Kinetin had the greatest number of roots. Treatments with either BA or TDZ totally suppressed rooting. Rooting was only achieved after transferring the plantlets to PGR-free medium or with low to moderate level of NAA.

Shoots that developed from the subcultured multiple shoot clumps were observed to originate from axillary and/or adventitious buds. MS medium supplemented with 2.0 mg/L Kinetin and 0.02 mg/L NAA formed loosely arranged multiple shoots and obtained the highest shoot number.

2. Improvement of Culture Conditions In vitro

Shoot and single node explants of *Chrysanthemum* cv. Viking inoculated in MS medium supplemented with 4.0 mg/L GA₃ obtained the longest shoot and internode length. The experiment showed that supplementation of low level kinetin in the culture medium promoted the growth of shoots and axillary buds. It was observed that as culture density increased the values of the different growth parameters decreased. It was also observed in the experiment that the position of the node on the plant exhibited different growth responses of shoots from the axillary buds in vitro. Growth was highest in nodes at the upper portion of the plant. In general, photoautotrophic culture enriched or non-enriched with CO₂ drastically improved the growth of chrysanthemum when compared to heterotrophic culture. Significant difference was observed between different culture methods with regards to stomatal characteristics. Shoot length, leaf area and internode length were markedly improved in photoautotrophically cultured plantlets under CO₂ enrichment.

3. Mass Propagation of Pathogen-free Stocks in Automatic Culture Chamber

The plantlet stage for transfer in an automatic culture system was observed to be an important factor. Plantlets transferred 30 and 45 days after in vitro culture for both *Chrysanthemum* cvs. Viking and UFO showed better results in different growth parameters than plantlets from 0 days. Shoot elongation and node formation was favored in 45 day old plantlets in peatmoss:vermiculite medium and peatmoss:perlite medium for both *Chrysanthemum* cvs. Viking and UFO cultivars. In *Chrysanthemum* cv. Viking, leaf area was highest in peatmoss:vermiculite at 30 and 45 day old plantlets. While in *Chrysanthemum* cv. UFO, leaf area was largest in peatmoss:vermiculite in 45 day old plantlets. For *Chrysanthemum* cvs. Viking and UFO, stem diameter exhibited better growth in peatmoss:vermiculite combination. The greatest number of roots formed were observed in peatmoss:perlite at 45 days for both *Chrysanthemum* cvs. Viking and UFO. While peatmoss:vermiculite combination at 45 days obtained the longest root. Root

diameter on the other hand, was favored in peatmoss:perlite combination for Viking and vermiculite:perlite for UFO. Chlorophyll formation in Chrysanthemum cvs. Viking and UFO cultivars was greatest in peatmoss:perlite combination at 45 days and 30 days, respectively. Survival rate was highest in peatmoss:perlite combination for all plant stages while it is lowest in vermiculite:perlite combination at 0 day.

4. Improved production system of pathogen-free stocks of chrysanthemum

Based on the results of the experiments, an efficient and improved production system for virus elimination in chrysanthemum could be achieved by the use of shoot tip culture. Further multiplication of the virus-free materials is possible through multiple shoot proliferation in MS medium with Kinetin and NAA combination. Survival and quality of the planting materials could be improved with the use of photoautotrophic culture. Lastly, subsequent culture of plant materials in an automatic culture chamber would reduce cost and also improve the efficiency of production.

4. Field test of pathogen-free stocks of chrysanthemum produced by automatic culture system

Culture media of TKS2:PL =6:4 , TKS2:PL=6:4 of 70ml/tray/4hr, TKS2:PL=6:4 and TKS2:PL=7:3 of 23/20°C and TKS2:PL=7:3 of 1,500lux were favorable in root formation, increasing the length and dry weight of roots. Growth and survival of the plantlets were observed 20days after cutting. To investigate the quantity of treatment IBA on cuttings and culture media of TKS2:PL=7:3 and TKS2:PL=6:4 in 128tray were favorable in root formation, increasing the length of stem, number of root and fresh weight. The number of 10times on cuttings Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*), 'Baeksun' were 15% faster growth than one time. To investigate the effects of Paclobutrazol composition on rooting and growth of cuttings in Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) dry weight were increased

5.5%, 8.2% more than control.

Comparative analysis cost of cuttings and plug, The results in this study indicate that may increase 32.2won of cost 67won plugs than 34.8won in cutting. An actual proof of culture plug was produced 50,000plants/10a and 8,970won/10a. According to cell, density, period in 'Baekwha' were difference in

Rate of survival, no.of leaves, stem length, stem width and SPAD within 30days. but after 60, 100days were no difference stem length, stem width.

These results indicated that chrysanthemum plantlets in the microponic system could grow better with shorter period than those in the micropropagation system.

CONTENTS

(영 문 목 차)

SUMMARY	1
Chapter I. Outline of the research project	15
Section 1. Necessity of the research	15
Section 2. Research goals and scope	18
Chapter II. Present status of domestic and foreign research	20
Section 1. Present status of research	20
Section 2. problems of related research	20
Chapter III. Research details and results	22
Section 1. Establishment of automated technology for production of transplant	22
1. Materials and methods	22
1-1. Mass production of chrysanthemum virus-free stocks	22
1) Shoot tip culture and chemotherapy for virus elimination	22
2) Establishment of diagnostic for chrysanthemum virus	23
3) Mass production of virus-free stocks via shoot tip culture	24
4) Effects of culture methods, photoautotrophic, photomixotrophic and heterotrophic culture on the growth of Chrysanthemum	25
1-2. Mass production of virus-free stocks by applying automatic culture chamber	26
1) Optimal transplanting date for production of Chrysanthemum cuttings in automatic culture chamber	26
2) Effect of nodal position on growth of chrysanthemum propagules in automatic culture chamber	27
3) Effect of different level of PPFD on growth of chrysanthemum propagules in automatic culture chamber	27
4) Effect of different substrate, DIF and irrigation time on growth of chrysanthemum propagules in automatic culture chamber	28
5) Effect of PGR and different size of plug tray on growth of chrysanthemum propagules in automatic culture chamber	29
6) Effect of different harvesting time on growth of chrysanthemum propagules in automatic culture chamber	30
7) Comparison of transplants as affected by different culture methods	30
2. Results and discussion	31
1-1. Mass production of chrysanthemum virus-free stocks	31

1) Shoot tip culture and chemotherapy for virus elimination	31
2) Establishment of diagnostic for chrysanthemum virus	32
3) Mass production of viru-free stocks via shoot tip culture	35
4) Effects of culture methods, photoautotrophic, photomixotrophic and heterotrophic culture on the growth of Chrysanthemum	42
1-2. Mass production of viru-free stocks	47
by applying automatic culture chamber	47
1) Optimal transplanting date for production of Chrysanthemum cuttings in automatic culture chamber	52
2) Effect of nodal position on growth of chrysanthemum propagules in automatic culture chamber	53
3) Effect of different level of PPFD on growth of chrysanthemum propagules in automatic culture chamber	54
4) Effect of different substrate, DIF and irrigation time on growth of chrysanthemum propagules in automatic culture chamber	58
5) Effect of PGR and different size of plug tray on growth of chrysanthemum propagules in automatic culture chamber	62
6) Effect of different harvesting time on growth of chrysanthemum propagules in automatic culture chamber	63
7) Comparison of transplants as affected by different cuture methods	65
Section 2. Yield test of chrysanthemum transplant	65
1. Materials and methods	65
1-1. Economic analysis of rotted cuttings and transplans	65
1-2. Filed test of chrysanthemum transplant	67
2. Results and discussion	67
1-1. Economic analysis of rotted cuttings and transplans	69
1-2. Filed test of chrysanthemum transplant	75
Chapter IV. Accomplishment of research and contribution to the related field	75
Section 1. Achivement degree of research and development	75
Section 2. Contribution to related field	76
Chapter V. Application plan of the research results	77
Chapter VI. Foreign research results related to this study	78
Chapter VII. References	81

목 차

요 약	1
제 1 장 연구개발과제의 개요	15
제 1 절 연구개발의목적 및 필요성	15
제 2 절 연구개발 범위	18
제 2 장 국내외 기술개발 현황	20
제 1 절 기술개발 현황	20
제 2 절 관련기술의 문제점	20
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	22
제 1 절 자동화 공정육묘 생산 기술 확립	22
1. 재료 및 방법	22
가. 국화 기내 무병주 생산체계확립	22
1) 바이러스제거를 위한 경정배양과 화학물질처리	22
2) 국화 바이러스 진단체계를 확립	23
3) 경정배양에 의한 무병주 대량증식	24
4) 광자가영양, 혼합영양, 타가영양배양방법간 CO ₂ 시비유무에 따른 국화 무병묘의 생육특성	25
나. 자동화배양기를 이용한 국화 기내 무병주 대량 생산	26
1) 자동화배양기내 국화 삼목묘 생산을 위한 기내 배양묘 적정이식 시기 구명	26
2) 자동화배양기내 국화 삼목시 nodal position에 따른 국화 묘의 생장	27
3) 자동화배양기내 광양자속밀도(PPFD)가 국화 묘의 생장에 미치는 영향	27
4) 상토종류 및 주야온도차와 상토종류와 수분 공급 시간이 삼목묘 생육에 미치는 영향	28
5) 성장조절제 및 플러그셀크기가 삼목묘 생육에 미치는 영향	29
6) 자동화배양기내 삼목묘 삼수 횟수에 따른 생육특성	30
7) 자동화배양기에서 생산된 묘와 관행 배양방법과의 비교	30
2. 결과 및 고찰	31
가. 국화 기내 무병주 생산체계확립	31

1) 바이러스제거를 위한 경정배양과 화학물질처리	31
2) 국화 바이러스 진단체계를 확립	32
3) 경정배양에 의한 무병주 대량증식	35
4) 광자가영양, 혼합영양, 타가영양배양방법간 CO ₂ 시비유무에 따른 국화 무병묘의 생육특성	42
나. 자동화배양기를 이용한 국화 기내 무병주 대량 생산	47
1) 자동화배양기내 국화 삽목묘 생산을 위한 기내 배양묘 적정이식 시기 구명	47
2) 자동화배양기내 국화 삽목시 nodal position에 따른 국화 묘의 성장	52
3) 자동화배양기내 광양자속밀도(PPFD)가 국화 묘의 성장에 미치는 영향	53
4) 상토종류 및 주야온도차와 상토종류와 수분 공급 시간이 삽목묘 생육에 미치는 영향	54
5) 성장조절제 및 플러그셀크기가 삽목묘 생육에 미치는 영향	58
6) 자동화배양기내 삽목묘 삽수 횟수에 따른 생육특성	62
7) 자동화배양기에서 생산된 묘와 관행 배양방법과의 비교	63
제 2 절 플러그 삽목묘 생산력 검토	65
1. 재료 및 방법	65
가. 기존 삽목묘와 자동화배양 삽목묘간 경제성 분석	65
나. 삽목묘 재배실증 시험	65
2. 결과 및 고찰	67
가. 기존 삽목묘와 자동화배양 삽목묘간 경제성 분석	67
나. 삽목묘 재배실증 시험	69
제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도	75
제 1 절 연구개발 목표의 달성도	75
제 2 절 연구개발 관련분야에의 기여도	76
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	76
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	78
제 7 장 참고문헌	81

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

국화(*Dendranthema grandiflorum* R. Kitamura)는 장미, 카네이션과 더불어 세계 3대 절화 작물중의 하나로 가을에 개화하는 전형적인 단일식물이다. 또한, 국화는 내한성이 강한 숙근초로 절화, 분화 및 화단용으로 생산되고 있으며 1999년도 기준 국화재배 면적은 672.0ha로서 전체 절화재배 면적의 27.8%를 점유하고 있고 생산량은 408백만 본, 생산액은 452억 원에 달하고 있어 농가소득 증대에 크게 기여하고 있는 화훼작물이다(농림부, 1999).

최근 화훼산업은 국민소득의 향상에 따른 꽃 소비 증가 추세와 개방화에 대비한 농가의 안정된 소득원으로서 국제경쟁력 확보가 가능한 산업으로 인식되면서 품질과 생산성이 크게 향상되어 대부분의 화훼작물 수요가 증가추세에 있으며 수출 또한 매년 증가되고 있어 수출농산물로 급부상하고 있다. 특히, 국화재배는 수익성에 있어 전망이 밝으나 재배농가의 가장 큰 문제점은 재배시기가 연중 분산되지 못하고 일정시기에 편중되어 있어 노동력이 집중되고 이로 인하여 재배면적 확대에 제한을 받고 있을 뿐 아니라 수확기의 집중으로 가격폭락의 위험은 물론 단순한 재배작형과 고품질 절화 생산을 위한 재배기술향상에 관한 대책이 필요하다.

이러한 원인의 해결하기 위해서는 묘 생산 전업화를 통한 양질의 우량 삽목묘를 년중 생산 공급하는 것이 가장 중요하다. 왜냐하면 양질의 묘의 사용은 생육과 생산량 및 절화의 품질을 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라 생산비를 대폭 줄일 수 있기 때문이다. 지금까지 국화의 우량종묘생산은 주로 삽목번식에 의한 삽목묘에 의존하여 왔으며 양질의 삽목묘를 생산하기 위해 적정환경 조건(Buwalda and kim, 1994 ; Buwalda et al., 1995 ; Hughes and Tsuvfita, 1981 ; Mackenzie, 1995 ; Yoon and Ahn, 1987; Yoshida et al., 1992), 발근 및 생육촉진(Konishi, 1975 ; Schuch, 1994 ; Shirakawa, 1978), 모주관리 및 삽수 조제(De Ruiter, 1993 ; Hiens and Wilkins, 1979)등에 관한 연구가 수행되어져 왔다. 그러나 지상부 및 지하부 환경조건을 동시에 최적화시킨다거나 무병주의 플러그 삽목묘 대량생산기술개발 등에 관한 연구는 거의 없는 편이다. 최근 플러그 삽목묘 생산을 위한 적정환경 조건 구명을 위한 연구는 몇몇 시험연구기관에서 단편적으로 수행되고 있으나 이 또한 삽수 채취를 위한 모주관리 및 채취시기의 제한 등의 문

제점이 있는 것이 사실이다.

현재 우리나라 실정에서 볼 때 플러그묘 생산 체계가 국화의 경우는 거의 없는 실정 이므로 삼목묘를 이용한 종묘 생산 보급형태의 실용화는 물론 산업화 위한 방안이 시 급한 실정이다. 영양번식에 의존하는 국화의 경우 종자과중으로 이루어지는 작물과는 구분되어 종묘생산체계가 이루어져야 할 것이므로 먼저 외부와는 격리되어 바이러스의 감염위험을 줄일 수 있는 방법이 모색되고, 묘의 균일도를 높이고 다양한 재배일정을 맞추기 위한 생산 및 공급체계가 확립되어야 하며, 성장속도가 빠른 묘의 생리기작에 대한 대처능력 등에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다. 또한 노동집약적인 우리나라 재배형태로 볼 때 공간 이용효율을 높일 수 있는 생산 자동화는 필수요건이라고 볼 수 있다.

따라서 본 연구에서는 앞서 2001년도에 이미 보고 된 바가 있는 ‘고부가 고품질의 화훼종묘 생산효율향상을 위한 신기술 개발’에서 얻은 결과를 토대로 ‘연속 순환식 자동 식물배양 시스템’(특허 제 0303893호)을 이용, 무병주 국화 삼목묘의 대량 생산기술을 개발하여 첫째, 생산 효율성 증가 및 생산비 절감을 통한 고효율 종묘 생산체계를 구축 하고 둘째, 농가실증시험을 통한 새로운 공정육묘 체계를 확립함으로써 우량 삼목묘의 실용화 및 산업화를 이룩하고자 한다.

1) 기술적 측면

○ 국화는 삼목번식에 의존함에 따라 식물체의 활력이 저하되고 바이러스에 이병되는 등 절화의 품질이 떨어지는 원인이 되고 있으므로 무병주 우량 삼목묘의 대량 공정 육묘생산 방법의 개발이 필요하다.

○ 또한, 시설 내에서 년 3회 생산을 위해서는 정확한 출하기 선정과 육묘 일정이 뒤 따라야 함으로 년 중 안정적으로 삼목묘를 공급할 수 있는 기술개발이 필요하다.

2) 경제·산업적 측면

○ 가까운 국화 수출 대상국인 일본의 1999년 국화생산액은 117,183백만 엔으로서 생산량은 약 22억 본에 이른다(1998년, 재배면적 6,190ha).

○ 우리나라의 경우 국화는 오랜 재배역사를 가지고 있어 소비자에 친숙한 작목이며 삼목번식이 매우 용이하여 처음 화훼를 재배하고자 하는 농민들이 가장 먼저 선택하는

작물이다. 따라서 육묘 전문 업체가 등장하고 시설이 개선되고 산업화되면 국화재배는 보다 쉬워져 생산량과 수출물량도 늘 것으로 판단된다.

3) 사회·문화적 측면

최근 화훼산업은 국민소득의 향상에 따른 꽃 소비 증가 추세와 개방화에 대비한 농가의 안정된 소득원으로서 국제경쟁력 확보가 가능한 산업으로 인식되면서 품질과 생산성이 크게 향상되어 대부분의 화훼작물 수요가 증가추세에 있으며 '97년부터 종자생산업에 대한 외국인 투자 자유화로 외국 종자업체가 국내 종자업체와의 경쟁이 치열해질 것으로 전망되고 또한 국민소득증가로 소비자들의 고품질 농산물을 선호함에 따라 품질이 우수한 농산물을 요구하고 있다. 따라서 고품질의 농산물을 생산하기 위한 가장 기본적인 단계로서 비교적 저렴한 우량종묘의 안정적 공급을 통하여 외국 농산물의 대외 의존도를 낮추어 나가야할 것이다.

제 2 절 연구개발의 목표 및 연구범위

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2004)	▷자동화 공정육묘 생산 기술확립	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기내 무병묘 생산체계 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 무병묘 생산을 위한 배양방법 구명; 성장점배양 방법 확립 ○ 증식효율 향상을 위한 자동화 배양기술 구명 <ul style="list-style-type: none"> - 자동화배양기용 상토개발; TKS-1,2에 버미큘라이트, 코코피트, 펄라이트를 50:50(v/v), 60:40(v/v), 70:30(v/v) 비율로 혼합하여 이화학적 특성조사 - 자동화 배양 환경조절; 온도 및 광환경조건 설정 - 기내 배양과 자동화 배양 방법 간 무병묘 증식효율비교 검토; 증식율, 묘의 생리적 특성을 비교 검토. ○ 바이러스 검정; 생산된 플러그 삽목묘의 바이러스 검정을 위하여 진흥청에서 항혈청을 분양받아 ELISA방법을 이용하여 일차적으로 검정하고 경북기술원과 경북대학교에 보유하고 있는 전자현미경을 이용하여 바이러스 검정을 수행한다.
	▷플러그 삽목묘의 생산력 검정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 플러그 삽목묘의 수량성 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 플러그 삽목묘의 재배방법개발을 위하여 재배작형별 생육특성 및 수량성을 조사 한다 ○ 삽목묘 재배실증 시험을 위한 관련 재배농가의 현지 재배참여를 유도하여 시범재배 실시계획을 수립하고 재배시험을 실시한다.

2차 년도 (2005)	<p>▷자동화 공정육묘 생산 기술확립</p>	<p>○ 기내 무병묘 생산체계 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - 무병묘 생산을 위한 배양방법 구명; 성장점배양에, 항바이러스 처리 및 열처리 병행 <p>○ 증식효율 향상을 위한자동화 배양기술 구명</p> <ul style="list-style-type: none"> - 자동화배양기용 상토개발; TKS-1,2에 버미큘라이트, 코코피트, 펄라이트를 50:50(v/v), 60:40(v/v), 70:30(v/v)비율로 혼합된 상토별 무병묘 생육특성 조사 - 자동화 배양 환경조절; 온도 및 광환경조건 설정 - 기내 배양과 자동화 배양 방법 간 무병묘 증식효율비교 검토; 증식율, 묘의 생리적 특성을 비교 검토 - 자동화 배양 환경조절; 습도 및 CO₂농도조건 설정 <p>○ 플러그 삽목묘 공정육묘 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 년중 주년생산 기술개발; 생산된 플러그 삽목묘의 품종간, 생산시기별 생리적 특성조사 - 플러그 삽목묘 공정육묘기술의 산업화 방안 모색 <p>○ 바이러스 검정; 생산된 플러그 삽목묘의 바이러스 검정을 위하여 진흥청에서 항혈청을 분양받아 ELISA방법을 이용하여 검정하고 경북기술원과 경북대학교에 보유하고 있는 전자현미경을 이용하여 바이러스 검정을 수행한다.</p>
	<p>▷플러그 삽목묘의 생산력 검정</p>	<p>○ 플러그묘 재배·관리기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 우량 플러그 삽목묘 생산을 위한 성장조절제 종류, 처리시기, 농도 및 처리횟수 등을 구명한다. - 플러그 삽목묘 저장에 관여하는 환경조건 구명; 적정 관수조건 및 방법을 구명한다. <p>○ 삽목묘 농가 실증시험</p> <ul style="list-style-type: none"> - 플러그 삽목묘의 수량성 및 품질을 검토하기 위하여 영주 등에서 재배작형별 생육특성 및 수량성을 검토 한다 - 농가 재배실증시험; 관행 국화 삽목묘를 대비로 하여 농가실증시험을 수행한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 기술개발 현황

○ 국 외

현재 조직배양용 자동화기술은 난 등 화훼를 중심으로 메리클론묘에 의한 식물생산이 많이 이루어지고 있는데 배양, 절단, 이식작업을 반복하여 식물을 증식하고 있으나, 절단·이식작업은 거의 수작업에 의존하고 있다. 조직배양용 자동화 기술은 세계 최대의 조직배양 회사인 트와이 포드·인터네셔널사(TII)가 개발한 'TOMOCA'라는 로봇이며, 한천배지상의 벤자민을 절단·이식하여 증식시킨다. 현재는 개량하여 심비디움 등을 대상으로 'LITTLE BOY'로 불리는 로봇을 개발하여 다른 종묘회사에 공급하고 있다. 네덜란드의 Phitonova사는 4대의 벨트 컨베이어를 결합시켜 묘의 이동·절단을 자동화하는 장치를 개발하였는데 연간 1,000만 본의 처리능력을 가지고 있다.

○ 국 내

국화의 우량종묘생산은 주로 삽목번식에 의한 삽목묘에 의존하고 있으며 지금까지 양질의 삽목묘를 생산하기 위해 적정환경 조건(Buwalda and kim, 1994 ; Buwalda et al., 1995 ; Hughes and Tsuvfita, 1981 ; Mackenzie, 1995 ; Yoon and Ahn, 1987; Yoshida et al., 1992), 발근 및 생육촉진(Konishi, 1975 ; Schuch, 1994 ; Shirakawa, 1978), 모주관리 및 삽수 조제(De Ruiter, 1993 ; Hiens and Wilkins, 1979)등에 관한 연구가 수행되어져 왔다.

제 2 절 관련기술의 문제점

국화의 우량종묘생산은 주로 삽목번식에 의한 삽목묘에 의존하고 있으며 지금까지 양질의 삽목묘를 생산하기 위해 적정환경 조건, 발근 및 생육촉진, 모주관리 및 삽수 조제 등에 관한 연구가 수행되어져 왔다. 그러나 지상부 및 지하부 환경조건을 동시에 최적화시킨다거나 무병주의 플러그 삽목묘 대량생산기술개발 등에 관한 연구는 거의 없는 편이다. 최근 플러그 삽목묘 생산을 위한 적정환경 조건 구명을 위한 연구는 몇몇 시험연구기관에서 단편적으로 수행되고 있으나 이 또한 삽수 채취를 위한 모주관리 및 채취시기의 제한 등의 문제점이 있는 것이 사실이다.

최근 공정육묘를 위해 사용되는 플러그 육묘는 묘의 균일도가 높고, 재배일정을 맞추기가 용이하며, 묘의 성장속도가 빠르다는 장점을 지니고 있다. 또한 공간 이용효율이 높으며, 정식이 용이한 장점 등이 있어 채소와 화훼류의 묘종생산에 널리 이용되고 있다.

앞서 언급한 바와 같이 우리나라의 경우 국화는 오랜 재배역사를 가지고 있어 소비자에 친숙한 작목이며 삽목번식이 매우 용이하여 처음 화훼를 재배하고자 하는 농민들이 가장 먼저 선택하는 작물이다. 따라서 육묘 전문 업체가 등장하고 시설이 개선되고 산업화되면 국화재배는 보다 쉬워져 생산량과 수출물량도 늘 것으로 판단된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

본 연구의 진행은 기내 무병주 생산체계확립 및 shoot 증식의 효율을 높이기 위한 기초실험을 실시한 후, 자동화배양기를 이용한 실험으로 규모를 확대하여 실시하였다. 이를 위해 국화 shoot의 기내 증식에 관여하는 다양한 물리 화학적 환경조성을 구명하였고 이들의 결과를 토대로 자동화배양기를 이용한 국화 무병묘의 대량증식 체계를 확립하고자 하였다. 이후 자동화배양기내에서의 국화 공정묘의 대량생산에 적합한 환경조건을 구명하고자 기외 순화 및 생장에 미치는 묘 소질, 삼목용토, 광도, CO₂ 등의 다양한 요인들에 대한 실험을 통해 새로운 순화시스템을 개발하고자 하였으며 최종적으로 본 연구를 통해 생산된 국화 무병묘에 대한 실증 시험을 실시하였다.

제 1 절 자동화 공정육묘 생산 기술 확립

1. 재료 및 방법

가. 국화 기내 무병주 생산체계확립

1) 바이러스제거를 위한 경정배양과 화학물질처리

바이러스에 감염된 국화 Becksonwere 품종의 삼목묘를 식물재료로 사용하였다 (그림 1). 모든 재료는 Chrysanthemum B carlavirus (CVB), Tomato aspermy cucumovirus (TAV), Tomato spotted wilt tospovirus (TSWV), Impatiens necrotic spot tospovirus (INSV), Cucumber Mosaic virus (CMV) 등 5가지의 바이러스에 대하여 ELISA 검정법으로 분석하였다.



Fig. 1. A. Chrysanthemum B carlavirus (CVB) infected mother plants and B. CVB-infected shoot and node cuttings in plug tray showing poor growth.

생장점 배양을 위하여 CVB에 감염된 모주로부터 잎이 3매정도 크기의 삽수를 채취하여 Tween 20을 첨가한 0.5% sodium hypochlorite (NaOCl)에서 5분 동안 살균하고 멸균수로 4번 헹군 후에 절단한 경정이 마르지 않도록 페트리 디시에 두고 해부현미경하에서 경정이 노출될 때까지 잎을 메스로 제거하였고 경정의 크기는 엽원기를 부착하여 0.2-0.4 mm의 크기로 절취하였다. 바이러스 감염된 식물체로 부터의 경정의 감염을 막기 위하여 메스날과 필터페이퍼는 계속 교환하여 사용하였다.

경정배양에 사용한 기본배지는 Murashige and Skoog (MS) 로 하였고, kinetin 0.2 mgL^{-1} 과 NAA 0.02 mgL^{-1} , sucrose 3%를 첨가하여 0.2% phytigel로 고형시켰다. pH는 5.8로 고정된 후에 고압멸균하고 필터 살균한 항바이러스제를 배지가 60°C 정도로 식었을 때에 첨가하였다. 항바이러스제는 Ribavirin 과 Amantadine를 사용하여 25, 35, 50 mgL^{-1} 농도로 혼용처리하였다. 각 처리 당 15반복으로 하여 배양환경은 $10 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 의 광도에서 5일간 두었다가 광도 $50 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 온도 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 항온실에 16시간 일장 하에서 배양하였다. 배양 30일 후에 shoot 신장과 생존율을 조사하였고 배양묘의 잎조직을 사용하여 ELISA 검정으로 CVB 감염여부를 조사하였다.

2) 국화 바이러스 진단체계를 확립

국화 바이러스 진단체계를 확립하고자 현재 국내에 보고된 5가지 주요 국화 virus(CVB, Chrysanthemum virus B; TAV, Tomato aspermy virus; TSWV, Tomato spotted wilt virus; INSV, Impatiens necrotic spot virus; CMV, Cucumber mosaic virus)에 대하여 ELISA kit(agdia)를 통해 감염 유무를 진단 하였다. 진단용 키트에는 무처리구와 IBA처리구에서 각각 23기주씩 선발하여 test에 이용하였다.

○ ELISA protocol은 다음과 같다.

A. Well Coating

- 증류수 $900 \mu\text{l}$ + 10X Coating buffer $100 \mu\text{l}$ + Virus antibody(1:200시) $5 \mu\text{l}$
- well에 $100 \mu\text{l}$ 씩 분주.
- 상온에서 2~3시간 동안 습식처리.

B. 시료준비

- E-tube에 이병엽을 적정량 넣고 즙을 냄.

b) Extract buffer를 즙액:buffer(1:10)의 비율로 넣음.

c) 4℃에서 보관.

C. Washing & 시료 넣기

a) Coating 했던 coating buffer를 버리고 Washing buffer로 3번 헹굼.

b) 각각 즙액을 넣을 자리에 즙액을 넣고 positive, negative를 넣음. 그리고 마지막 blank에는 extraction buffer로 채운다.(각각 100 μ l씩 넣음.)

c) 습식처리 at 4℃ × overnight.

D. Conjugate

a) overnight한 well 안의 내용물을 모두 버리고 washing buffer로 5회 이상 washing.

b) 5X conjugate buffer 200 μ l + 증류수 800 μ l + Alk Phos Enzyme Conjugate-A 5 μ l + Alk Phos Enzyme Conjugate-B 5 μ l

c) well에 100 μ l씩 분주.

d) 상온에서 2시간 습식처리.

e) Conjugate buffer 용액을 버린다.

f) washing × 3회

E. 발색

a) 증류수 4ml + PNP buffer 1ml + PNP Tablet 1개

b) well에 100 μ l씩 분주.

c) 랩을 썬우지 않고 습식처리와 같이 보관.

d) 발색이 확인되면 reader기로 수치 확인.

e) 3M NaOH 50 μ l씩 넣으면 발색이 진행되지 않고 고정된다.

3) 경정배양에 의한 무병주 대량증식

국화 Ajuma 품종을 재료로 하여 잎이 2~3매정도 크기의 삽수를 채취하여 Tween 20을 첨가한 0.5% sodium hypochlorite (NaOCl)에서 5분 동안 살균하고 멸균수로 4번 헹굼 후 에 절단한 경정이 마르지 않도록 페트리 디시에 두고 해부현미경하에서 경정이 노출될 때까지 잎을 메스로 제거하였고 경정의 크기는 엽원기를 부착하여 1mm의 크기로 절취하여 배지위에 치상하였다. MS 기본배지에 3.0%의 sucrose를 첨가하고 NAA (0.02, 0.20 mgL⁻¹), Kinetin (0.2, 1.0, 2.0 mgL⁻¹), BA (0.5, 1.0, 2.0 mgL⁻¹), 그리

고 TDZ (0.01, 0.5, 1.0 mgL⁻¹)를 각각 조합처리하였다. 배지는 0.7%의 agar를 첨가하여 고형시켰고 pH는 5.8로 조정하였다. 각각 12반복으로 처리하여 10 mol m⁻² s⁻¹의 광도에서 5일간 두었다가 광도 50 mol m⁻² s⁻¹ 온도 24±1℃의 항온실에 16시간 일장 하에서 배양하였다. 배양 45일 후에 생존율, shoot 수, 길이, 등을 조사하였다.

GA₃가 기내 배양묘의 shoot 신장에 미치는 영향을 조사하기 위해 국화 Viking 품종을 배양재료로 하여 잎이 3매 부착된 약 1cm 크기의 shoot와 마디조직을 사용하였다. 생장조절물질을 첨가하지 않은 MS배지를 대조구로 하여 GA₃를 각각 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mgL⁻¹의 농도로 배양하였다. GA₃는 고압멸균한 후 filter하여 배지가 60℃ 정도 되었을 때, 배지에 첨가하였다. Shoot와 마디는 각 처리 당 12반복으로 하여 광도 50 mol m⁻² s⁻¹ 온도 24±1℃의 항온실에 16시간 일장 하에서 배양하였다. 배양 45일 후 shoot 길이, 마디길이, 마디수, 생체중을 조사하였다. Shoot 신장에 있어서 Kinetin의 첨가효과를 알아보기 위하여 국화 Viking 품종을 배양재료로 하여 잎이 3매 부착된 약 1cm 크기의 shoot와 마디조직을 사용하였다. 생장조절물질을 첨가하지 않은 MS배지를 대조구로 하여 GA₃를 각각 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 mgL⁻¹의 농도에 kinetin 0.5 mgL⁻¹을 첨가하여 배양하였다. 각 배양용기에 6개의 shoot와 마디를 치상하여 12반복으로 처리하였다. 광도 50 mol m⁻² s⁻¹ 온도 24±1℃의 항온실에 16시간 일장 하에서 배양하였다. 처리 당 15반복으로 하여 배양 45일 후 shoot 길이, 마디길이, 마디수, 뿌리수, 생체중을 조사하였다.

4) 광자가영양, 혼합영양, 타가영양배양방법간 CO₂시비유무에 따른 국화 무병묘의 생육특성

식물재료는 국화 Viking 품종을 잎이 1매 부착한 마디를 사용하여 생장조절물질을 첨가하지 않은 MS배지에 sucrose: 0% (광자가 배양방법), 1.5, 3.0% (혼합영양과 타가영양배양방법) 등 3가지 배양방법으로 처리하였다. 혼합영양과 타가영양배양에 사용한 배양용기는 Magenta GA-7 (370 ml air volume)에 직경 10 mm의 구멍에 가스교환이 되는 pore size가 0.2μmol인 필터(Milliseal, Millipore, Tokyo, Japan)를 부착하여 사용하였다. 한 배양병당 4개의 shoot를 치상하였고 광도 100 mol m⁻² s⁻¹으로 명 상태일 때 CO₂ 농도를 1500 mol · mol⁻¹가 유입되는 CO₂ 챔버 내에서 배양하였다 (그림 2). 배양 30일 후 shoot 길이, 마디수, 엽면적, 마디길이, 경경, 뿌리길이, 뿌리수, 생체중,

건물중, 엽록소 함량을 조사하였고 3가지 배양방법별로 성장한 식물체와 순화단계의 식물체를 전자현미경으로 기공밀도, 기공길이 등을 조사하였다.

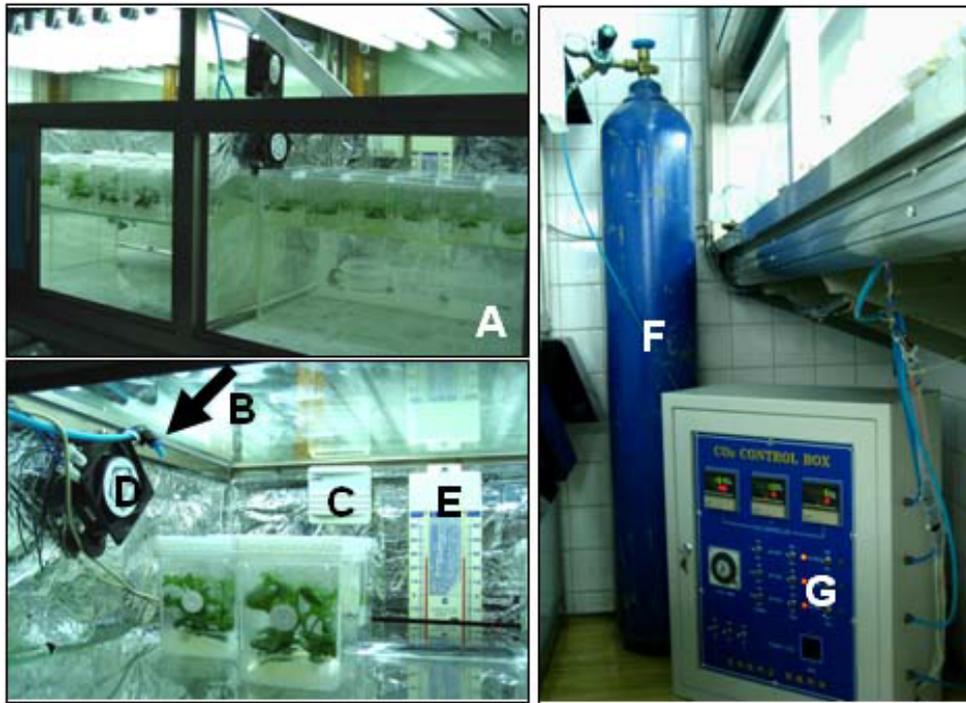


Fig. 2. Parts of a CO₂ chamber A. main chamber with retractable windows, B. interior of chamber with CO₂ feeder(arrow) C. CO₂ sensor, D. blower, and E. thermometer; F. CO₂ tank and G. CO₂ and light control box.

나. 자동화배양기를 이용한 국화 기내 무병주 대량 생산

1) 자동화배양기내 국화 삼목묘 생산을 위한 기내 배양묘 적정이식 시기 구명

식물재료는 국화 Viking 과 UFO 품종을 사용하여 0, 30, 45일간 배양한 단계별로 shoot와 node를 배양하였다. Shoo 의 tip은 발근처리제 Rootone F를 분의처리해서 128공 트레이에 삼목하였고 배양토는 피트모스, 펄라이트, 버미큘라이트를 각각 1:1:1로 혼합하여 사용하였다. 배양 30일 후에 shoot 길이, 마디수, 엽면적(tip으로부터 3번째 잎), 경경, 뿌리길이, 뿌리수, 생체중, 건물중, 엽록소 함량 등을 조사하였다. 또한 배양토의 EC, pH, 공극률, 흡수율, 함수율 등 물리적 화학적 특성을 조사하였다. 표피 및 기공

조직의 형태적 특성을 조사하기 위하여 3가지 방법으로 배양한 배양묘의 기공형태는 앞 뒷면을 주사전자현미경(S4100, Hitachi Scanning Electronic Microscope, Japan)을 사용하여 300배와 1,000배의 배율로 비교하였으며 이들 3가지의 배양묘는 유리온실에서 30일간 육묘한 건전묘 잎의 기공형태와 대비하였다. 시료조제는 10×10mm의 크기의 잎 절편을 0.1M phosphate buffer와 4% osmium 혼합용액 1mL에 침지시켜 90분 동안 고정하였다. 그 후, 0.1M phosphate buffer에 15~20분 간격으로 2~3회 수세하고 30, 50, 70, 80, 90, 95% 에탄올로 각각 탈수시킨 다음 무수 에탄올로 5분씩 2~3회 탈수시키고 isoamylacetate에 10분씩 3회 치환시킨 후 CO₂ critical dryer로 건조하여 백금으로 코팅하였다.

2) 자동화배양기내 국화 삽목 시 nodal position에 따른 국화 묘의 생장

자동화배양기내 국화 삽목 시 nodal position에 따른 국화 묘의 생장을 조사하기 위하여 기내 배양된 국화 Lineker 품종의 shoot를 사용하였다. 배양마디의 부위를 3가지로 분류하여 치상하였는데 상부마디(shoot tip에서 3, 4번째 마디) 중간부마디(shoot tip에서 6, 7번째 마디), 하부마디(기부부위의 마디)로 각각 나누어 처리하였다. 배양환경 조건은 광도 50 mol m⁻² s⁻¹, 온도 24±1°C, 16시간 일장조건으로 배양하였다. 처리당 반복수는 15로 하여 배양 45일 후 shoot 길이, 마디수, 경경, 뿌리길이, 뿌리수, 생체중과 건물중, 을 조사하였다. 배양토는 피트모스, 펄라이트, 버미큘라이트를 각각 1:1:1로 혼합하여 사용하였다. 사용한 육묘 트레이는 128공 트레이, 관수는 70ml/6hr, 공중습도는 70%로 기본 처리하였다.

3) 자동화배양기내 광양자속밀도(PPFD)가 국화 묘의 생장에 미치는 영향

국화 Lineker 품종의 상부마디를 이용하여 삽목재료로 이용하였다. 자동화배양기내 광양자속밀도는 50, 100, 그리고 200 mol m⁻² s⁻¹ PPFD 로 조절하였고, 온도 24±1°C, 16시간 일장하에서 배양하였다. 처리당 반복수는 15로 하여 배양 45일 후 shoot 길이, 마디수, 경경, 뿌리길이, 뿌리수, 생체중, 건물중과 엽록소함량을 조사하였다. 배양토는 피트모스, 펄라이트, 버미큘라이트를 각각 1:1:1로 혼합하여 사용하였다. 사용한 육묘 트레이는 128공 트레이, 관수는 70ml/6hr, 공중습도는 70%로 기본 처리하였다.

4) 상토종류 및 주야온도차와 상토종류와 수분 공급 시간이 삼목묘 생육에 미치는 영향

실험재료는 2004년 국화농가에서 모본용으로 사용하는 ‘Ajuma’, ‘Baeksun’ 품종을 사용하여 생장점 배양 후 순화한 재료를 사용하였으며 삽수는 약 3~4cm크기의 삽수를 사용하였으며, ‘Sulak’ ‘Baekhwa’은 2005년 6월 7일 수원 원예시험장에서 육성한 품종을 분양 받은 후 자동화배양기내(그림 3)에서 실험공시 품종으로 사용하였다. 연속순환식 자동화배양기내에서 조직배양묘를 공정육묘를 위한 처리는 상토별 조성에 따른 효과를 살펴보기 위하여 TKS2(화이트 피트모스), 펄라이트(상표명: 파라그린), 버미큘라이트(대립), 피트모스를 혼합하여 발근배지의 조성에 따른 효과를 살펴본 결과는 표 1과 같이 조성하여 처리하였다. 자동화배양기내 수분 공급 배양조건은 70ml/tray씩 관수하면서 4, 6, 8시간별로 조절하여 관수하여 처리하였다. 주야온도차에 따른 생육반응을 알기위하여 온도는 25℃에서 20℃까지의 주야온도차를 25℃/20℃, 23℃/20℃, 25℃/25℃조절, 광도는 40w 형광등으로1,000lux, 1,500lux, 2,000lux로 조절했으며 육묘일수는 따른 국화의 생육반응을 알기위해서는 품종별 1, 10,20,30일 경과 후 생육정도를 조사하였다. 연속순환식 자동화배양기내에서 기본배양환경으로 광도는 20 mol m⁻² s⁻¹ PPFD, 일장은 명16시간/암8시간, 사용한 육묘 트레이는 128공 트레이, 관수는 70ml/6hr, 공중습도는 70%로 기본 처리를 처리하였다.

Table 1. Growing substrates for automatic culture.

Substrates	Ratio (% , V/V)
TKS2	White peatmoss 100
TKS2:PL=5:5	White peatmoss 50+Perite 50
TKS2:PL=6:4	White peatmoss 60+Perite 40
TKS2:PL=7:3	White peatmoss 70+Perite 30
TKS2:VM=5:5	White peatmoss 50+Vermiculrite 50
TKS2:VM=6:4	White peatmoss 60+Vermiculrite 40
TKS2:VM=7:3	White peatmoss 70+Vermiculrite 30
TKS2:PT=5:5	White peatmoss 50+Peatmoss 50
TKS2:PT=6:4	White peatmoss 60+Peatmoss40
TKS2:PT=7:3	White peatmoss 70+Peatmoss 30



Fig 3. Parts of an Automatic Culture Chamber A. main chamber, B. digital control panel, C. retractable window, D. conveyor with plug trays and E. misting system for water and nutrient solution application.

5) 생장조절제 및 플러그 셀크기가 삼목묘 생육에 미치는 영향

공시재료 국화는 2005년 6월7일 수원 원예시험장에서 육성한 품종 중 'Baekhwa'와 기존 실험중이던 모본'Ajuma', 'Baeksun' 'Puma'등을 자동화배양기내(그림 6)에서 실험 공시 품종으로 사용하였다. 자동식물 배양기(연속순환식 자동식물 배양시스템)내의 기본 배양조건은 상토는 TKS2:PL=6:4 광도는1,500lux, 명16시간/암8시간, 육묘 트레이는 128공 트레이, 관수는 70ml/Tray/6hr, 공중습도는 70%로 기본 처리를 유지하였다.) 생장조절제 처리효과를 조사하기 위하여 자동화배양기내에서 몇 가지 생장조절제를 삼수절단부에 대한 처리로 Rootone은 분의처리하고 IBA, NAA는 침지하여 사용하였다. 또한, 플러그 셀 크기에 따른 국화 생육반응을 조사하기 위해서 기본배양 조건에 셀 크기를 72, 100, 128구에 국화 삼수를 삼목 하였다. Paclobutrazol처리에 따른 국화 생육반

응을 조사하기 위하여 2006년 8월7일 플러그 삽목을 실시한 후 10일 후 자동화배양기 내에서 온도는 23/20℃, 수분공급은 70ml/tray/4hr, 상토는 TKS2:PL=6:4, 광도 20 mol m⁻² s⁻¹ PPF, 의 기본조건에서 육묘일수를 최대한 줄일수 있는 방법과 묘소질 향상을 위한 국화 ‘Ajuma’, ‘Sulak’ ‘Baekhwa’의 식물체 엽과 줄기에 Paclobutrazol(Kim 등 1977, Strang, E.J. and G.G. Weis. 1984, Suh, S.G. and H.D. Chung. 1986) 농도를 무처리 5, 10, 30 mg/L⁻¹ 및 1, 2회로 미스트로 분무처리 후 8월29일 생육비교 실험조사를 하였다.

6) 자동화배양기내 삽목묘 삽수 횟수에 따른 생육특성

국화 ‘Baeksun’, ‘Ajuma’, ‘Baekhwa’의 모본에서 자동배양기내에서 릴레이식의 연속 삽목이 가능한지를 검토하기 위하여 shoot tip을 포함한 길이 3~3.5cm(엽수 4~5매)의 삽수를 배양 21일 간격으로 연속하여 삽수 채취 횟수를 1, 3, 5, 10회 채취한 다음 그 삽수에 대한 재료간의 비교실험을 하였다.

7) 자동화배양기에서 생산된 묘와 관행 배양방법과의 비교

국화 ‘Baeksun’ 품종을 사용하여 관행방법은 국화증식배지(MS배지에 3%당이 첨가된 hormone-free 배지)에 500ml 삼각플라스크를 이용하여 10마디씩 배양하였으며 자동화배양기는 128공 트레이를 이용하여 셀당 1마디씩 삽목하여 각각 3회까지 계대배양 혹은 재 삽목 후 생산된 묘의 특성 및 배양기간과 기외활착율 등을 비교조사 하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 국화 기내 무병주 생산체계확립

1) 바이러스제거를 위한 경정배양과 화학물질처리

국화 생장점배양 시 항바이러스와의 병용이 무병묘 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 바이러스에 감염된 것으로 확인된 국화 ‘백선’품종을 사용하여 실험한 결과는 표 2와 같다. 항바이러스제인 Ribavirin과 Amantadine의 농도별 처리에 관계없이 분화된 모든 식물체에서 CVB바이러스가 검출되지 않은 반면 대조구에서는 분화된 식물체의 81%에서만 CVB바이러스가 검출되지 않았다. 한편, 배지 내 첨가된 항바이러스제의 농도가 높을수록 항바이러스의 독성에 의해 생존율이 낮아져(Verma 등, 2005) 바이러스 제거율과 생존율을 감안할 때 국화의 생장점 배양 시 저농도의 항바이러스제를 사용하더라도 CVB바이러스를 제거할 수 있을 것으로 판단된다.

Table 2. Effects of shoot tip culture with or without antiviral chemicals Ribavirin and Amantadine on the growth, success on virus elimination and survival rate of Chrysanthemum cv. Beckson.

Antiviral chemical (mg · L ⁻¹)		Shoot length (mm) ^z	Virus free plantlets (%)	Suival(%)
Shoot tip culture (antiviral chemical-free)		7.97 a	81	80
Ribavirin	25 ppm	3.34 c	100	70
	35 ppm	2.56 c	100	66
	50 ppm	2.43 c	100	60
Amantadine	25 ppm	7.76ab	100	66
	35 ppm	7.02ab	100	60
	50 ppm	5.86 b	100	46

^zMean separation within column by Duncan's Multiple Range Test at 5% level.

2) 국화 바이러스 진단체계를 확립

바이러스에 감염된 것으로 판단된 식물체 각각의 virus에 대한 ELISA test 결과, CVB 에서는 실험기주 모두에서 상당히 높은 수치를 나타내었고, 나머지 4개의 virus에 대해서는 아주 낮은 수치를 기록하였다(그림 4). 이로써, 선별한 46개의 기주 모두가 CVB에 감염되었음을 확인하였다.

① CVB

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3.7630	0.0000	3.5770	0.0000	3.7030	0.0000	2.4640	0.0000	3.7220	0.0000	3.1300	0.0000
B	0.2810	0.0000	2.7520	0.0000	3.8710	0.0000	1.6760	0.0000	3.6860	0.0000	3.4880	0.0000
C	3.8290	0.0000	2.4660	0.0000	2.6520	0.0000	3.8860	0.0000	2.6320	0.0000	3.4420	0.0000
D	1.7900	0.0000	3.7250	0.0000	2.3270	0.0000	2.6290	0.0000	3.7130	0.0000	3.6700	0.0000
E	2.3830	0.0000	3.7340	0.0000	2.5700	0.0000	2.7990	0.0000	3.7810	0.0000	3.6850	0.0000
F	3.7780	0.0000	3.8440	0.0000	2.7000	0.0000	3.8320	0.0000	3.7380	0.0000	3.7480	0.0000
G	2.8120	0.0000	1.8140	0.0000	3.5440	0.0000	2.8930	0.0000	3.7000	0.0000	2.3960	0.0000
H	3.1150	0.0000	3.7820	0.0000	2.3010	0.0000	3.4810	0.0000	3.7160	0.0000	3.4510	0.0000

② TAV

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3.6620	0.0000	0.2720	0.0000	0.2550	0.0000	0.2290	0.0000	0.3020	0.0000	0.2040	0.0000
B	0.1570	0.0000	0.3030	0.0000	0.2450	0.0000	0.1950	0.0000	0.2380	0.0000	0.2340	0.0000
C	0.3970	0.0000	0.2520	0.0000	0.2400	0.0000	0.3340	0.0000	0.2610	0.0000	0.2180	0.0000
D	0.2590	0.0000	0.3260	0.0000	0.2210	0.0000	0.3080	0.0000	0.3760	0.0000	0.3040	0.0000
E	0.3030	0.0000	0.3260	0.0000	0.2770	0.0000	0.2290	0.0000	0.3500	0.0000	0.2840	0.0000
F	0.3500	0.0000	0.2970	0.0000	0.2460	0.0000	0.2560	0.0000	0.2330	0.0000	0.2390	0.0000
G	0.2970	0.0000	0.2280	0.0000	0.2710	0.0000	0.2700	0.0000	0.2730	0.0000	0.2480	0.0000
H	0.2540	0.0000	0.2590	0.0000	0.2930	0.0000	0.2950	0.0000	0.3450	0.0000	0.2470	0.0000

③ TSWV

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3.0670	0.0000	0.1990	0.0000	0.1890	0.0000	0.1830	0.0000	0.1970	0.0000	0.1850	0.0000
B	0.1590	0.0000	0.1600	0.0000	0.1970	0.0000	0.1640	0.0000	0.1690	0.0000	0.1550	0.0000
C	0.2280	0.0000	0.1920	0.0000	0.1780	0.0000	0.1740	0.0000	0.1840	0.0000	0.1740	0.0000
D	0.1710	0.0000	0.1820	0.0000	0.1910	0.0000	0.1840	0.0000	0.1840	0.0000	0.1790	0.0000
E	0.1520	0.0000	0.1910	0.0000	0.1750	0.0000	0.1610	0.0000	0.1710	0.0000	0.1890	0.0000
F	0.1910	0.0000	0.2310	0.0000	0.2130	0.0000	0.1790	0.0000	0.2100	0.0000	0.1700	0.0000
G	0.1800	0.0000	0.1730	0.0000	0.2020	0.0000	0.1520	0.0000	0.1810	0.0000	0.1780	0.0000
H	0.1880	0.0000	0.1760	0.0000	0.1720	0.0000	0.1620	0.0000	0.1620	0.0000	0.1610	0.0000

④ INSV

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.9860	0.0000	0.2310	0.0000	0.2180	0.0000	0.1920	0.0000	0.2090	0.0000	0.1790	0.0000
B	0.1400	0.0000	0.1980	0.0000	0.2890	0.0000	0.1800	0.0000	0.1960	0.0000	0.1680	0.0000
C	0.2280	0.0000	0.2250	0.0000	0.2130	0.0000	0.1930	0.0000	0.2040	0.0000	0.1810	0.0000
D	0.2030	0.0000	0.2110	0.0000	0.2530	0.0000	0.1790	0.0000	0.1990	0.0000	0.1810	0.0000
E	0.1940	0.0000	0.2300	0.0000	0.1990	0.0000	0.1820	0.0000	0.1800	0.0000	0.1820	0.0000
F	0.2140	0.0000	0.2630	0.0000	0.2680	0.0000	0.1860	0.0000	0.2520	0.0000	0.1750	0.0000
G	0.2050	0.0000	0.1900	0.0000	0.2270	0.0000	0.1560	0.0000	0.1880	0.0000	0.1790	0.0000
H	0.2110	0.0000	0.2040	0.0000	0.1800	0.0000	0.1820	0.0000	0.1820	0.0000	0.1800	0.0000

⑤ CMV

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3.6230	0.0000	0.4030	0.0000	0.3500	0.0000	0.3720	0.0000	0.3600	0.0000	0.3360	0.0000
B	0.2950	0.0000	0.3530	0.0000	0.3570	0.0000	0.3340	0.0000	0.2920	0.0000	0.4580	0.0000
C	0.3900	0.0000	0.3380	0.0000	0.3730	0.0000	0.2940	0.0000	0.3760	0.0000	0.2980	0.0000
D	0.3720	0.0000	0.3980	0.0000	0.4050	0.0000	0.3790	0.0000	0.3230	0.0000	0.3300	0.0000
E	0.3280	0.0000	0.3920	0.0000	0.3540	0.0000	0.3520	0.0000	0.4490	0.0000	0.3200	0.0000
F	0.3530	0.0000	0.3660	0.0000	0.3270	0.0000	0.3700	0.0000	0.3220	0.0000	0.3690	0.0000
G	0.3840	0.0000	0.3840	0.0000	0.3850	0.0000	0.3380	0.0000	0.3440	0.0000	0.2850	0.0000
H	0.3730	0.0000	0.3460	0.0000	0.3390	0.0000	0.3720	0.0000	0.3530	0.0000	0.2850	0.0000

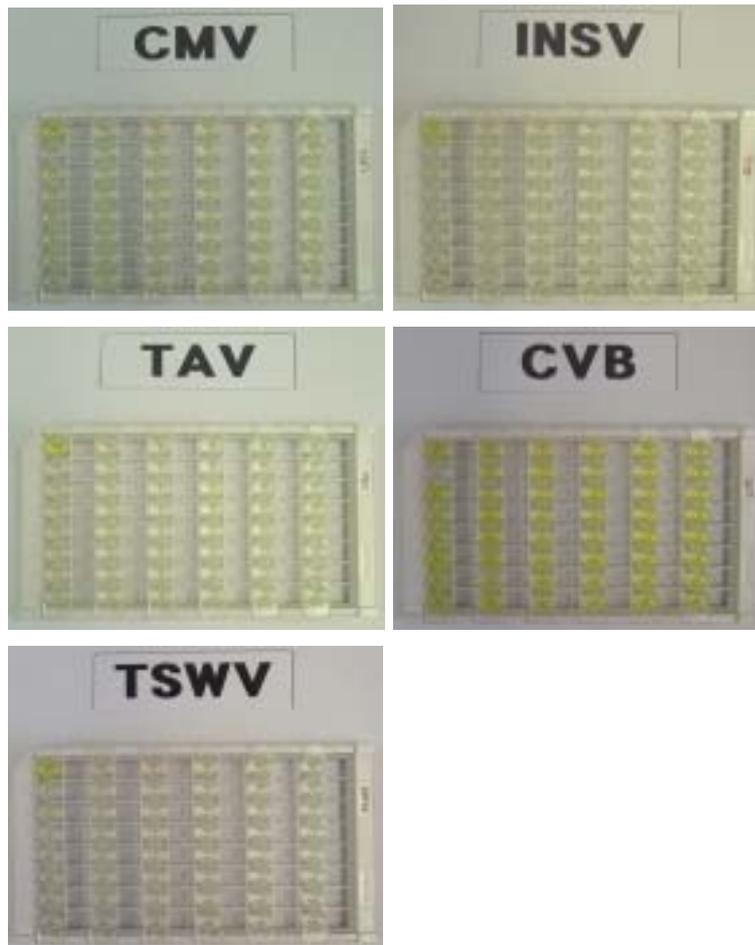


그림 4. 국화 바이러스에 대한 ELISA 검정수치(위 1,2,3,4,5) 및 결과 사진(아래)

한편, 이병주로 확인된 국화의 향바이러스제 병행 성장점배양을 통하여 생산된 식물체의 CVB (Chrysanthemum virus B)에 대한 ELISA test 결과, 각각의 sample의 수치가 Negative의 수치보다 낮은 것으로 보아 선별한 60개의 기주 모두가 CVB에 감염되어 있지 않음을 알수있었다 (그림 5). (Positive의 수치는 1.7 로서 실험결과를 판단하기에 적합하다)

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1.7360	0.0570	0.0550	0.0590	0.0490	0.0530	0.0480	0.0550
2	1.7530	0.0610	0.0550	0.0600	0.0500	0.0550	0.0500	0.0570
3	0.0630	0.0560	0.0560	0.0590	0.0500	0.0530	0.0490	0.0560
4	0.0580	0.0570	0.0570	0.0600	0.0510	0.0620	0.0500	0.0570
5	0.0560	0.0580	0.0560	0.0590	0.0520	0.0600	0.0510	0.0560
6	0.0580	0.0580	0.0550	0.0590	0.0510	0.0530	0.0500	0.0540
7	0.0600	0.0560	0.0560	0.0600	0.0510	0.0520	0.0480	0.0530
8	0.0590	0.0570	0.0560	0.0590	0.0600	0.0520	0.0550	0.0540



그림 5. 국화 바이러스에 대한 ELISA 검정수치(위) 및 결과 사진(아래). Positive의 수치는 1.7 로서 실험결과를 판단하기에 적합함.

3) 경정배양에 의한 무병주 대량증식

생장점 배양 시 적정 성장조절물질의 종류와 농도를 규명하기 위하여 국화 'Ajuma' 품종을 재료로 하여 MS기본배지에 식물성장조절물질을 NAA(0.02, 0.2mg · L⁻¹)와 kinetin(0.2, 1.0, 2.0mg · L⁻¹), BA(0.5, 1.0, 2.0mg · L⁻¹), TDZ(0.01, 0.5, 1.0mg · L⁻¹)를 조합하여 성장점을 배양한 결과를 보면 표 3과 그림 6과 같다. 성장조절물질이 첨가되지 않은 대조구에 비하여 shoot 증식율은 NAA와 BA의 조합구에서 상당히 높은 것으로 나타났다. NAA와 BA의 조합구에서도 NAA 0.2와 BA 1mg · L⁻¹ 처리에서 가장 증식율이 높았다. 그러나 shoot 길이는 NAA와 BA의 조합구와 NAA와 TDZ 조합구 보다는 NAA와 Kinetin 조합구가 길었는데 그 중에서도 NAA 0.2와 Kinetin 1mg · L⁻¹ 처리에서 가장 길었다. 국화의 기내배양 시 BA는 부정아 유기와 multiplication에 효과적이고 Kinetin은 shoot 신장과 발근에 효과적임을 알 수 있었다.

Table 3. Effects of different levels and combinations of plant growth regulators (PGRs) on the growth of *Chrysanthemum* cv. Beckson shoot tips in vitro.

PGR (mg · L ⁻¹)	No. of Sshoots ^Z	Shoot length (mm)	No. of nodes	No. of roots	Survival (%)	Organogenic response	
PGR-free	1.0±0.00 e	14.17±2.64 de	4±0.54 e	1±0.4 b	83	single	
0.02 NAA	0.2 Kin	1.3±0.20 e	36.14±4.27 ab	8±0.68 abcd	1±0.2 b	100	single
	1.0 Kin	1.9±0.30 de	34.13±5.64 abc	9±0.85 abc	3±0.0 ab	92	multiple
	2.0 Kin	3.4±0.54 bcde	24.50±3.02 bcd	7±0.60 abcd	0±0.0 ab	100	multiple
0.2 NAA	0.2 Kin	1.2±0.15 e	44.89±5.38 a	0±1.06 a	2±0.4	100	single
	1.0 Kin	2.7±0.47 bcde	38.56±1.22 ab	9±1.30 ab	2±1.0 ab	100	multiple
	2.0 Kin	4.8±1.98 ab	25.60±3.66 bcd	9±1.21 ab	1±0.7 a	100	multiple
0.02 NAA	0.5 BA	4.7±0.52 abc	18.20±2.16 de	7±0.34 bcde	0±0.0 ab	92	multiple
	1.0 BA	5.0±0.65 ab	12.36±1.56 de	6±0.39 cde	0±0.0	100	multiple
	2.0 BA	5.5±0.87 ab	14.30±1.27 de	7±0.62 abcd	0±0.0	100	multiple
0.2 NAA	0.5 BA	5.0±1.03 ab	12.50±2.25 de	6±0.48 bcde	0±0.0	100	multiple
	1.0 BA	6.9±1.28 a	17.86±3.00 de	8±0.72 abcd	0±0.0	100	multiple
	2.0 BA	5.3±1.6 ab	16.00±3.34 de	7±0.41 abcd	0±0.0	83	multiple
0.02 NAA	0.01 TDZ	3.2±1.40 bcde	20.11±2.26 cde	5±0.38 de	0±0.0	83	multiple
	0.5 TDZ	3.0±1.00 bcde	7.50±2.50 e	7±2.00 abcd	0±0.0	83	multiple
	1.0 TDZ	0.0±0.00 f	0.00±0.00 f	0±0.00 f	0±0.0	58	-
0.2 NAA	0.01 TDZ	4.6±0.87 abcd	15.00±2.98 de	7±1.20 abcd	0±0.0	100	multiple
	0.5 TDZ	2.0±1.00 cde	6.33±0.33 e	7±0.88 abcd	0±0.0	100	multiple
	1.0 TDZ	0±0.00 f	0.00±0.00 f	0±0.00 f	0±0.0	100	-

^ZCombination of Plant Growth Regulators in MS basal medium: NAA:-Naphthaleneacetic acid, Kin:6-furfurylaminopurine, BA:6-Benzylaminopurine, TDZ:Thidiazuron.

^YMean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test at 5% level.

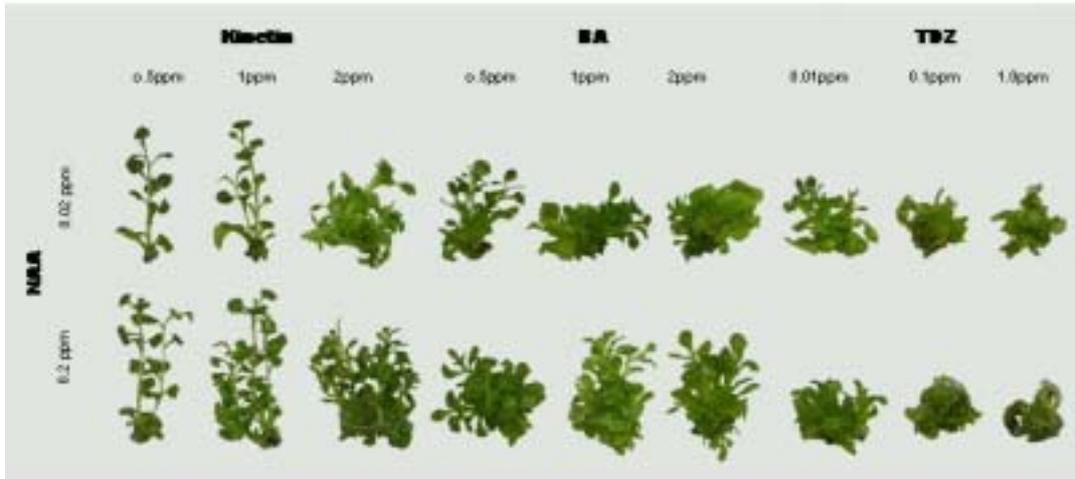


Figure 6. Effects of different levels and combinations of PGRs on the growth of Chrysanthemum 'Ajuma' shoot tips in vitro

한편, 국화의 생장점배양 결과 배지 내 첨가된 생장조절물질의 종류와 농도에 따라 생장점으로부터 1-2개의 신초가 형성되면서 형성된 신초의 길이가 긴 것(그림 7a), 초장이 다소 긴 다신초 형성(그림 7b)과 초장이 극히 짧은 다신초 덩어리(그림 7c)의 3가지 형태로 생육하였는데 이는 생장조절물질의 종류와 농도에 따른 차이인 것으로 기인한 것으로 판단되며 기내에서 대량증식을 위해서는 신초가 다소 긴 다신초형태의 덩어리가 재증식 재료로 적합할 것으로 판단되었다.

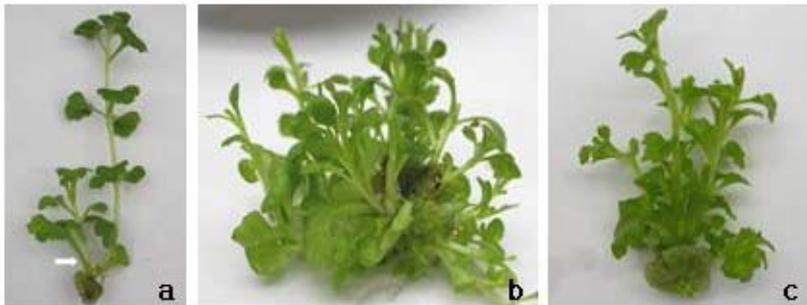


Figure 7. Three types of morphogenic response, a. axillary bud (arrow) and shoot tip elongation ($\text{NAA } 0.02\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{Kin } 1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), b. adventitious bud development ($\text{NAA } 0.02\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{Kin } 2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), and c. axillary branching ($\text{NAA } 0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{BA } 2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) observed in Chrysanthemum 'Ajuma' shoot tips in vitro

기내 배양묘를 플러그 육묘용으로 활용하고 동시에 삽목에 의한 대량증식의 기본식물로 이용하기 위해서는 기내에서 기본식물을 양성하여 식물체가 자가영양체로 전환될 때 까지 식물생장조절물질이 이식 후에도 어떻게 작용할 것일지를 알아보기 위하여 shoot tip 배양에서 획득한 다신초의 배양체로부터 shoot 재증식에 미치는 성장조절제의 영향을 조사한 결과를 보면 표 4 및 그림 8과 같다. NAA 0.2와 Kinetin 2.0 혼합처리구에서 shoot수가 다른 농도의 처리에 비하여 가장 많이 발생하였다. 따라서 초기 생장점배양에는 NAA에 BA를 혼용하는 것이 그리고 생장점배양에서 얻어진 다신초의 재증식에는 NAA에 kinetin 혼용처리가 기내 신초생육에 양호한 것으로 나타났다.

Table 4. Effects of PGRs on shoot proliferation from multiple shoot clumps* of Chrysanthemum in vitro.

Treatment	No. of Shoots	Survival(%)
Control	12±1	100
0.02NAA+0.1Kin	15±1	100
0.02NAA+0.5Kin	16±1	100
0.02NAA+1.0Kin	14±1	100
0.02NAA+2.0Kin	19±0.6	100
0.02NAA+0.5BA	13±0.6	100
0.02NAA+0.01TDZ	8±0.9	100
0.2NAA+2.0Kin	11±1.4	100
0.2NAA+0.5BA	7±0.9	100
0.2NAA+1.0BA	7±0.8	100

*Four shoots per clump was used

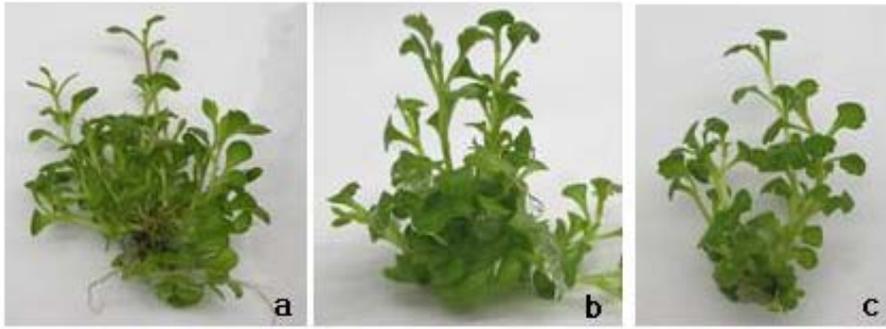


Figure 8. Multiple shoots obtained from subsequent culture of multiple shoot clumps. a;MS+NAA $0.02\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +Kin $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, b;MS+NAA $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +Kin $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, c; MS+NAA $0.02\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +Kin $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

국화의 Shoot tip을 포함한 shoot의 절간신장에 효과적인 GA₃의 농도를 알아보기 위하여 Viking과 UFO 두 품종을 대상으로 0.5, 1, 2, 4 mg · L⁻¹를 각각 처리하였다. 그 결과(Table 5, 그림 8), Viking의 경우 대조구에 비하여 마디 수는 큰 차이를 볼 수 없었으나 shoot의 길이는 GA₃의 농도가 높을수록 길었다. 그러나 UFO는 대조구에 비하여 오히려 마디 수는 감소하였으나 shoot 길이는 GA₃ 처리구가 길었다.

Table 5. Effects of GA₃ on internode elongation and growth of Chrysanthemum shoot tip cuttings in vitro

Cultivar	GA ₃ (mg · L ⁻¹)	No. of nodes	Shoot Length(mm)			No. of roots	Fresh Weight (g)	
			Total	4th Internode	5th Internode			6th Internode
Viking	Control	9±0.3	37.1±2.5	3.7±0.4	3.7±0.3	3.9±0.4	6±0.4	0.40±0.03
	0.5	9±0.3	62.9±3.1	7.6±0.4	8.0±0.4	7.6±0.4	6±0.4	0.52±0.03
	1.0	9±0.3	70.2±3.6	10.3±0.6	10.7±0.6	9.6±0.6	7±0.5	0.53±0.03
	2.0	9±0.3	84.7±3.4	12.8±0.6	13.2±0.6	12.8±0.5	7±0.6	0.50±0.01
	4.0	10±0.3	114.5±5.1	14.4±0.7	16.2±0.8	16.2±0.8	6±0.2	0.59±0.04
UFO	Control	10±0.3	38.9±2.3	4.0±0.2	5.0±0.6	5±0.3	8.6±0.4	0.52±0.03
	0.5	8±0.3	41.7±1.2	5.4±0.3	6.0±0.5	5±0.3	8.4±0.5	0.49±0.03
	1.0	8±0.2	44.7±1.5	6.9±0.5	7.5±0.4	7±0.5	7.9±0.4	0.44±0.02
	2.0	8±0.2	57.3±1.8	8.1±0.4	9.6±0.4	7±0.6	8.1±0.4	0.49±0.03
	4.0	9±0.2	70.7±1.7	11.0±0.6	13.1±0.5	13±0.4	8.6±0.4	0.51±0.03

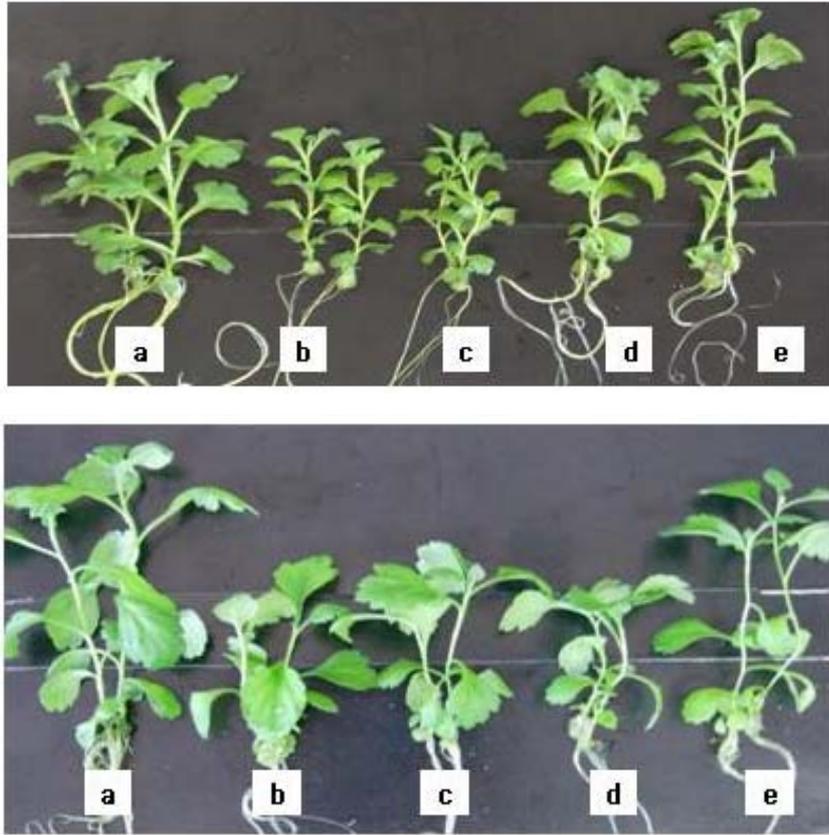


Figure 8. Effect of GA₃ on internode elongation and growth of Chrysanthemum 'Viking'(upper) and 'UFO'(below) shoot tip cuttings in vitro. a. control b. 0.5 mg/L c. 1 mg/L d. 2 mg/L and e. 4 mg/L.

기내묘의 발근에 있어서 성장조절물질의 효과를 알아보기 위하여 'Ajuma', 'Viking', 'UFO' 3가지 품종으로 처리한 결과를 보면(Table 6), 뿌리의 형성은 3품종에서 모두 NAA 1 + kinetin 0.01 처리에서 가장 많았다. 뿌리길이는 품종간이나 성장조절물질 처리별로 뚜렷한 경향치가 없었는데 Ajuma와 UFO 품종은 NAA 0.1 + kinetin 0.01 처리구가, Viking은 대조구가 가장 길었다. 이러한 결과로 볼 때, 성장조절물질뿐만 아니라 품종 간에도 뿌리형성에 다양한 반응이 나타남을 알 수 있었다.

Table 6. Effects of different levels and combination of auxin and cytokinin, and GA₃ on the rooting of Chrysanthemum in vitro.

Cultivar	Treatment	Root Formation			Fresh Weight (mg)		Dry Weight (mg)	
		No. of roots	Root length (mm)	Root Diameter (mm)	Shoot	Root	Shoot	Root
	Control	8±0.4	81±4	0.26±0.02	459±15	130±13	34.2±1.7	5.2±1.4
	1 GA ₃	8±1.0	47±4	0.18±0.01	375±24	76±7	29.1±1.2	3.5±0.2
	Ajuma	0.1NAA+0.01Kin	7±0.3	83±5	0.79±0.13	449±16	278±6	41.6±2.7
	0.5NAA+0.01Kin	4±1.0	56±5	0.92±0.08	497±30	441±23	39.6±2.6	22.5±3.2
	1.0NAA+0.01Kin	15±1.0	50±3	0.82±0.03	803±51	525±43	55.9±3.1	19.7±2.0
	Control	9±1	130±5	0.31±0.02	808±28	162±7	37.7±1.6	7.8±0.5
	1 GA ₃	6±1	111±5	0.24±0.02	694±34	157±9	34.4±2.3	7.5±0.8
	Viking	0.1NAA+0.01Kin	6±1	90±4	0.89±0.03	1107±92	285±16	63.2±4.4
	0.5NAA+0.01Kin	7±1	57±5	1.28±0.07	1212±68	471±50	67.1±5.1	22.3±2.6
	1.0NAA+0.01Kin	28±1	40±3	0.95±0.07	1507±89	911±61	84.6±5.4	40.1±2.7
	Control	12±1	55±5	0.3±0.02	463±23	185±14	30.6±1.3	5.6±0.5
	1 GA ₃	9±1	73±4	0.2±0.09	536±30	171±12	33.7±1.8	6.6±0.7
	UFO	0.1NAA+0.01Kin	7±1	73±4	1.0±0.04	941±52	579±71	67.0±4.6
	0.5NAA+0.01Kin	7±1	60±3	1.0±0.04	924±46	697±66	71.9±4.2	29.0±2.8
	1.0NAA+0.01Kin	12±1	50±3	1.0±0.10	1166±46	679±48	82.5±3.3	31.2±2.8

4) 광자가영양, 혼합영양, 타가영양배양방법간 CO₂시비 유무에 따른 국화 무병묘의 생육특성

관행 조직배양묘의 경우 배양기간 중 낮은 광도, 고습도 등으로 인하여 기외 이식 후 활착율을 높이기 어렵음이 따른다. 최근, 조직배양묘 생산체계에 있어서 인위적으로 배지 내 탄소원을 공급 하지 않거나 공급량을 줄이고 배양환경을 개선함으로써 기내 배양체의 묘소질을 개선시키고자 하는 연구가 시도되고 있다(Lee 등, 2001). 이러한 배양 방법은 기내 배양체의 당 의존도를 조기에 조절함으로써 기내 배양기간을 단축시키는 물론 배양체의 조기 자가 독립영양체로의 전환을 가능하게 하여 기외 활착율을 증가시킬 수 있다.

국화 기내배양묘의 기내배양환경을 달리하여 15일간 배양 후 유묘생장을 조사한 결과(Table 7, 8), 광자가영양배양과 혼합영양배양한 유묘는 타가영양배양한 유묘에 비하여 초장, 마디수 및 경경이 모두 증가하였으며, 생체중과 건물중은 2배 이상 증가하는 것으로 나타났다. 특히, 광자가영양배양한 유묘의 초장이 가장 길었고 마디수도 다른 배양방법에 비하여 많아져 자동화배양기내에서 삼목에 의한 배양체 재증식에 유리할 것으로 판단되었다. 뿐만 아니라, 모든 배양방법에서 CO₂를 시비하는 것이 무처리에 비해 생육이 양호하였으며 엽록소의 함량도 증가하는 것으로 나타났다.

Table 7. Effects of culture methods, photoautotrophic, photomixotrophic and heterotrophic culture on the growth of *Chrysanthemum* cv. Ajuma shoots in vitro.

Culture method	Sucrose (%)	Shoot length (mm) ^z	No. of nodes	Leaf area (cm ²)	Internode length (mm)	Stem diameter (mm)	No. of roots	Root length (mm)
Photoautotrophic								
CO ₂ enriched	0	82.50a	11.83a	3.55a	11.53a	1.99b	7.83b	53.33bc
CO ₂ non-enriched	0	50.00e	7.67d	3.86a	8.33c	1.94b	2.00ef	42.50c
Photomixotrophic								
CO ₂ enriched	3.0	76.67ab	10.33a	2.56c	7.97c	2.22a	10.33a	82.92a
	1.5	76.25ab	10.33b	2.19bc	10.07b	1.99b	7.33b	67.50ab
CO ₂ non-enriched	3.0	67.50c	9.25c	2.72bc	9.88b	2.08b	5.92bc	85.00a
	1.5	74.17bc	8.83c	3.30ab	11.98b	2.03b	4.33cd	53.33bc
Heterotrophic								
	3.0	58.17d	8.83c	1.91d	8.13c	1.77c	3.25de	48.75c
	1.5	31.67f	7.17d	1.23e	4.21d	1.62d	0f	0d

^zMean separation within column by Duncan's Multiple Range Test at 5% level.

Table 8. Effects of culture methods, photoautotrophic, photomixotrophic and heterotrophic culture on plantlet fresh and dry weights, and chlorophyll content of *Chrysanthemum* cv. Ajuma shoots in vitro.

Culture method	Sucrose (%)	Fresh weight (mg) ^z		Dry weight (mg)		Chlorophyll (SPAD)
		Shoot	Root	Shoot	Root	
Photoautotrophic						
CO ₂ enriched	0	1312.83 a	484.67 b	135.12 a	22.92 c	56.70 a
CO ₂ non-enriched	0	936.75 cd	219.83 d	47.17 e	10.50 d	28.97 e
Photomixotrophic						
CO ₂ enriched	3.0	1290.08 a	677.17 a	139.17 a	52.25 a	55.08 a
	1.5	1186.58 ab	452.08 b	97.42 bc	34.50 b	39.28 c
CO ₂ non-enriched	3.0	1222.33 a	394.25 bc	100.92 b	37.33 b	44.78 b
	1.5	1013.50 bc	389.92 bc	73.00 d	23.58 c	35.07 d
Heterotrophic						
	3.0	746.00 d	327.83 c	48.37 e	15.51 d	38.49 c
	1.5	745.33 d	0 e	35.51 e	0 e	29.83 e

^zMean separation within column by Duncan's Multiple Range Test at 5% level.

Table 9. Stomatal characteristics of *Chrysanthemum* cv. Ajuma plantlets from different culture methods.

Culture method	Stomatal density (mm ²) ^z	Length (μm)	Width (μm)
Heterotrophic	204.73±3.35 a	25.89±0.70 b	19.36±0.81 a
Photomixotrophic	163.93±3.92 b	26.42±0.55 b	15.04±0.30 b
Photoautotrophic	122.00±5.62 c	30.03±0.69 a	14.36±0.66 b
Acclimatized plant	83.06±4.33 d	30.91±0.65 a	7.53±0.26 c

^zEach value represents the mean±standard error. Mean separation within column by Duncan's Multiple Range Test at 5% level.

기내배양환경을 달리하여 생산된 유묘의 기공수와 기공의 크기를 조사한 결과는 표 9와 같다. 광자가영양배양한 유묘의 엽조직 내 기공의 밀도와 크기가 타가영양배양과 혼합영양배양한 유묘에 비해 작았다.

또한, 기내배양환경을 달리하여 생산된 유묘의 엽조직 내 기공형태를 관찰하기 위하여 잎의 뒷면 표피를 주사 전자 현미경으로 관찰하였다. 타가영양배양한 유묘의 잎에서는 각피층에 왁스의 결정형이 발견되지 않았다. 기공의 분포도 규칙적으로 배열되어 있지 않았으며 크기도 균일하지 않았다. 더욱이 기공의 대부분이 열려져 있는 상태로 관찰되어 기공개폐가 불량한 것으로 나타났다(Fig. 9-A, B). 반면, 혼합영양배양한 유묘의 경우, 닫힌 상태의 기공과 열린 기공이 혼재하여 분포하고 있었으며 잎의 각피층도 타가영양배양한 유묘의 각피층 보다는 결정형의 빈도가 높았다(Fig. 9-C, D). 그러나, 광자가영양배양한 유묘는 기공의 분포 및 크기가 규칙적이고 균일하였으며 이는 온실에서 생육한 유묘 잎에서의 기공 분포와 형태와 유사하였으며 잎의 각피 외층에서 발견되는 왁스 결정체의 모양이 편평한 간상이며 그물 모양의 등성(ridge)이 작고 규칙적으로 잘 발달되어 있었다. 이러한 결과는, Lee 등(2001)과 Shim 등(2001)이 거베라와 포도의 광자가영양배양한 이들 유묘의 잎에서 관찰한 기공의 형태학적 특성과 유사하였는데 타가영양배양한 유묘의 잎의 기공이 항상 열려있는 상태로 원형에 가깝고 광자가영양배양한 유묘의 잎의 기공이 닫혀있는 상태로 타원형에 가깝다고 하였다.

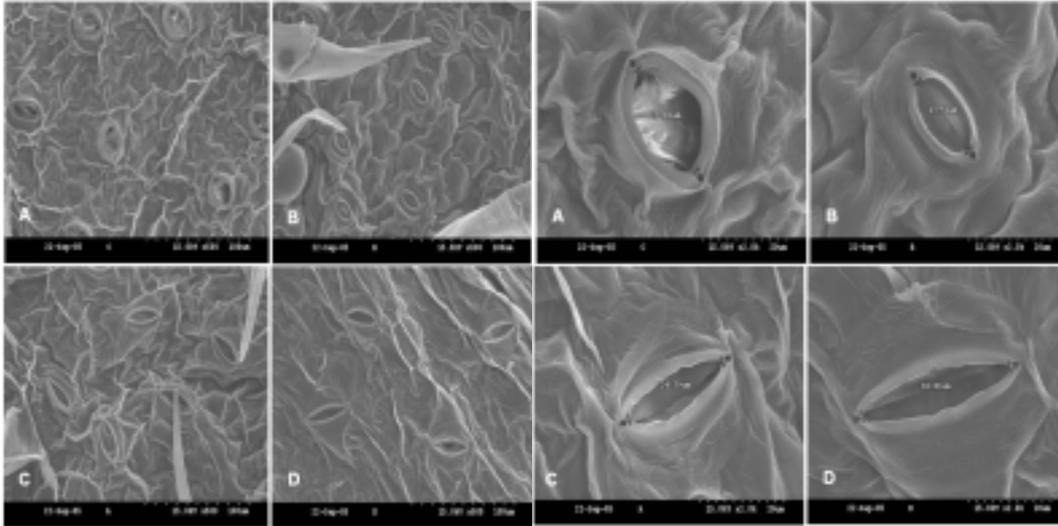


Fig 9. Scanning electron micrographs of the abaxial leaf surface of chrysanthemum in A. heterotrophic, B. photomixotrophic, C. photoautotrophic culture method and D. acclimatized plant (500X).

국화 기내배양묘의 기내배양환경을 달리하여 생산된 유묘를 기외 이식 30일 후 유묘 생장을 조사한 결과(Table 10, 11), 기내배양에서와 결과와 유사하였는데 광자가영양배양과 혼합영양배양한 유묘는 타가영양배양한 유묘에 비하여 이식 후 전반적인 생육이 전반적으로 양호하였다. 특히, 광자가영양배양한 유묘의 초장이 가장 길었고 마디수도 다른 배양방법에 비하여 많아져 자동화배양기내에서 삼목에 의한 배양체 재증식에 유리할 것으로 판단되었다. 뿐만 아니라, 모든 배양방법에서 CO₂를 시비하는 것이 무처리에 비해 생육이 양호하였으며 엽록소의 함량도 증가하는 것으로 나타났다.

Table 10. Effects of culture methods, photoautotrophic, photomixotrophic and heterotrophic culture on the growth of Chrysanthemum cv. Ajuma shoots in acclimatization ex vitro.

Culture method	Sucrose (%)	Shoot length (mm) ^Z	No. of nodes	Leaf area (cm ²)	Internode length (mm)	Stem diameter (mm)	No. of roots	Root length (mm)
Photoautotrophic								
CO ₂ enriched	0	106.67a	10.08b	5.49a	11.56a	2.19b	41.00a	69.58ab
CO ₂ non-enriched	0	70.83d	7.83f	2.97d	9.05e	1.70e	22.58b	57.92d
Photomixotrophic								
CO ₂ enriched	3.0	100.42ab	11.75a	4.68b	10.55bc	2.49a	27.00b	69.17ab
	1.5	97.08b	10.41b	4.09bc	10.61bc	2.24b	27.50b	63.75bcd
CO ₂ non-enriched	3.0	75.42cd	8.91de	4.49b	9.99cd	1.95c	26.00b	71.67ab
	1.5	97.08b	9.08cd	4.67b	11.43ab	1.82cd	42.83a	73.75a
Heterotrophic								
	3.0	81.25c	9.83bc	3.66c	9.36de	1.65e	24.14b	66.67abc
	1.5	60.00e	8.08ef	3.57cd	6.20f	1.47f	12.67b	59.17cd

^ZMean separation within column by Duncan's Multiple Range Test at 5% level.

Table 11. Effects of culture methods, photoautotrophic, photomixotrophic and heterotrophic culture on plantlet fresh and dry weights, and chlorophyll content of Chrysanthemum cv. Ajuma shoots in acclimatization ex vitro.

Culture method	Sucrose (%)	Fresh weight (mg) ^Z		Dry weight (mg)		Chlorophyll (SPAD)	Survival (%)
		Shoot	Root	Shoot	Root		
Photoautotrophic							
CO ₂ enriched	0	1381.50 bc	227.42 a	86.00 a	16.00 a	30.10 a	100
CO ₂ non-enriched	0	793.25 d	96.58 cd	36.50 c	7.58 b	26.54 bc	80
Photomixotrophic							
CO ₂ enriched	3.0	1563.83 a	170.00 b	85.00 a	17.25 a	31.50 a	93
	1.5	1179.67 bc	189.50 b	78.17 a	17.50 a	31.54 a	87
CO ₂ non-enriched	3.0	1318.58 bc	169.58 b	78.75 a	17.75 a	28.78 ab	87
	1.5	1173.62 bc	186.75 b	78.25 a	16.08 a	26.38 bc	80
Heterotrophic							
	3.0	1093.92 c	118.58 c	59.08 b	7.67 b	23.89 c	66
	1.5	707.67 d	77.75 d	28.40 c	5.91 b	20.85 d	60

^ZMean separation within column by Duncan's Multiple Range Test at 5% level.

나. 자동화배양기를 이용한 국화 기내 무병주 대량 생산

1) 자동화배양기내 국화 삽목묘 생산을 위한 기내 배양묘 적정이식 시기 구명

자동화배양기내 국화 삽목묘 생산을 위한 기내 배양묘 적정이식 시기 구명하기 위하여 성장점 배양 후 형성된 다신초를 1차 계대배양 후 일수별로 자동화배양기내 삽목트레이로 이식한 결과 (Table 12), 공시품종인 ‘Ajuma’와 “Linerker’ 공히 계대배양 후 배양기간이 길수록 자동화배양기 내에서의 삽목묘의 지상부 생육이 양호하였으나, 30일과 45일묘 간에는 초장의 신장량이나 엽수의 증가량과 엽면적에 통계적 유의성이 없다. 배양상토 종류에 따라서는 모든 계대배양 후 배양일수에 상관없이 피트모스와 버미클라이트 조합이 다른 조합에 비하여 생육이 양호하였다.

계대배양 후 배양일수별 일수별 자동화배양기내에서의 삽목묘 생육을 조사한 결과 (Table 13, 그림 10), 지상부와 생육과 유사한 경향을 나타내었는데, 근수와 근경 모두 30일과 45일묘 간의 생육차이에 통계적 유의성이 없었다. 배양상토 종류에 따른 근수와 근경 역시 지상부에서의 결과와 같이 모든 계대배양 후 배양일수에 상관없이 피트모스와 버미클라이트 조합이 다른 조합에 비하여 생육이 양호하였다.

생체중과 건물중 그리고 엽록소 함량도 공시품종인 ‘Ajuma’와 “Linerker’ 모두 45일묘와 30일묘간 통계적 유의성이 없었다(Table 14). 한편 기외 이식후 생존율은 피트모스와 버미클라이트 혼합상토에서 배양일수에 상관없이 모두 100%의 생존율을 나타내었다. 이상의 결과를 종합하면, 기내배양묘의 자동화배양기로의 삽목은 기내배양 30일묘를 사용하는 것이 가장 좋은 것으로 판단된다.

본 연구의 중요한 목적 중에 하나는 기내에서의 배양기간을 최소화하는 한편, 기내에서 성장점배양을 통해 얻어진 다신초 상태의 shoot를 조기에 자동화배양기로 이식하여 삽목하여 증식시킴으로서 기내에서의 재증식단계를 자가영양배양으로 가능하게 하고자 하는 것이다. 이는 이미 이전 실험결과에서 나타난 바와같이 자가영양배양이 타가영양배양에 비하여 우량한 묘를 생산할 수 있기 때문이다. 본 실험의 결과 너무 조기에 다신초상태의 덩어리를 바로 자동화 배양기로 이식하는 것은 무리가 있으나 피트모스와 버미클라이트 혼합상토에서 배양일수에 상관없이 모두 100%의 생존율을 나타낸 것으로 보아 금후 30일묘 대신 10일 혹은 20일묘를 이용하여 기내배양묘의 조기 기외 이식에 관한 실험이 수행되어져야 할 것으로 판단된다.

Table 12. Effects of different growing substrates and plant stage on the growth of Chrysanthemum cvs. Ajuma and Lineker shoots in the Automatic Culture Chamber.

Stage	Sub ^Z	Initial shoot length (mm) (IS)	Shoot length (mm) (SS) ^Y	Increase in shoot length (mm) (SS-IS)	Initial no. of leaves (IL)	No. of leaves (SL)	Increase in no. of leaves (SL-IL)	Leaf area (cm ²)
cv. Ajuma								
0	Pm:Pr	0	30.33	30.33 d	0	6	6.00 a	1.45 d
	Pm:V	0	31.80	31.80 d	0	5	5.00 a	2.45 c
	V:Pr	0	6.00	6.00 e	0	5	5.00 ab	0.53 e
30	Pm:Pr	31.97	119.66	89.10 a	7.6	12	4.00 abc	4.37 b
	Pm:V	31.97	98.33	66.36 b	7.6	11	3.26 bcd	5.51 a
	V:Pr	31.97	76.00	44.03 c	7.6	10	2.33 cd	2.09 cd
45	Pm:Pr	44.23	125.00	87.69 a	10.9	13	2.10 cd	3.63 b
	Pm:V	44.23	133.33	80.70 a	10.9	13	2.82 bcd	5.58 a
	V:Pr	44.23	72.00	27.77 d	10.9	11	1.88 d	1.70 cd
cv. Lineker								
0	Pm:Pr	0	30.30	30.30 c	0	6	6.00 b	2.46 d
	Pm:V	0	31.50	31.55 c	0	7	7.00 a	2.24 d
	V:Pr	0	8.00	8.00 d	0	4	4.00 c	0.60 e
30	Pm:Pr	25.51	124.66	99.15 a	7.2	10	3.13 cde	4.48 bc
	Pm:V	25.51	107.33	81.82 b	7.2	10	3.20 cde	5.42 b
	V:Pr	25.51	61.66	36.15 c	7.2	10	2.46 de	2.67 d
45	Pm:Pr	39.44	132.66	94.22 a	8.9	12	3.16 cde	4.35 c
	Pm:V	39.44	138.33	99.89 a	8.9	12	3.50 cd	6.09 a
	V:Pr	39.44	65.33	26.89 c	8.9	11	2.03 e	2.60 d

^Z Substrate combinations: Pm-peatmoss, Pr-Perlite, V-Vermiculite (1:1 v/v)

^Y Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test at 5% level.

Table 13. Effects of different growing substrates and plant stage on stem diameter and root growth of Chrysanthemum cvs. Ajuma and Lineker shoots in the Automatic Culture Chamber.

Stage	Sub ^Z	Stem diameter (mm)	No. of roots	Root diameter (mm)
cv. Ajuma				
0	Pm:Pr	1.54 e	12 e	0.27 b
	Pm:V	1.85 bc	17 e	0.35 ab
	V:Pr	1.71 cde	13 e	0.34 b
30	Pm:Pr	1.86 bc	87 b	0.42 a
	Pm:V	2.00 a	87 b	0.36 ab
	V:Pr	1.60 de	34 d	0.44 a
45	Pm:Pr	1.88 abc	102 a	0.35 ab
	Pm:V	2.07 a	74 c	0.38 a
	V:Pr	1.77 cd	42 d	0.46 a
cv. Lineker				
0	Pm:Pr	1.39 b	10 e	0.30 b
	Pm:V	1.78 a	19 e	0.33 b
	V:Pr	1.14 c	10 e	0.35 b
30	Pm:Pr	1.78 a	88 ab	0.36 b
	Pm:V	1.94 a	78 b	0.32 b
	V:Pr	1.49 b	38 d	0.38 b
45	Pm:Pr	1.86 a	94 a	0.36 b
	Pm:V	1.94 a	61 c	0.32 b
	V:Pr	1.55 b	33 d	0.39 b

^Z Substrate combinations: Pm-Peatmoss, Pr-Perlite, V-Vermiculite (1:1 v/v)

^Y Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test at 5% level.

Table 14. Effects of different growing substrates and plant stage on plantlet fresh and dry weights, chlorophyll content and survival rate of Chrysanthemum cvs. Ajuma and Lineker shoots in the Automatic Culture Chamber.

Stage	Sub ^Z	Fresh weight (mg/plant) ^Y		Dry weight (mg/plant)		Chloro- phyll (SPAD)	Survival (%)
		Shoot	Root	Shoot	Root		
cv. Ajuma							
0	Pm:Pr	261.00 ed	95.53 e	20.06 e	13.73 c	24.07 c	100.00
	Pm:V	356.87 e	210.53 cd	27.40 e	18.40 c	29.17 b	86.00
	V:Pr	51.00 f	119.50 de	11.00 e	15.00 c	22.50 c	6.66
30	Pm:Pr	1521.10 a	504.00 a	158.72 b	45.33 b	32.42 a	100.00
	Pm:V	1270.93 b	440.33 a	107.06 c	46.40 b	29.60 ab	63.00
	V:Pr	779.53 c	284.00 bc	53.00 d	18.40 c	24.95 c	60.00
45	Pm:Pr	1604.56 a	509.40 a	186.98 a	62.70 a	33.06 a	100.00
	Pm:V	1726.27 a	511.20 a	143.46 b	41.13 b	31.20 ab	96.67
	V:Pr	538.40 d	343.00 b	58.40 d	45.00 b	30.84 ab	20.00
cv. Lineker							
0	Pm:Pr	340.20 fg	114.40 de	26.80 fg	11.10 c	25.42 de	73.33
	Pm:V	433.56 ef	150.77 de	45.33 ef	26.11 b	25.30 de	30.00
	V:Pr	90.00 g	45.00 e	15.00 g	12.00 c	25.00 e	3.33
30	Pm:Pr	1617.78 bc	411.07 b	207.12 ab	61.40 a	33.67 a	100.00
	Pm:V	1418.27 c	553.66 a	146.40 c	55.47 a	28.94 cde	30.00
	V:Pr	800.00 d	235.80 cd	68.40 d	23.00 bc	28.30 cde	50.00
45	Pm:Pr	1774.92 b	515.67 ab	216.13 a	65.60 a	32.97 ab	80.00
	Pm:V	2081.40 a	632.60 a	184.46 b	54.06 a	31.59 abc	100.00
	V:Pr	648.73 de	278.06 c	82.13 d	31.40 b	29.36 bcd	70.00

^Z Substrate combinations: Pm-peatmoss, Pr-Perlite, V-Vermiculite (1:1 v/v)

^Y Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test at 5% level.

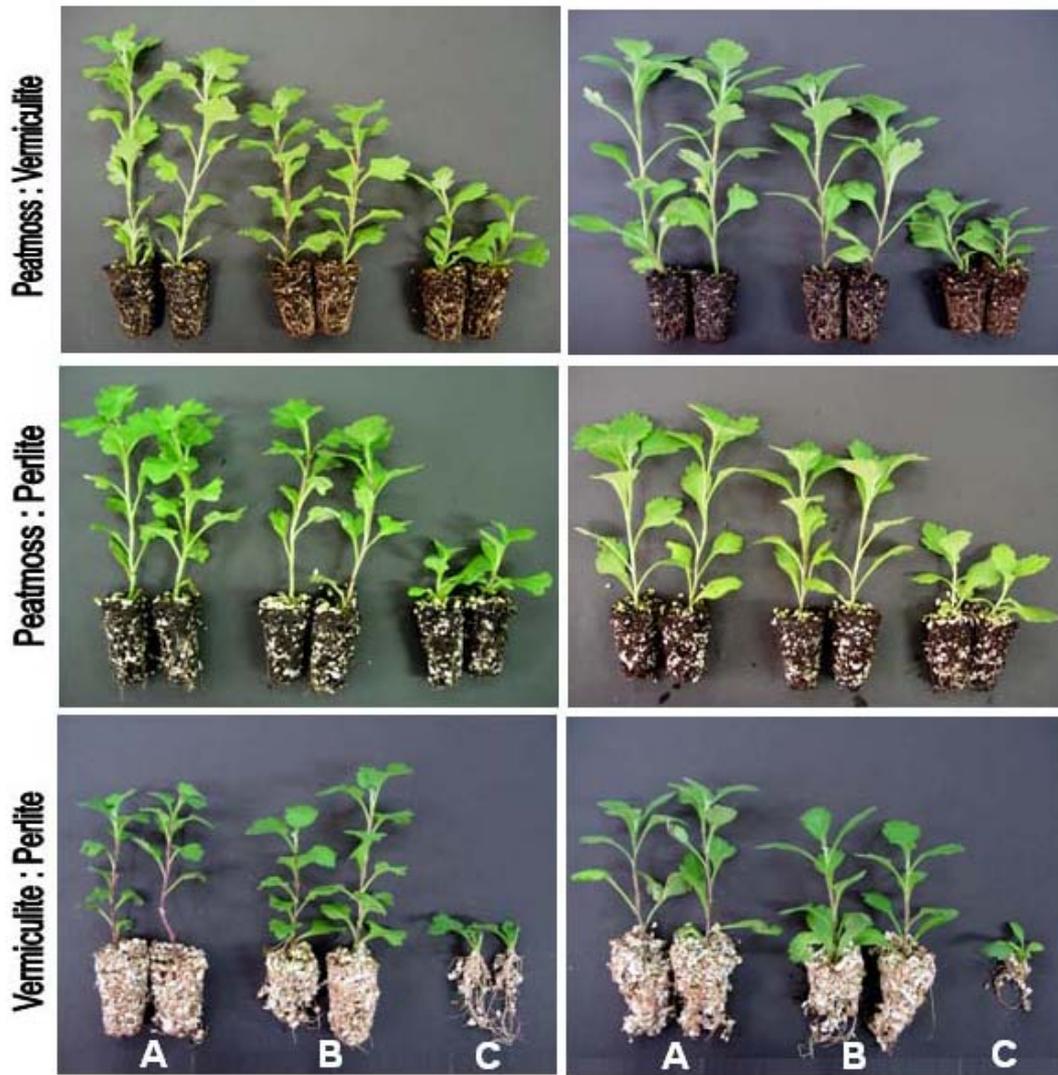


Figure 10. growth of Chrysanthemum cvs. 'Baeksun' on different culture days and substrates in the Automatic Culture Chamber('Ajuma'(left), 'Linerker' (right), A: cuttings in 45days, B: cuttings in 30days, C: on cutting day

한편, 자동식물 배양기(연속순환식 자동식물 배양 시스템)내에서의 우량국화묘 생산을 위한 육묘일수에 따른 생육반응을 조사한 결과는 표 15와 같다. 엽수는 공시 품종 'Baeksun' 'Ajuma', 'Baekwha' 모두 20일 경에서 생장이 왕성하며 엽수, 경장이 생장

을 하였으나 경경에서는 30일 처리구에서 굵어지나 다소 도장하는 경향이 있었다. 그리고 엽록소 측정기(SPAD-502)를 이용한 국화엽의 엽록소 함량을 최상부에서부터 매 3엽부위에 측정하였다. 20일 처리구에서 SPAD값이 가장 높았고, 30일 순이었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 국화는 삼목한 후 20일경에서 생육이 가장 왕성하고 그 이후부터는 생육이 저조하여 별도의 영양공급과 배양환경 등의 조절이 필요할 것으로 판단되었다. 이상의 결과를 고려해 볼 때 자동배양기내에서의 국화삼목 후 육묘기간은 30일보다는 20일간 육묘한 후에 순화실로 이동하여 육묘하는 것이 삼목묘 재생산에 유리할 것으로 판단된다.

Table 15. Effects of different planting days on the growth of Chrysanthemum cvs. 'Baeksun' 'Ajuma', 'Baekwha' in the Automatic Culture Chamber

Variety	Planting days	No. of leaves	Stem Length(cm)	Stem Width(mm)	SPAD
'Baeksun'	1	3.4±0.3	4.5±0.4	3.8±0.3	34.6±3.03
	10	3.5±0.4	4.7±0.5	3.9±0.4	28.7±2.96
	20	4.2±0.2	5.8±0.3	4.3±0.3	30.3±3.41
	30	5.4±0.3	6.2±0.6	4.5±0.2	29.4±2.96
'Ajuma'	1	3.4±0.4	4.1±0.3	3.5±0.4	32.4±3.42
	10	3.4±0.4	4.3±0.3	3.5±0.4	29.7±3.14
	20	3.6±0.4	5.9±0.3	3.6±0.5	31.3±2.54
	30	4.2±0.4	6.2±0.3	3.8±0.4	29.8±2.23
'Baekwha'	1	3.4±0.2	4.0±0.4	3.4±0.3	32.4±2.08
	10	3.6±0.3	4.5±0.3	3.7±0.3	28.2±2.35
	20	4.2±0.2	5.5±0.5	3.9±0.3	33.3±2.46
	30	4.4±0.4	6.0±0.3	4.0±0.3	30.4±2.25

2) 자동화배양기내 국화 삽목시 nodal position에 따른 국화 묘의 성장

기내 생산된 국화 줄기를 상부, 중부, 하부로 나누어 기외 삽목한 결과, 상부에서 하부로 갈수록 초장과 엽수, 생체중과 건물중의 차이가 나타났는데 상부로 갈수록 생장과 생존율이 증가하는 경향이였다 (표 16). 근수와 근장 그리고 건물중도 같은 경향을 나타내었다. 자동화배양기내 삽목묘의 성장시 하부로 갈수록 이미 목질화와 및 하엽현상이 나타나기 시작하여 뿌리 및 신초형성이 늦었기때문인 것으로 생각되었다 (Tomas, 1998). 삽목시에는 엽면적, 삽수의 생체중, 삽목 부위와 같은 다양한 생리학적 요인들이 기외 발근에 영향을 주는데, 포도의 삽목시 초기에는 상부의 발근속도가 느렸으나 삽목 7일후에는 발근율이 가장 높았고 기부의 발근율도 저조하였다는 보고가 있다 (Tomas, 2000). 그 외에도 삽수의 엽면적이 작을수록 상대적으로 신초발생은 빠르나 그 생장은 약하며 큰 잎을 가진 삽수는 뿌리생장이 빠르고 신초발생은 지체되나 왕성한 성장을 한다고 하였다. 국화는 일정기간동안 자동화배양기내에서 길이 성장을 하기 때문에 재삽목시 그 위치에 따라 생장이 다를것으로 예상된다. 따라서 재삽목 후 줄기신장에 걸리는 배양기간을 단축시킴으로서 기부의 삽수가 목질화되기 전에 삽목하는 것이 중요하다고 생각된다.

Table 16. Effects of node position on the growth of Chrysanthemum cv. Beckson shoots in vitro.

Node position	Shoot length (mm) ^Z	No. of nodes	Stem diameter (mm)	No. of roots	Root length (mm)	Fresh weight (mg/plant)	Dry weight (mg/plant)
Upper	104 a	13 a	1.81 a	11 a	96 a	788.80 a	49.00 a
Middle	77 b	11 b	1.69 a	9 b	92 a	566.40 b	35.30 b
Lower	53 c	10 b	1.45 b	6 c	89 a	413.50 b	26.20 c

^ZMean separation within column by Duncan's Multiple Range Test at 5% level.

3) 자동화배양기내 광양자속밀도(PPFD)가 국화 묘의 성장에 미치는 영향

PPFD의 증가는 광합성과 성장을 촉진시키는 효과와 함께 엽록소의 함량에도 영향을

끼친다고 한다 (Nguyen 등, 1998). 그러나 적정 광도 이상의 PPF는 식물체 신장을 억제하고 마디 간격을 줄이는 등 식물생육에 부정적인 영향을 미친다. 본 연구결과에서도 PPF 200 $\mu\text{m m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서는 생장이 억제되었는데 (Table 17), 이는 광도의 영향뿐만 아니라 고광에 의한 온도 상승으로 인한 부정적 영향때문인 것으로 판단된다. Jeong 등(1996)은 카네이션 기내배양시 PPF가 높을수록 생체중과 건물중 및 엽면적은 증가하지만 초장이 짧아짐과 동시에 엽수도 감소한다고 하여 본 실험의 결과와 동일하였다. Nguyen 등(1999)은 적정 PPF보다 높은 광조건은 식물생장을 저해한다고 하여 식물체의 대량생산에는 효과적이지 않다고 하였다. 본 실험에서는 PPF 100 $\mu\text{m m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 이 국화 식물체 배양에 가장 효과적이었다.

표 17. Effects of different PPF on the growth of Chrysanthemum cvs. 'Ajuma', in the Automatic Culture Chamber

PPFD ($\mu\text{m m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Roting media(v/v)	Poro- sity	No.of leaves	No.of Root	Stem Length (cm)	Root Length (cm)	Fresh Weight (g/plant)
50	TKS2	75.5	4.2	16.5 \pm 2.5	4.2 \pm 0.4	3.2 \pm 0.2	2.6 \pm 0.2
	TKS2:PL=6:4	80.0	4.5	20.4 \pm 1.2	6.0 \pm 0.4	3.8 \pm 0.2	3.3 \pm 0.1
	TKS2:PL=7:3	75.0	4.3	24.6 \pm 1.8	6.5 \pm 0.3	4.3 \pm 0.1	3.2 \pm 0.1
100	TKS2	75.0	4.4	18.2 \pm 2.5	4.5 \pm 0.3	3.5 \pm 0.1	2.7 \pm 0.2
	TKS2:PL=6:4	88.0	4.8	27.5 \pm 2.4	5.4 \pm 0.4	4.4 \pm 0.1	3.4 \pm 0.1
	TKS2:PL=7:3	82.5	4.5	25.6 \pm 2.5	5.8 \pm 0.2	4.6 \pm 0.2	3.6 \pm 0.1
200	TKS2	80.0	4.3	17.5 \pm 2.2	4.2 \pm 0.3	3.8 \pm 0.1	2.7 \pm 0.1
	TKS2:PL=6:4	82.5	4.6	22.5 \pm 2.4	4.8 \pm 0.3	4.2 \pm 0.2	3.4 \pm 0.2
	TKS2:PL=7:3	85.0	5.2	24.5 \pm 1.6	4.6 \pm 0.2	4.2 \pm 0.2	3.8 \pm 0.2

PL=Perlite, VM=Vermiculite

4) 상토종류에 따른 주야온도차와 수분 공급 시간이 삼목묘 생육에 미치는 영향
연속순환식 자동식물 배양기내 트레이를 기존 시판용 플러그트레이를 사용하기 위하여 이에 적합한 배양상토를 선별하기 위하여 상토별 조성예 따른 생육반응 결과를 조

사한 결과는 표 18과 같다. 입자가 굵은 펄라이트가 많이 첨가된 TKS2:PL=6:4와 TKS2:PL=7:3에서 셀형성율, 근장, 경경이 모든 처리구에서 보다 높았으며, 이는 상토 배지내 토양공극에 의해서 습도 및 공기순환이 용이하여서 그런 결과가 나온 것이었다. 상대적으로 TKS2:VM=7:3 TKS2:PT=6:4은 뿌리와 줄기의 생장이 억제 되었다. 생체중과 건물중에서도 TKS2:PL=6:4와 TKS2:PL= 7:3처리구에서 3.4g, 3.6g과 446mg, 458mg 으로 다른 처리구에서보다 생육이 왕성하고 셀형성에서도 양호하였다 (그림 11). 이는 뿌리생장을 위해서는(삭제) 배지의 물리성과 토양 내 공극이 적절하여 뿌리의 생육이 왕성하였던 것으로 판단되었다. 이와 같은 결과는 오 등(1998)이 '수방력'과 '올랜드' 품종에 있어서는 입자가 굵은 PL(펄라이트)와 PL3+PT(피트모스)이 발근 좋고 VM(버어미큘라이트), PT, PL+VM은 뿌리와 줄기생장을 억제하였다. 그리고 AFP가 높은 배지일수록 삼수의 기부절단면에서 부정근의 유도와 뿌리의 신장을 위해 필요한 산소의 공급과 이산화탄소의 제거를 위한 기체 확산이 더 용이하다는 보고와 일치하였다.

표 18. Effects of different substrates on the growth of Chrysanthemum in the Automatic Culture Chamber

Substrates	Porosity (%)	No.of leaves	Stem Length (cm)	Root Length (cm)	Fresh Weight (g/plant)	Dry Weight (mg/plant)
TKS2	75.0	4.4	8.2±0.4	4.5±0.3	2.7±0.4	405±15.5
TKS2:PL=5:5	75.0	4.6	8.8±0.3	4.8±0.4	3.1±0.3	421±16.2
TKS2:PL=6:4	87.5	4.8	8.5±0.5	5.4±0.4	3.4±0.4	446±15.0
TKS2:PL=7:3	85.0	4.5	8.8±0.4	5.8±0.6	3.6±0.3	458±13.6
TKS2:VM=5:5	77.5	4.8	7.4±0.6	4.5±0.5	3.0±0.2	432±12.5
TKS2:VM=6:4	80.0	5.4	7.0±0.4	4.8±0.3	3.1±0.5	435±12.0
TKS2:VM=7:3	77.5	5.0	7.5±0.5	5.2±0.4	3.2±0.5	423±13.5
TKS2:PT=5:5	77.5	4.5	8.5±0.5	4.6±0.3	2.8±0.4	432±13.8
TKS2:PT=6:4	75.0	5.2	8.8±0.3	4.8±0.2	2.6±0.3	430±12.4
TKS2:PT=7:3	75.0	5.0	9.2±0.5	4.0±0.3	2.5±0.5	433±12.6

PL=Perlite, VM=Vermiculite, PT=peatmoss

자동식물 배양기내에서 주야온도차에 따른 국화 생육반응의 결과는 표 19와 같다. 25/25℃ 처리구에서 상토의 조성에 관계없이 셀형성율에 있어서 높았으며 25/20℃(5℃ 차) 처리구에서는 근수, 엽장, 근장에서 다른 모든 처리구에 비해 상대적으로 생장이 억제하였다. 이는 주야 온도차에 의해서 생장이 억제되었으나 생체중에서는 다른 처리구에 비해 큰 차이가 보이지 않은 것으로 보아 삼수내의 묘소질이 좋은 것으로 보인다. 그러나 23/20℃에 TKS2:PL=6:4, TKS2:PL=7:3 처리구가 근수, 근장, 엽장 등 모든 처리구에서 생장이 촉진 양호한 것으로 사료되며 자동식물 배양기(연속순환식 자동식물 배양 시스템)내에서 국화의 삼목시 적절한 온도 처리는 23/20℃를 선택하는 것이 적당한 것으로 보인다.

표 19. Effects of DIF on the growth of Chrysanthemum cvs. 'Ajuma', in the Automatic Culture Chamber

Day/ Night °C	Rooting media(v/v)	Porosity (%)	No.of leaves	No.of Root	Stem Length (cm)	Root Length (cm)	Fresh Weight (g/plant)
25/20℃	TKS2	72.5	4.2	14.6±3.2	3.8±0.4	3.2±0.3	2.8±0.4
	TKS2:PL=5:5	75.0	4.4	17.5±2.8	4.3±0.3	3.8±0.4	3.2±0.4
	TKS2:PL=6:4	75.0	4.5	20.2±3.5	4.6±0.4	3.8±0.4	3.0±0.3
	TKS2:PL=7:3	80.0	4.6	20.6±3.4	4.8±0.3	4.3±0.4	3.1±0.3
23/20℃	TKS2	75.0	4.5	17.4±2.5	4.4±0.3	3.4±0.4	2.6±0.4
	TKS2:PL=5:5	76.5	4.8	19.2±3.4	5.0±0.4	4.2±0.5	2.8±0.5
	TKS2:PL=6:4	85.0	4.6	25.2±3.3	5.2±0.4	4.2±0.3	3.7±0.3
	TKS2:PL=7:3	82.5	4.5	23.4±2.6	5.0±0.3	4.5±0.4	3.5±0.4
25/25℃	TKS2	75.0	4.4	18.2±4.5	4.5±0.3	3.5±0.4	2.7±0.4
	TKS2:PL=5:5	76.0	4.5	22.8±3.2	4.8±0.4	3.8±0.3	3.1±0.3
	TKS2:PL=6:4	87.5	4.5	25.2±2.4	5.4±0.4	4.4±0.5	3.4±0.4
	TKS2:PL=7:3	85.0	4.2	27.6±3.5	5.8±0.6	4.6±0.4	3.6±0.3

PL=Perlite, VM=Vermiculite, PT=peatmoss,

자동식물 배양기내의 상토종류와 수분 공급 시간에 따른 국화 생육반응에 대한 결과는 표 9와 같다. 트레이에 있는 삽수에 수분공급을 위하여 70ml/tray/6hr(매 6시간마다 트레이당 70ml의 물)을 공급한 처리구에서 생육이 전반적으로 좋았고 특히 경장, 근장, 생체중과 셀형성율에서는 TKS2:PL=6:4처리구에 70ml/tray/4hr처리구와 TKS2:PL=6:4, TKS2:PL=7:3 상토에 70ml/tray/6h에서 각각 82.5%, 87.5%, 85%로 가장 높게 나타났고, 근장과 엽수에서는 수분공급을 70ml/tray/4hr한 처리구에서의 TKS2:PL=6:4, TKS2:PL=7:3 처리구가 3.8cm, 4.8매, 4.3cm, 5.0매로 다른 처리구에서 보다 높게 나왔다. 이는 제한된 공간 내에서 자유로운 환경조절이 가능한 자동식물 배양기내에서 일정기간 국화의 생산성 향상을 위한 가장 시급한 것은 묘생산의 전문화와 전업화를 통한 공정육묘 방법의 확립이 시급한 관계로 산업화를 추진해볼만 한 것으로 사료된다. 상 등(1999)도 국화 삽수에 있어서 광도와 분무간격이 발근 및 묘 품질에 미치는 영향에서 품종이나 형질에 따라 약간의 차이는 있다고 하였다.

표 20. Effects of different substrates and irrigation time on the growth of *Chrysanthemum* cvs. 'Ajuma' in the Automatic Culture Chamber

Irrigation time	Substrates (v/v)	Porosity (%)	No.of leaves	No.of Root	Stem Length (cm)	Root Length (cm)	Fresh Weight (g/plant)
70ml /tray /4hr	TKS2	75.0	4.4	16.5±3.5	4.2±0.4	3.2±0.4	2.6±0.5
	TKS2:PL=5:5	75.0	4.5	20.4±2.5	4.5±0.3	3.5±0.3	3.0±0.4
	TKS2:PL=6:4	75.0	4.8	25.4±3.2	5.0±0.4	3.8±0.4	3.1±0.3
	TKS2:PL=7:3	82.5	5.0	26.6±2.8	5.5±0.3	4.3±0.3	3.5±0.4
70ml /tray /6hr	TKS2	75.0	4.4	18.2±4.5	4.5±0.3	3.5±0.4	2.7±0.4
	TKS2:PL=5:5	75.0	4.6	22.8±3.2	4.8±0.4	3.8±0.3	3.1±0.3
	TKS2:PL=6:4	87.5	4.8	23.2±2.4	5.4±0.4	4.4±0.3	3.4±0.4
	TKS2:PL=7:3	85.0	4.5	24.6±3.5	5.8±0.6	4.6±0.4	3.6±0.3
70ml /tray /8hr	TKS2	72.5	4.5	17.4±0.4	4.6±0.5	3.6±0.4	2.5±0.4
	TKS2:PL=5:5	72.0	4.6	18.8±0.3	4.7±0.4	3.8±0.3	2.7±0.3
	TKS2:PL=6:4	77.5	5.0	21.2±0.4	4.0±0.3	4.0±0.4	2.8±0.5
	TKS2:PL=7:3	75.0	5.2	20.4±0.5	4.8±0.4	3.8±0.4	3.0±0.4

PL=Perlite, VM=Vermiculite, PT=peatmoss,

5) 성장조절제 및 플러그셀크기가 삼목묘 생육에 미치는 영향

성장조절제 처리에 따른 국화 품종별 발근효과를 보면(Table 21), 전체적으로 백선이 퓨마보다 생육과 발근이 양호하였으나 NAA 1,000mg/L⁻¹, 2,000mg/L⁻¹, 3,000mg/L⁻¹ 처리구에서 퓨마의 발근율, 근수와 근장에서는 호르몬별 차이와 품종간의 차이가 나서 자동배양기내에서도 품종별 생육차가 있는 것으로 보였다. 두 품종간 IBA 처리구에서는 다른 성장호르몬에서보다 근장이 가장 길었으며 근수, 생체중과 발근율도 양호하였다. 그러나 전체적인 생체중과 건물중에서는 백선 품종이 퓨마보다도 높은 것으로 나타났다. 원예연구소 육성품종인 'Baekhwa'에서는 IBA 5mg/L⁻¹, NAA 1,000mg/L⁻¹, 처리구에서 건물중량이 441.5, 445.0mg으로 우량플러그를 위한 농도로 적정하나 근장과 근수에 있어서는 Rootone에서 보면 'Baeksun' 근수 27.5개, 근장 3.8cm 'Puma' 근수 26.5개 근장 3.8cm 'Baekhwa' 근수 26.5개, 근장 3.5cm 로서 전반적으로 양호 하였다. 그래서 Rootone이 IBA 1, 5mg/L⁻¹보다는 생육전반에 양호하여 국화삼목용 호르몬제 처리하는 것이 자동배양기내에서 우량삼목묘의 생산을 위해서는 효과가 있는 것으로 보인다.

한편, 국화 'Ajuma'에서는 Paclobutrazol 농도 및 횟수 에 따라 공극율은 92.5%에서 80.0%, 또한 근수는 농도가 증가할수록 작아졌고 근장은 짧아지는 경향 이었다 (Table 22). 그러나 Paclobutrazol 10mg/L⁻¹ 1회처리구에서는에서의 건물중이 424.5±11.7로 무 처리구보다 5.4% 증가하였고 Paclobutrazol 5mg/L⁻¹ 2회처리에서는 435.4mg으로 8.2%나 증가하였다. 국화'Ajuma'에 있어서는 묘소질향상을 위한 방법으로 Paclobutrazol 10mg/L⁻¹ 1회처리 하는 방법을 권장해 볼 수 있다고 생각된다. 국화'Sulak'와'Baekhwa'에서는 Paclobutrazol 농도 및 횟수에 따라 공극율은 90.0%에서 82.5%로 낮아졌으며, 또한 엽장, 근수, 근장은 농도가 증가할수록 작아졌고, 짧아지는 경향이였다. 국화 'Sulak'와'Baekhwa'에 있어서 묘소질향상을 위한 방법으로 Paclobutrazol 10mg/L⁻¹ 1회 처리 하는 방법과 5mg/L⁻¹ 2회처리 방법이 상대적으로 건물중에서 양호하여 우량묘생산을 위한 한 방법으로 생각해 볼 수 있다.

Table 21. Effects of different plant growth regulators on the growth of Chrysanthemum cvs. 'Baeksun', 'Fuma', 'Baekhwa' in the Automatic Culture Chamber

	Plant growth regulators(mg/L ⁻¹)	Ratio of Rooting	No. of root per Plant	Root Length(cm)	Fresh Weight (g/plant)	Dry Weight (mg/plant)
Baek-sun	Control	82.5	20.5±2.5	3.0±0.3	2.8±0.4	405.5±25.6
	Rootone	90.0	27.5±3.5	3.8±0.4	3.6±0.3	435.6±24.4
	IBA 1	85.0	24.5±3.2	4.0±0.4	3.5±0.5	440.2±35.3
	IBA 5	95.0	25.6±2.8	4.3±0.5	3.8±0.4	445.3±25.7
	IBA 10	92.5	22.5±3.4	3.6±0.4	3.6±0.4	435.2±24.0
	NAA 1,000	82.5	22.4±4.2	4.2±0.5	3.6±0.5	430.4±30.6
	NAA 2,000	92.0	25.6±3.5	3.8±0.4	3.9±0.4	445.5±15.5
	NAA 5,000	92.5	23.4±3.2	3.5±0.4	3.4±0.4	425.5±35.4
	Fuma	Rootone	92.5	26.5±3.5	3.8±0.3	3.2±0.4
IBA 1		82.5	23.4±3.0	3.2±0.4	3.4±0.3	420.6±23.3
IBA 5		92.5	26.5±2.4	3.5±0.4	3.6±0.3	433.5±16.4
IBA 10		92.5	22.5±3.6	3.0±0.3	3.5±0.5	445.0±23.4
NAA 1,000		90.0	24.5±2.8	3.5±0.4	3.5±0.4	435.2±25.7
NAA 2,000		95.0	26.5±3.2	3.2±0.3	3.7±0.3	440.5±20.3
NAA 5,000		92.5	22.5±3.5	2.8±0.5	3.3±0.5	426.0±25.4
Baek-hwa	Rootone	90.0	26.5±2.5	3.5±0.5	3.4±0.4	445.4±20.4
	IBA 1	80.0	23.4±2.4	3.3±0.4	3.7±0.5	422.4±25.5
	IBA 5	92.5	24.2±2.7	3.4±0.6	3.6±0.6	441.5±21.5
	IBA 10	95.0	20.3±3.1	3.0±0.5	3.8±0.4	435.0±21.3
	NAA 1,000	90.0	22.5±2.4	3.2±0.4	3.6±0.3	445.2±24.4
	NAA 2,000	92.5	24.3±3.5	3.5±0.6	3.7±0.5	440.5±26.2
	NAA 5,000	92.5	22.5±3.2	2.7±0.4	3.3±0.4	425.0±22.7

Table 22. Effects of paclobutrazol on the growth of Chrysanthemum cvs. 'Ajuma', 'Sulak', 'Baekhwa' in the Automatic Culture Chamber

Variety	Paclobutrazol (mg/L ⁻¹)		Porosity (%)	No. of leaves	No. of Root	Stem Length (cm)	Root Length(cm)	Dry Weight(g/plant)
	Con.	Time						
Ajuma	0	0	92.5	4.5	21.2±3.5	5.4±0.4	6.2±0.3	402.6±9.4
	5	1	90.0	4.2	20.4±2.8	5.2±0.5	5.4±0.4	423.5±12.0
		2	87.5	4.0	18.7±3.1	4.2±0.6	5.0±0.5	435.4±11.4
	10	1	90.0	4.2	18.2±3.7	5.0±0.4	5.0±0.3	424.7±10.5
		2	87.5	4.0	17.5±2.4	4.4±0.7	4.7±0.4	422.5±11.7
	30	1	82.5	4.0	17.2±3.6	4.3±0.6	4.8±0.6	415.4±10.5
2		80.0	4.0	16.8±3.5	4.3±0.5	4.2±0.4	412.8±12.4	
Sulak	0	0	90.0	4.5	21.4±2.1	5.2±0.2	5.6±0.4	389.6±12.8
	5	1	90.0	4.5	20.7±2.8	5.2±0.6	5.4±0.5	413.2±9.7
		2	85.0	4.0	18.4±3.1	4.6±0.7	5.2±0.3	425.3±10.4
	10	1	85.0	4.5	18.0±4.2	5.1±0.6	5.0±0.3	435.3±12.5
		2	82.5	4.2	18.0±3.0	4.4±0.5	4.9±0.4	414.5±10.4
	30	1	85.0	4.0	17.7±2.5	4.5±0.6	4.7±0.5	415.8±10.3
2		82.5	4.0	17.2±3.4	4.3±0.4	4.4±0.4	410.2±10.4	
Baekhwa	0	0	90.0	4.5	22.5±2.1	5.0±0.6	5.8±0.4	423.4±10.3
	5	1	85.0	4.2	21.4±3.4	4.9±0.4	5.5±0.6	422.5±12.4
		2	85.0	4.2	20.6±3.8	4.7±0.5	5.2±0.3	431.5±10.4
	10	1	85.0	4.2	21.8±2.2	5.1±0.4	4.8±0.4	428.2±11.6
		2	82.5	4.0	20.7±3.4	4.8±0.4	4.6±0.3	431.5±12.2
	30	1	82.5	4.0	18.4±3.2	4.9±0.5	4.6±0.5	424.6±10.5
2		80.0	4.0	18.2±2.7	4.5±0.4	4.5±0.3	422.4±11.7	

국화 '아즈마'의 자동식물 배양기내의 플러그 셀 크기에 따른 국화 생육반응을 조사한 결과는 표 23과 같다. 72구에서는 셀형성율이 65%에서 72.5%로 전반적으로 불량하였으며 이는 삼목 후 24일후 조사한 관계로 셀 내에서 충분한 발근과 생육을 하지 못한

것으로 보여지며 반면에 128구에서는 80%에서 95%로 셀형성이 높게나왔다. 엽수, 근수에서는 큰 차이가 없었으나 경장과 근장에서는 플러그셀 크기별 차이가 났으며 128구에서는 경장이 다른 처리구에서 보다 국화가 도장하는 경향이 있었으며 이런 경우에는 연약하게 성장하는 것을 방지하기 위해서는 미량의 성장호르몬제 즉 CCC나 Paclobutrazol 처리 실험을 병행해서 처리 실험을 병행해야 할 것이다. 그리고 128구에서는 뿌리의 길이도 다른 처리구에서보다 상대적으로 길게 생육하여 셀크기에 따라 차이를 보였다. 그리고 생체중에서는 플러그셀 128구에서 TKS2:PL=7:3와 TKS2:PL=6:4는 다른 모든 처리구에서 보다 생육이 양호하였다. 모든 플러그셀 크기별 처리에서 삽목상토는 TKS2:PL=3:7 조성 조합에서의 생육 전반적으로 TKS2:PL=6:4보다 약간의 차이가 보였다. 국화의 우량종묘 생산을 위한 적정 셀크기는 72구보다 128구가 초기생육이 좋았으나 향후 포장 실증실험을 수행해 보아야만 할 것으로 보인다. 오 등(2000)은 발근묘의 초장은 플러그 셀크기가 작을수록 증가하고 128공 이상일수록 100%셀형성을 이루었다고 하였다.

Table 23. Effects of different tray cell size and substrates on the growth of Chrysanthemum cvs. 'Ajuma' in the Automatic Culture Chamber

Variety	Tray cell size	Substrates	Poro -sity (%)	No.of leaves	No.of Root	Stem Length (cm)	Root Length (cm)	Dry Weight (mg/plant)
Ajuma	72	TKS2	65.0	4.0	16.5±3.5	4.2±0.3	2.5±0.3	412.5±20.5
		TKS2:PL=6:4	72.5	4.4	22.5±2.5	5.1±0.4	3.1±0.3	432.4±22.0
		TKS2:PL=7:3	70.0	4.5	20.2±3.5	5.3±0.6	3.2±0.2	436.2±21.5
	100	TKS2	75.0	4.4	18.2±4.5	4.5±0.3	2.7±0.4	405.6±15.5
		TKS2:PL=6:4	87.5	4.8	27.5±2.4	5.4±0.4	3.4±0.4	446.2±15.0
		TKS2:PL=7:3	85.0	5.0	25.6±3.5	5.8±0.6	3.6±0.3	458.8±13.6
	128	TKS2	80.0	4.3	17.5±3.2	5.2±0.3	3.8±0.4	385.4±18.5
		TKS2:PL=6:4	92.5	4.6	22.5±3.5	5.8±0.3	4.2±0.4	396.6±20.0
		TKS2:PL=7:3	95.0	5.2	24.5±3.2	6.2±0.6	4.2±0.4	408.5±13.5

PL=Perlite, VM=Vermiculite, PT=peatmoss

Table 24 Effects of different cutting times on the growth of Chrysanthemum cvs. 'Baeksun', 'Ajuma', 'Baekwha' in the Automatic Culture Chamber

Variety	Cutting time	Survival(%)	No.of leaves	Stem Length(cm)	Stem Width(cm)	chlorophyll content (SPAD unit)
Baek-sun	1	100	4.6±0.5	5.5±0.4	4.2±0.5	34.5±3.4
	3	100	4.5±0.6	5.2±0.3	4.0±0.4	32.6±3.6
	5	95	4.8±0.4	6.5±0.6	3.7±0.5	28.7±4.2
	10	95	4.4±0.5	6.5±0.4	3.5±0.4	25.6±4.5
Ajuma	1	100	4.5±0.5	5.5±0.5	4.8±0.3	35.4±3.4
	3	100	4.8±0.6	5.2±0.4	4.5±0.3	28.7±3.3
	5	97.5	5.2±0.4	6.2±0.3	4.2±0.3	25.6±2.6
	10	95	4.8±0.8	6.5±0.5	3.7±0.3	24.7±2.8
Baek-wha	1	100	4.6±0.6	4.5±0.4	4.6±0.6	33.5±2.7
	3	97.5	4.7±0.5	4.5±0.7	4.7±0.5	32.4±3.3
	5	97.5	5.4±0.5	5.5±0.5	4.2±0.	28.4±2.2
	10	95	5.2±0.4	6.5±0.4	3.3±0.4	26.1±2.4

6) 자동화배양기내 삽목묘 삽수생산 횟수에 따른 생육반응

국화 'Baeksun', 'Ajuma', 'Baekwha'의 모본에서 삽수채취를 연속해서 1, 3, 5, 10회 채취한 재료간의 비교실험의 결과는 표 24와 같다. 'Baeksun'에서 10회 채취시 경장이 6.5±0.4로 1회처리보다도 15%이상 신장하였고 경장도 17%이상 신장하였으나 이는 다소간 도장하는 경향이 있었다. 그리고 'Ajuma', 'Baekwha'에서도 유사한 실험 결과가 보였다. 그리고 'Baeksun' 5회 처리한 삽수에서의 묘소질에는 경장이 6.5cm, 경경이 3.7mm, SPAD수치도 28.4 로 10회 처리하는것 보다도 산업성과 묘소질에서 좋은 결과를 보였다. 'Ajuma', 'Baekwha'에서도 5회 처리시 SPAD값이 가장 높았고, 순위는 3

회, 5회, 10회 순이었다. 특히 10회에서는 도장하는 경향이 있었으며, 경장에서도 감소하였다. 이러한 결과로 영양생장중인 특히 삼목묘를 대량생산하는데 있어서 증식과 묘소질 측면에서는 자동식물 배양기내에서 국화의 삼수채취는 10회 이상은 상당한 문제가 있으며, 5~10회가 적절할 것으로 판단된다.

7) 자동화배양기에서 생산된 묘와 관행 배양방법과의 비교

자동화배양기와 관행 배양방법 간 공정묘 생산효율성을 단순비교 하는 것은 어려우나, 자동화배양기의 산업화를 위하여 표준화되어 있는 128공 트레이를 사용할 경우와 배양실내에서 750mL의 사각배양병을 사용하여 배양하는 경우에 배양후 30일간격으로 3회 묘생산량을 비교한 결과는 표 25와 같다. 공정육묘용 트레이 128공의 크기가 540×270mm임으로 이 면적에 채울 수 있는 750mL의 사각배양병의 개수는 20개 정도이다. 따라서, 128공 트레이 1개와 사각배양병 20개에서 생산되는 묘를 이용하여 다음 단계로의 삼수 또는 계대배양재료로 사용가능한 숫자를 비교하였다. 1회 묘생산시 두 방법간 큰 차이는 없었으나 생산횟수가 증가할수록 자동화배양기에서의 묘 생산량이 크게 증가하였다. 이는 자동화배양기내에서 생산한 묘의 초장이 관행방법에 비하여 길고 경경도 굵어 재삼목할 수 있는 삼수의 수가 증가하였기 때문인 것으로 판단된다.

Table 25. Yield of chrysanthemum plantlets as affected by the different culture methods

Culture methods	No. of initial nodal cuttings	No. of nodal cuttings		
		1 ^z	2	3
Heterotrophic culture	128	576±11	2,937±103	14,685±236
Photoautotrophic culture	180	558±23	1,893±121	8,679±354

^zNo. of harvesting time

자동화배양기를 이용하였을 때의 국화 공정묘의 생장은 기존방법으로 증식, 순화된 국화묘에 비하여 초장, 생체중, 경경 모두 1.5-2배 이상의 증가를 보였다 (표 26). 이와 같은 생장의 차이는 자동화배양기내의 배양환경 최적화와 연관이 있으며 이에 대해서

는 앞서의 실험 결과에서 충분히 설명되었다. 특히, 관행방법에서 문제가 되는 투명묘 발생율이 자동화배양배양묘에서는 전혀 발생되지 않았으며 묘의 상태도 균일하였다. 아울러 자동화배양기에서 묘를 생산할 경우 일반조직배양묘에서와 같이 순화단계가 필요 없이 100%의 활착율을 얻을 수 있는 장점이 있다.

이상이 결과에서와 같이 국화 공정묘의 생산에 자동화배양기를 이용한다면 동시에 많은 수의 삽수를 얻을 수 있을 뿐만 아니라 기외순화 및 공정묘 생산까지의 성장기간을 단축시키고 고품질의 묘를 얻을 수 있어 시간과 노동력의 절감에 크게 기여할 수 있을 것으로 판단된다. 특히, 일시에 묘소질이 동일한 묘를 대량생산할 수 있어 기외에서의 동일 모본으로부터 반복적인 삽수채취에 따른 묘소질의 저하를 막을 수 있는 효율적인 시스템이라고 생각된다.

Table 26. Growth of chrysanthemum plantlets as affected by the different culture methods

Culture method	Height (cm)	No. of nodes	Stem diameter (mm)	Hyper-hydricity (%)	Fresh weight (mg/plantlet) (A)	Chlorophyll content (mg · g ⁻¹ fw)	Survival (%)
Heterotrophic culture	3.3±0.1	3.1±0.2	0.97±0.01	31	101.0±4.6	1.0±0.0	64
Photoautotrophic culture	5.4±0.0	3.7±0.2	1.03±0.01	0	125.6±4.1	1.7±0.1	100

^wFigures are mean value ± standard error (SE).

제 2 절 플러그 삽목묘의 생산력 검토

1. 재료 및 방법

가. 기존 삽목묘와 자동화배양 삽목묘간 경제성분석

영주지역 특성상 무가온 하우스 국화재배를 하는 관계로 공시품종 국화 'Baeksun'을 2005년 5월부터 모래에서 24일간 삽목 발근한 삽목묘와 자동식물 배양기(연속순환식 자동식물 배양시스템)내의 기본 배양조건은 상토는 TKS2:PL=6:4 광도는1,500lux, 명16시간/암8시간, 육묘 트레이는 128공 트레이, 관수는 70ml/Tray/6hr, 공중습도는 70%로 생육 실험한 결과에서 나온 플러그묘를 생산하여 생산비 비교하기 위한 조건으로 200,000본 예상 생산 시 기존 삽목묘와 자동배양기에서 육묘한 국화 플러그묘의 경제성 분석을 비교하였다.

나. 삽목묘 재배실증 시험

삽목묘의 재배실증 실험을 위하여 삽목묘(그림 11)는 기내에서 계대 배양 후 8주간 순화 활착한 무독묘를 원종(그림 12)으로 하여 자동화배양기내에서 온도는 23/20℃, 수분공급은 70ml/tray/4hr, 상토는 TKS2:PL=6:4, 광도 1,500lux처리에서 육묘한 엽장 4cm, 경경이4mm의 균일한 플러그묘와 기존삽목묘로 사용하였으며, 공시품종 국화는 (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) 2005년 9월 수원 원예연구소에서 육성한 품종 중 'Baekwha'와 기존 실험 중이던 모본 'Baeksun' 등을 자동화배양기내(그림 6)에서 실험공시 품종으로 사용하였다. 본 실험은 앞장에서의 실험 결과에서 나온 상 중 하의 결과 자료를 바탕으로 하여 시료는 3일간 포장 정식 전 3일간 순화과정(그림 11)을 거친 후 실험재료로 사용하였다. 그리고 재배실증시험을 수행한 영주지역에는 2005년 5월부터 2006년 5월까지 국화 3농가에 플러그묘 50,000본을 2006년 4월에 생산하였다. 기초실험은 2005년 6월에 기초실험 연구를 하고 본 실험에 대한 국화의 플러그묘 생산시 우량종묘 즉 삽수생산을 위한 기초연구를 위하여 국화 플러그묘 생산에 있어서 플러그 트레이 크기와 모래에서 생산한 플러그묘의 발근과 생육에 미치는 영향을 구명하고자 실시되었다. 엽록소 측정은 국화선단부에서 아래 3번째 엽부위에 Chlorophyll meter(SPAD unit, minolta, SPAD-502)로 10개체씩 3반복 측정하였다.



Figure 11. The picture of culturing cuttings in chrysanthemum(hardening stage)



Figure 12. Mother plant of Chrysanthemum in actually culture

2. 결과 및 고찰

가. 기존 삽목묘와 자동화배양 삽목묘간 경제성분석

영주지역 특성상 무가운 하우스 국화재배를 하는 관계로 공시품종 국화 'Baeksun'을 2005년 5월부터 2006년5월까지 삽목묘와 앞에서 실험한 결과에서 나온 플러그묘를 생산하여 생산비 비교하기 위한 기존 삽목묘와 자동배양기에서 육묘한 국화 플러그묘의 경제성분석 결과는 Table 17에 있다. 가장 먼저 각처리구에서 나타난 묘 생산성에서는 삽목묘에 비해 차이가 있었다(Table 27). 그리고 삽목묘 처리구에서의 생산비중 인건비의 비중이 전체 생산비중에서 85.5%로 플러그묘 생산시 78.1% 보다 높게 나오나 이는 플러그 생산시 소비되는 상토비용 등과 자동화배양기사용 임대료비중 8.3% 등이 합산되어 상대적으로 비율이 낮은 관계로 큰 차이가 나왔다. 이는 인건비 비중을 줄이는 방법의 개선이 요구 된다. 그리고 중요한 요인 중에 원가계산으로 플러그 생산시 23.5원 소요되었고, 삽목묘에서 모본 확보비용을 제외하고 원가비용인 24.8원보다 94.8%로 낮게 나왔다. 그래서 플러그묘 생산시에는 생산비중에서 많이 차지하는 인건비, 상토와 트레이비용을 줄일 수 있는 방법과 단위면적당 생산 효율을 증진하고 대량의 생산을 위한 효율을 높이고 판매망과 신품종에 관한 모본 확보와 사업의 타당성을 고려하여야 한다.

Table 27. Comparison of costs on different culture methods

육묘 방법	비목	과목	내용	산출근거	산출근거
기존 삼목묘	지출	인건비	일시 사역인부	삼목작업160명×40,000원=6,400,000원	일당40,000원
			관리 0.5명×40일×40,000원=800,000원	인건비비중85.5%	
		일반 운영비	전기세	기본료 외 225kWh×113.8원=25,610원	한국전력
			상수도세	기본료 외 42m ² ×551.9원=23,180원	
			시설장비 유지비	임대료 외 20만원×2회=400,000원	300평당 20만원 4.7%
		재료비	시험연구비	모래 외 5종 20만원×2회=800,000원	9.5%
		계		8,425,610원	
		삼목묘 원가계산		8,425,610원÷400,000본÷*0.85=24.8원	*0.90:삼목성공율
자동화 배양기	지출	인건비	일시 사역인부	삼목작업 160명×40,000원=6,400,000원	일당40,000원
			관리 0.5명×40일×40,000원=800,000원	인건비비중78.1%	
		일반 운영비	전기세	기본료 외 300kWh×133.6원=40,080원	
			상수도세	기본료 외 34m ² ×551.9원=18,764원	
			시설장비 유지비	임대료 외 20만원×2회=400,000원 자동화배양기사용 임대료 26,000,000원÷20년÷6=361,111원	유지비중8.3%
		재료비	시험연구비	상토 외 5종 1,200,000원	재료비중 13%
		계		9,219,955원	
플러그 원가계산		9,219,955원÷400,000본÷*0.98=23.5원	*0.98:삼목성공율		

※ 삼수400,000본 기준

나. 삼목묘 재배실증 시험

플러그묘 생산에서는 균일하고 우량 양질묘를 얻기 위해서는 재배환경관리 뿐만 아니라 묘의 생육 특성이나 트레이의 크기와 적합한 비배관리 체계가 확립하는 것이 매우 중요하다. 그리고 생산된 국화 플러그묘가 농가 분양하여 실제적으로 실증실험을 수행해서 플러그묘의 시장성조사를 위해 자동식물 배양기(연속순환식 자동식물 배양시스템)내에서 실험한 결과 중 생육이 왕성한 처리구와 기존 삼목묘의 생육을 비교하기 위한 포장 실증 실험 분양 결과는 Table 28과 같다. 영주지역 국화 농가의 영농 컨설팅 결과는 국화 ‘Baeksun’을 5월10일 정식, 8월 15일 절화하는 재배작형에서 단경기 생산 하추국 재배가 주종이다. 평균 생산절화량(50,000본/300평)으로 수익(8,970천원/300평)으로 조사 되었다. 그리고 지출경비는 운송비는 320,000원, 자재비 1,120,000원, 인건비 및 농약비 1,500,000원으로 주요한 것은 전체 비중에서 인건비 및 농약비로 38%나 차지하여 차후에 경영분석을 하여 비용절감을 위한 방안을 강구하여야 할 것으로 판단된다.

Table 28. List of distribution in chrysanthemum culture

이름	주소	품종	수량	면적(평)	비고
석 삼진	경북 영주시 평은면 평은리	백선	20,000	1,200	8월중 개화
신 동근	경북 영주시 평은면 금광리	백선	10,000	900	8월중 개화
김 경원	경북 영주시 장수면 소룡리	백선	20,000	900	8월중 개화
계			50,000	3,000	

1) 플러그 크기 및 육묘일수별 자동화배양와 관행 삼목묘간 생육특성

국화 플러그묘 생산에 있어서 적정 트레이의 선택은 국화의 생육과 단위면적당 균일한 삼수를 동시에 생산해야 하는 문제가 있었다. 현재 200구부터 72구까지 다양한 크기의 플러그 트레이가 사용되고 있다. 국화에 있어서 발근배지의 부피와 삼수 사이의 거리를 의미하는 적정 cell 크기에 대한 연구(오욱 등 1998)가 되었다. Table 29를 보면 기존 모래에서 삼목 생산한 삼목묘는 생존율이 90%이었으나 128구에서는 생존율이 100%, 288구에서는 생존율이 85%로 삼수내의 공간이 확보가 안 된 관계로 삼수가 고사하는 경우가 발생하였으며, 포장 활착에 다소 저조하였다. 경장과 경경에서도 낮았고 엽형성에서는 토양 내 128구가 적정할 것으로 보인다. 삼목묘나 플러그묘 모두에서 10

일 후에는 발근이 시작되었고, 급속히 성장하였으며, SPAD(Wood 등 1993) 도 증가하기 시작하였다. 128구, 288구 플러그셀 삽목묘의 일수별 생육비교에서 전반적으로 발근상태, 근장, 엽수 등에서 128구 플러그 처리에서 생산된 플러그묘에서 다른 처리구에서보다 묘소질이 양호하였다.

Table 29. Effects of different tray cell size and cutting days on the growth of Chrysanthemum cvs. 'Baeksun' in the Automatic Culture Chamber

Tray cell size	Cutting days	Rate of survival (%)	No. of leaves	Stem Length(cm)	Stem Width(mm)	Chlorophyll content (SPAD unit)
Control	5	100.0	5.4±1.4	4.4±0.3	4.2±0.4	40.7±0.5
	7	95.0	5.8±1.5	5.2±0.6	4.3±0.3	42.3±0.7
	10	90.0	6.0±1.2	5.5±0.4	4.4±0.2	44.5±0.5
	21	90.0	6.4±1.3	5.7±0.4	4.4±0.4	44.7±0.9
128	5	100.0	5.4±1.4	4.5±0.3	4.2±0.3	41.7±0.7
	7	100.0	5.8±1.0	5.2±0.5	4.3±0.2	42.1±0.5
	10	100.0	6.2±1.2	5.5±0.5	4.4±0.5	42.5±0.6
	21	100.0	6.4±1.2	5.7±0.5	4.6±0.3	43.4±0.5
288	5	100.0	4.4±1.4	4.5±0.5	4.0±0.2	42.2±0.4
	7	95.0	5.4±1.3	5.2±0.4	4.2±0.2	43.4±0.5
	10	90.0	5.8±1.1	5.5±0.5	4.4±0.3	42.3±0.3
	21	85.0	6.6±1.2	6.3±0.3	4.4±0.4	41.7±0.6

국화 'Baekwha', 'Baeksun'에서 기존삽목묘와 Plug묘 생육비교를 위해 국화 플러그 육묘에서 셀 크기, 시비 농도 및 개시 시기가 묘소질 및 수량 등을 검토하여 나온 결과에서 기존 삽수와 자동식물 배양기(연속순환식 자동식물 배양시스템)내에서 실험한 플러그묘를 육묘에서 정식 후 생육 등에 미치는 영향을 검토하고자 비교 실험을 수행하

였다. 국화 ‘Baekwha’와 ‘Baeksun’ 기존삽목묘와 Plug묘의 정식 후 생육을 비교한 결과(Table 30)를 보면, ‘Baekwha’와 ‘Baeksun’ 품종 모두 는 정식 후 60일까지는 자동화 배양기에 생산된 플러그묘가 관행묘에 비하여 생존율이 높고, 경장과 경경도 증가하였다. 특히, 자동화배양기내에서 생산된 플러그묘는 100% 생존하였다. 또한, 정식 후 100 일째에는 두 품종 모두 자동화배양기에서 생산된 플러그묘와 관행묘간 생육 차이가 거의 없는 것으로 조사 되었다. 엽록소 함량은 초기에는 자연광에서 자란 모본에서 삽수를 채취한 관행묘가 높았으나 정식 후 60일경부터 100일 후에는 자동화배양묘가 관행묘에 비하여 높게 나타났다.

Table 30. Growth of Chrysanthemum cvs. ‘Baekwha’, ‘Baeksun’ grown by different culture methods according to transplanting days into field

Variety	Days	Culture methods	Rate of survival (%)	Stem Length(cm)	Stem Diameter(mm)	Chlorophyll content (SPAD unit)
Baekwha	30	Conventional rooted cuttings	95.0	11.0±1.3	4.0±0.1	42.4±2.7
		Cuttings of Plug cell	100	14.4±1.6	4.1±0.2	40.2±1.8
	60	Conventional rooted cuttings	95.0	46.2±2.2	4.3±0.2	43.2±2.8
		Cuttings of Plug cell	100	50.3±2.5	4.3±0.3	43.8±2.4
	100	Conventional rooted cuttings	95.0	128.0±5.4	5.5±0.2	44.6±2.6
		Cuttings of Plug cell	100	129.4±4.8	5.7±0.37	45.2±2.0
Baeksun	30	Conventional rooted cuttings	95.0	12.0±1.2	4.1±0.4	43.1±2.2
		Cuttings of Plug cell	100	16.4±1.3	4.2±0.5	44.2±1.5
	60	Conventional rooted cuttings	95.0	69.2±2.4	4.2±0.6	44.1±2.3
		Cuttings of Plug cell	100	63.4±3.7	4.4±0.3	44.2±1.4
	100	Conventional rooted cuttings	95.0	137.3±15.2	6.5±0.5	46.2±4.0
		Cuttings of Plug cell	97.5	134.4±12.2	6.6±0.3	47.2±3.2

묘 생산방법에 따른 국화 ‘백선’품종의 절화품질 및 개화기에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 31과 같다. 꽃목 굵기의 경우 자동화배양기에서 생산된 묘가 재래식 관행 삼목묘에 비하여 다소 증가하였으며, 화폭은 묘 생산방법에 관계없이 그 크기가 비슷하였다. 개화소요일수에 있어서는 자동화배양기에서 생산된 플러그 묘에서 다소 빨랐으나 큰 차이는 없었다. 두 처구간의 변이율, 상품화율과 불량화율에서 1.2% 와 0.5%, 85%와 87.5%로 자동화배양기에서 생산된 플러그묘가 양호하였다. 그리고 절화 불량화 생산율도 좋았다. 일반적으로 국화재배시 개화기조절 및 개화품질을 향상시키기 위하여 여러 종류의 성장조절제가 사용되고 있고 이들 성장조절제의 종류에 따라서 개화소요일수와 개화품질에 차이가 나타난다는 보고(Harn 등, 2002, Lee 1991)가 있으므로 이에 대한 보다 세밀한 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다. 한편, 오 등(2000)은 절화용 국화의 생산성 향상을 위한 여러방안들 중 가장 시급한 것은 묘생산의 전업화를 통한 공정육묘를 강조하였으며, 이런 육묘방법은 묘소질이 좋고 병발생도 줄고 절화의 품질향상과 모주관리의 이중노력을 없애서 전체적인 작업능률 향상과 기술 축적을 이룰 수 있다고 하였다.

Table 31. Flowering characteristics of Chrysanthemum cvs. ‘Baeksun’ grown by different culture methods into field

Plantlet production method	Length of spike (cm)	Diameter of spike (mm)	Flower width (cm)	Days to flowering	Rate of variation (%)	Rate of products (%)	Rate of inferior flowering (%)
Conventional rooted cuttings	5.3a	2.3a	12.1a	108	1.2	85.0	13.8
Automatic cultuturing system	5.7a	2.6a	12.3a	103	0.5	87.5	1.5

묘 생산방법에 따른 국화 ‘백선’품종의 절화수량을 조사한 결과는 표 32와 같다. 결주율과 고사율은 자동화배양기에서 생산된 플러그 묘에서 낮게 나타났다. 또한, 절화수량의 경우에도 관행삼목묘에 비하여 자동화배양기에서 생산된 삼목묘간 통계적 유의성이 없었다.

Table 32. Yield of Chrysanthemum cvs. 'Baeksun' grown by different culture methods into field.

Plantlet production method	Non-harvest (%)	Mortality (%)	Harvest (%)	Cut flowering yield (Bundle/10a)
Conventional rooted cuttings	4.6	1.9	95.0	2,336
Automatic culturing system	3.3	0.5	97.5	2,397

One bundle containing 20 clusters.

한편, 시설재배시 묘 생산방법에 따른 국화 '백선'품종의 상품화 수량을 조사한 결과는 그림 13과 같다. 상품율이 경우 자동화배양기에서 생산된 삽목묘를 사용하였을때 일반 삽목묘를 종묘로 사용한 경우에 비하여 상품화 수량이 높은 것으로 나타났다.

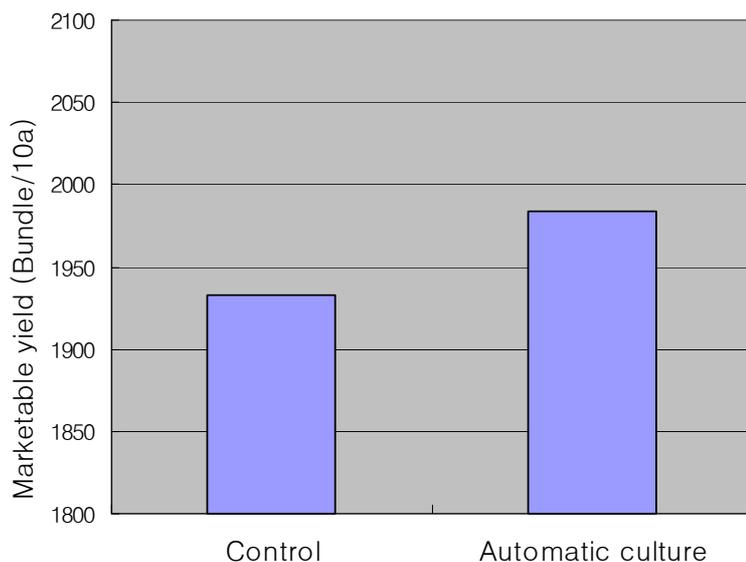


Figure 13. Marketable yield of Chrysanthemum cvs. 'Baeksun' grown by different culture methods into field.

이상의 결과를 종합하면 자동화배양묘와 관행묘간 포장에서의 생육정도와 개화품질을 고려할 때 관행배양묘에 비하여 자동화배양묘를 이용하는 것이 초기 활착율을 증진시킬 수 있을 뿐만 아니라 전반적인 생육 및 개화품질이 우수함으로 관행 삼목묘를 대체하는 효과를 기대할 수 있을 것으로 판단된다. 그러나 본 연구기간이 너무 짧아 관행 삼목묘와 자동화배양묘간 다양한 환경요인들 즉, 저온처리 유무, 성장조절제의 사용 등에 대한 보다 구체적인 요인들에 대한 실험들을 수행할 수 없었으므로 금후 이에 대한 보완 연구를 수행하여 자동화배양묘 산업화에 필요한 재배 기술을 구명할 필요가 있을 것으로 판단된다.



Figure 14. Growth of Chrysanthemum grown by different culture methods transplanted into field(Cuttings in automatic culture chamber(left), Conventional rooted cuttings(right))



Figure 15. Growth of Chrysanthemum grown by different culture methods transplanted into field after 4 weeks(Cuttings in automatic culture chamber(left), Conventional rooted cuttings(right))



Figure 16. Growth of Chrysanthemum grown by different culture methods transplanted into field after 8weeks(Cuttings in automatic culture chamber(left), Conventional rooted cuttings(right))



Figure 17. Flowering of Chrysanthemum grown by different culture methods transplanted into field(Cuttings in automatic culture chamber(left), Conventional rooted cuttings(right)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 국화 무병묘의 대량생산을 위한 자동화배양 시스템의 확립

국화에서 품질이 일정한 기내묘를 대량생산하기 위해 배양기간을 단축시키고 생산비를 절감 할 수 있는 자동화 배양 시스템을 확립하고자 본 연구를 수행하였다. 이를 위해 먼저 국화의 무병주 생산체계를 확립하고자 성장점배양에 적합한 배지조건 및 배양방법을 확립하였으며 항바이러스제를 병행한 성장점 배양방법을 개발함으로써 CVB에 대한 100% 무병묘를 생산하는데 성공하였다. 또한, 기내에서 생산된 무병주의 바이러스 검정체계를 확립하고자 포장에서 바이러스에 감염된 것으로 판단되는 묘를 이용하여 국내에서 국화에 감염된 것으로 보고된 바이러스 5종에 대한 이병율을 조사하였으며 이를 바탕으로 기내묘의 바이러스 검정에 활용코자 한다.

한편, 성장점 배양을 통해 일차적으로 얻어진 기내 무병묘를 이용하여 자동화 배양기 내에서 증식재료의 재 확보 및 플러그 삽목묘의 연속적인 대량생산에 필요한 환경조건을 최적화하였다. 아울러 산업화용 자동화배양기를 이용, 자동화양기용 플러그의 크기 및 상토의 조성, 수분공급 시간, 주야온도조건, 광도 등의 생육환경을 최적화하였다.

본 연구의 결과는 단지 국화묘의 대량생산에 뿐 아니라 국화 이외의 다양한 원예작물의 기내 증식에 적용하여 증식에 걸리는 기간을 단축하고 노동력을 절감하면서 일시에 다량의 식물체를 증식시킬 수 있는 새로운 배양 시스템의 기초를 마련했다고 할 수 있다. 즉, single shoot 또는 multiple shoot의 기내 증식을 통해 묘 생산을 하는 감자, 고구마, 거베라, 칼라, 팔레높시스, 사과, 포도 등의 조직배양에 다양하게 적용시킬 수 있을 것으로 기대된다.

특히, 원예장물 생산에 있어 가장 중요한 위치를 차지하는 우량묘(transplant)의 안정적인 공급을 위해서는 생산비의 절감이 절실하다. 현재의 조직배양 시스템으로는 묘의 대량생산에 소요되는 생산단가가 너무 높기 때문에 조직배양묘를 이용하여 기외에서 삽수를 채취하는 방식을 취하고 있다. 그러나 지속적인 기외 삽수의 채취는 묘의 소질을 저하시키고 필요로 하는 시기에 원하는 만큼의 묘를 생산할 수 없다는 단점이 있다. 이 때문에 네덜란드를 비롯한 국외의 여러 연구소에서는 생산비를 절감하면서 안정적인 묘의 생산을 위해 많은 연구를 하고 있다. 따라서 본 연구 결과는 향후 원예작물 묘의 대량생산 시스템의 확립에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 기대된다.

2. 고품질의 국화 transplant 생산

식물 조직배양에 의한 기내 급속 증식에 못지않게 기내에서 생산된 묘를 이용하여 일정한 규격을 갖춘 공정묘(transplant)로 생산하기 위해서는 순화기간의 단축과 함께 순화율을 높이고 이후의 묘 생산을 균일하게 관리하는 것이 무엇보다 중요하다. 이를 위해 본 연구에서는 자동화배양기에서 생산된 국화 shoot를 단일마디로 잘라 삽수의 부위별로 순화율과 성장 속도를 비교하였다. 기존의 순화 및 묘 생산 방법에서는 순화율과 성장 속도가 상부, 중부, 하부, 등 삽수의 부위에 따라 순화율과 성장속도에 현저한 차이가 있어 일시에 고품질의 묘를 대량생산하는 것이 매우 어려웠다. 또한 순화기간이 길고 순화까지의 묘 관리가 까다롭고 많은 노동력을 요했기 때문에 transplant의 생산단가를 높이는 주된 요인이었다.

이러한 문제점을 해결하기 위해 묘 생산에 자동화배양 시스템을 적용하여 적정 이식 시기, 광도(PPF), CO₂ 등 지상부 환경과 상토 내 관시기 등의 지하부 환경 실험을 통해 자동화배양 시스템을 확립하였다. 그 결과, 삽수의 생존률은 삽수 부위에 관계없이 100%이었고 묘 성장에 걸리는 기간을 크게 단축하였으며 묘 소질이 균일한 transplant를 일시에 대량 생산할 수 있었다. 이 방법의 가장 큰 장점은 기존의 방법에 비해 지하부의 적정 환경조절이 용이하기 때문에 고품질의 국화묘를 단기간에 대량생산할 수 있다는 것이다. 이렇게 생산된 국화 transplant를 기존의 삽수를 이용하여 생산된 묘와 함께 양액재배에 이용하여 절화 품질을 비교하였는데 초장, 경경, 꽃의 크기 등에서 기존의 묘에 비해 같거나 비교적 높은 품질을 나타내었다. 이로써 자동화배양 시스템을 통해 생산된 묘를 기존의 생산 방법과 동일하게 실제 재배에 적용할 수 있음을 알 수 있었다.

자동화배양기의 적용으로 기존의 기내 생산묘를 순화, 성장시키는데 드는 시간과 노동력을 1/2로 감소시키면서도 고품질의 원예작물 transplant를 대량 생산할 수 있게 되었다고 생각한다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

자동화배양기를 이용한 국화 shoot의 대량증식 시스템은 국화 뿐 만아니라 묘의 안정적인 공급을 필요로 하는 주요 원예작물의 공정묘 생산에 유용하게 활용할 수 있고 특히, 관엽식물, 팔레놉시스, 거베라, 탈라, 사과, 포도 등의 원예작물의 경우, 농민이나 묘 공급업자들이 필요로 하는 만큼의 균일한 소질의 묘를 적절한 시기에 공급할 수 있어 묘 생산의 산업화가 가능할 것으로 기대된다.

현재 조직배양의 국제적 추세는 배양환경 개선 및 scale up생산 시스템 과 자동화를 통한 공정묘(transplant)생산으로 바뀌고 있다. 이런 점에서 국내에서는 생물반응기를 이용한 scale up 생산에 관한 보고외에 자동화 생산 시스템에 관한 묘의 고품질 및 대량생산에 관한 연구는 전무한 실정이다. 본 연구 결과를 기존의 국화 삽수 생산 방법(기외 이식 후 동일한 식물체에서 지속적으로 삽수를 생산)을 대처하는 새로운 묘 생산에 적용한다면 생산기간, 노동력을 줄이고 항상 일정한 소질의 고품질묘를 생산자에게 필요한 시기에 공급할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 자동화배양기를 이용한 생산 시스템은 국화묘의 생산뿐만 아니라 single shoot 또는 multiple shoot를 증식에 이용하는 다양한 원예작물(거베라, 칼라, 팔레놉시스, 감자, 사과 등)의 증식에 다양하게 활용할 수 있기 때문에 현재 가장 문제시되고 있는 공정묘 생산체계를 새롭게 확립할 수 있다고 판단된다. 따라서 본 연구를 통하여 개발된 플러그 삽목묘의 실용화는 첫째, 국화 우량종묘의 주년 안정생산 공급 모델로 활용이 가능할 것이며 자동화와 관련된 기술은 특허출원이 가능할 것이고, 둘째, 저렴한 가격의 국화 우량 종묘가 국내 재배작형에 따라 수요자 주문방식의 생산공급이 가능하게 됨으로써 생산성 및 품질면에서 국제 경쟁력을 제고시킬 수 있을 것이며. 셋째, 조직배양묘의 조기 활착기술 및 자동화 배양기내에서의 급속 대량증식 생산기술개발 연구는 공장형 공정육묘 생산 시스템의 실용화를 위한 기초자료로 유용하게 활용되어질 수 있을 것이다.

그러나 본 연구기간이 너무 짧아 관행삽목묘와 자동화배양묘간 다양한 환경요인들 즉, 저온처리 유무, 성장조절제의 사용 등에 대한 보다 구체적인 요인들에 대한 실험들을 수행할 수 없었으므로 금후 이에 대한 보완 연구를 수행하여 자동화배양묘 산업화에 필요한 재배 기술을 구명할 필요가 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

기내 식물체의 생장 및 광합성에 영향을 미치는 중요한 지상부 환경요인으로 광, CO₂ 농도, 온도, 상대습도 및 산소 등을 들 수 있으며 지하부 환경요인인 배양배지로서는 당 농도, 이온성분 농도 및 삼투포텐셜과 pH 등이 중요한 요인으로 작용 한다 (Nguyen 등, 1998). 기내 미세 환경조절은 식물 생장과 발달을 촉진시키며 생물체의 형태적, 생리학적 변이 발생률을 낮추고 보다 빠른 증식률과 순화 단계에서 식물 생장을 돕는다. Courmac 등(1992)은 광도(photosynthetic photon flux: PPF)가 식물체 특히, 신초 생장 시 의 광합성에 미치는 중요한 요인 중의 하나라고 하였으며 감자의 광독립 영양배양 시 CO₂가 시비되는 조건에서의 높은 PPF는 식물체의 생장 및 광합성 능력을 촉진시킨다고 하였다. Kozal 등(1997)은 온도가 감자의 줄기와 초장에 미치는 영향에 대하여 연구하였으며, 온도 조절은 식물체의 초장을 결정하는 중요한 요인이며 미세 번식의 중요한 기술이라고 하였다.

그러나 아직도 조직배양을 이용한 증식방법은 산업화하기에는 많은 문제가 있는데, 오염으로 인한 식물체 손실, 순화단계에서의 낮은 생존율, 높은 농도의 생장조절제의 사용으로 인한 변이발생, 높은 인건비, 높은 가격의 기본 재료와 기구(당, 한천, 배양병 등) 등이 산업적 생산에 문제가 되고 있다(Kozai, 1989). 기내에서 식물체 대량증식 유도하기 위해서 생장조절제를 첨가하게 되는데, 가장 일반적으로 사용되는 생장 조절제로는 cytokinin과 auxin이며 배양 질편체의 형태형성은 이들 두 조절제의 비율에 의해서 결정된다. 그러나 이들 두 조절제의 과도한 사용은 투명화를 발생시키는데, 독일가문비 조직배양 시 배지 내 BA 첨가는 투명화 비율을 증가시키나 한천의 농도를 증가시키면 BA 흡수가 방해되어 투명화율이 감소되고(Von Arnold와 Eriksson, 1984), 멜론의 경우 cytokinin은 투명화를 유도하나 cytokinin 농도를 감소시킴으로써 투명화를 방지할 수 있다(Leshem et al., 1988). Cytokinin의 종류에 따라 투명화 발생에 미치는 영향은 상이한데 침엽수, 카네이션, 안개초 등에서는 kinetin보다 BA처리에서 투명화 발생률이 높으며(Dencso, 1987), 독일가문비와 사과에서도 BA처리에서 투명화 발생률이 높으며(Dencso, 1987), 독일가문비와 사과에서도 BA가 고농도로 첨가되면 투명화도가 많이 발생된다(Bornman과 Vogelmann, 1984). 한편, Gaspar(1987) 등은 auxin이 에틸렌 발생과 연관되어 투명화묘를 발생시킨다고 보고하였다.

이와 같이 일반적인 조직배양은 낮은 CO₂ 농도, 낮은 광합성 유효 광양자속

(Photosynthetic photon flux, PPF), 높은 상대습도, 배지 내의 높은 당함량, 낮은 공기의 유동 등에 의하여 식물체가 정상적인 광합성률을 유지하기 어려운 환경조건이기 때문에 기외순화율이 낮다(Riek, 1995; Murali와 Duncan, 1995; Van Huylenbroeck 등, 2000). 이러한 불리한 환경 조건에서 성장한 조직배양 식물체의 잎은 많은 경우 잎의 두께가 얇고, 엽록소 a/b의 비율이 낮으며 유리 단백질 함량이 낮은 음지성 식물의 잎이 가지고 있는 특징을 나타내는데, 이는 배양기간 동안 낮은 광도 때문인 것으로 생각된다.(Chaves, 1994; Riek, 1995). 음지에서 성장한 잎은 일반적으로 호흡률과 광보상점이 양지에서 성장한 잎보다 낮기 때문에 낮은 광도에서도 독립양양적인 성장을 유지한다. 따라서 갑작스러운 높은 광을 조사하면 이들 음지에서 성장한 잎은 광스트레스 때문에 광억제작용(Photoinhibition)을 받는다(Van Huylenbroeck, 1994; Van Huylenbroeck 등, 2000) 또한 명기 동안 식물체의 광합성에 의한 배양병 내 CO₂ 농도 감소나 낮은 PPF와 환기 불량으로 인해 광독립영양 배양에 의해 생산된 식물체에 비해 성장률이 낮으며 투명화 현상이 다발하는 것으로 알려져 있다.(Kozai 등, 1990b; Kozai와 Sekimoto, 1988; Shim 등, 2001a). 일반적으로 환기가 불량한 광혼합영양 배양 조건 하에서 자란 식물체는 잎의 표피 왁스층이 감소하거나, 기공의 형태와 개폐 기능이 불량하다(Blanke와 Belcher, 1989; Donnelly 등, 1987; Han 등, 1992; Shim 등, 2001b; short 등, 1987). 그러나 Kozai (1997) 등은 배지에 탄소원을 첨가하지 않는 광독립영양 배양 방법에 의해 기내 식물체를 생산할 경우, 배지에 당을 첨가하는 광혼합영양 배양에 비해 기내 식물체의 성장 및 광합성이 촉진되며 기내 식물체의 생리적, 형태적 이상과 투명화현상이 감소되고 상대적으로 생장이 균일한 건전묘를 생산할 수 있다고 보고하였다, 이러한 광독립영양 배양 방법으로 기내 식물체의 성장을 촉진하고 순화율을 높이며 생산단가를 낮출 수 있다는 연구결과가 많이 보고되고 있는데, 심비디움(Kozai 등, 1987), 카네이션(Kozai와 Iwanami, 1988), 감자(Kozai 등, 1988) 등을 이용하여 높은 PPF 하에서 CO₂를 사용하고 배지 내에 당을 첨가하지 않고 배양하였을 때 당을 첨가 해준 혼합영양과 같은 성장 결과를 얻어 독립영양 배양의 기능성을 보고하였고, 환기 횟수를 높여주었을 때 환기 횟수가 낮은 경우보다 광독립영양배양 및 광혼합영양배양 이 좋은 성장을 보여주었으며, 당을 첨가하지 않은 독립영양배양은 당이 첨가된 혼합 영양과 비교하였을 때 성장에 큰 차이를 나타내지 않았다고 하였다(Kozai 등, 1990a). Laforge 등(1991)은 딸기와 아스파라거스를 대상으로 기내 및 기외 순화 시 생

장에 미치는 영향에 대한 실험에서 높은 PPF와 고농도의 CO₂에서 좋은 생장을 보였으며, 건전한 기공이 관찰되었고 외피의 구조나 epicuticular Wax의 함량을 증가시킬 수 있었는데, 이러한 결과로 기외 순화 시 생존율이 증가하였고, 순화 기간을 약 2주 단축할 수 있었다고 하였다. Jeong등(1995)은 배양실 내 CO₂ 시용, 배지 내 당의 제거 및 PPF를 높이거나 배양병의 환기횟수를 증가시키는 등의 광독립영양 배양 방법에 의해 기내배양 식물체의 생장 및 광합성 속도를 증가시키는 동시에, 배양 식물체 생산에 필요한 생산비를 절감할 수 있다고 시사하였다.

최근, 일본 지바에서 열린 'Transplant production in the 21st century' 심포지에서는 많은 연구자들이 배양용기의 대형화와 기내배양의 환경을 개선함으로써 기내 식물체의 생장을 기외 식물과 유사한 방향으로 유도하는 것이 최종적으로 기외 생산효율을 증가시킨다는 결과를 보고하였다. 또한, 광도, 광원, 공기의 유동에 따른 습도, 온도의 변화 등에 따른 환경제어를 통해 대규모의 transplant production system 확립으로 고품질의 묘를 대량 생산하는 식물공장을 소개하기도 하였다.

제 7 장 참고문헌

- Affreen-Zobayed F., S.M.A. Sobayed, C. Kobota, T. Rozcii and O. Husegawa. 2000. A combination of vermiculite and paper pulp supporting material for the photoautotrophic micropropagation of sweet potato. *Plant Science*. 157:225-231.
- Affreen, F., S.M.A. Zobayed and Y. Kozai. 2002. Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: development of a bioreactor for large-scale plantlet conversion from cotyledonary embryos. *Annals of Botany*. 90:21-29.
- Ahmed, H.A. and M. Andrea. 1987. Effect of heat treatment on the acceleration of chrysanthemums multiplication by meristem-tip culture. *Acta Horti*. 212:99-106.
- Aitken-Christie, J., H.E. Davies, C. Kubota and K. Fujiwara. 1992. Effect of nutrient media composition on sugar-free growth and chlorophyll fluorescence of *Pinus madiata* shoots in vitro. *Acta Horti*. 319:125-131.
- Albouy, J., C. Flouzat, C. Kusiak, and M. Tronchet. 1988. Eradication of orchid viruses by chemotherapy and in vitro cultures of *Cymbidium*. *Acta Horticulturae* 234:413-420.
- Aminuddin, B. and P. Singh. 1985. *Petunia hybrida* horticulture explant culture: effect of virazole 6 and certain dyestuffs on *Petunia* mosaic virus elimination. *Indian Phytopath.* 38:692-694.
- Annadana, S., W. Rademaker, M. Ramanna, M. Udayakumar and J. de Jong. 2000. Response of stem explants to screening and explant source as basis for methodical advancing of regeneration protocols of chrysanthemum. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 62:47-55.
- Aribaud, M., C. Klevers, J. Martin-Tanguy and T. Gaspar. 1999. Low activity of amine-oxidases and accumulation of conjugated polyamines in disfavor of organogenic programs in *Chrysanthemum* leaf disc explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55:85-94.
- Balukiewicz, A. and S. Kryczynski. 2001. Attempts to eliminate tomato spotted wilt virus from chrysanthemum plants by meristem tip culture. *Phytopath. Polonica*. 21:101-108.
- Barba, M., E. Ragozzino and L. Navarro. 2003. Viroid elimination by thermotherapy and Tissue Culture. In: *Viroids*. A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semanick (eds.). Science Publishers Inc. pp. 318-323.
- Bhattacharya, P., Dey, S., Das, N. and Bhattacharyya, B.C.1990. Rapid mass propagation of *Chrysanthemum morifolium* by callus derived from stem and leaf explants. *Plant Cell Reports* 9: 439-442.

- Biahoua, A. and Bonneau. 1999. Control of in vitro somatic embryogenesis of the spindle tree (*Evenymus europaeus* L.) by the sugar type and the osmotic potential of the culture medium. *Plant Cell Reports*. 19:185-190.
- Blom-Barnhoorn, G.J. and van Aartrijk, J. 1985. The regeneration of plants free of LSV and TBV from infected liliun bulb-scale explants in the presence of Virazole. *Acta Horticulturae* 164:163-168.
- Borthakur, M., K. Dutta, S.C. Nath and R.S. Singh. 2000. Micropropagation of *Eclipta alba* and *Eupatorium adenophorum* using a single-step node cutting technique. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 62:239-242.
- Brainerd, K.E., L.H. Fochigami, S. Kwiatkowski and C.S. Clarck. 1981. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured 'Pixy'plum grown under different environments. *HortScience*. 16:173-175.
- Burger, B.W., T.K. Hartz, G.W. Forister. 1997. Composted green wastes as a container medium amendment for the production of ornamental plants. *HortScience*. 32(1): 57-60.
- Bush, S.R., E.D. Earle, and R.W. Langhans. 1976. Plantlets from petal segments, petal epidermis, and shoot tips of the periclinal chimera, *Chrysanthemum morifolium* 'Indianapolis'. *Amer. J. Bot.* 63 (6): 729-737.
- Capellades M., R. Lemeur and P. Debergh. 1990. Kinetics of chlorophyll fluorescence in micropropagated shootlets. *Photosynthetica*. 24:190-193.
- Capellades M., R. Lemeur and P. Debergh. 1991. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 25:21-26.
- Carpentien, R. 1997. Influence of High light Intensity on Photosynthesis: Photoinhibition and Energy Dissipation. In: *Handbook of Photosynthesis*. M. Dessaraki (ed). Marcel Dekker Inc. pp. 443-450.
- Chiari, A. and M.P. Bridgen. 2002. Meristem culture and virus eradication in *Alstroemeria*. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*. 68:49-55.
- Choi, J., K.S. Ryu and B.J. Kim. 2002. *Method of Soil Analysis*. Youngnam University Press. pp. 18-27 and 41-45.
- Davies, P. J. 1987. The Plant Horemones: Their Nature, Occurrence, and Functions. In *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*. P. J. Davies (ed.). Martinus Nijhoff Publishers. pp. 1-11.

De Facio, G., J. Caner and M. Vicente. 1980. Effect of Virazole (Ribavirin) on tomato spotted wilt virus in two systemic hosts, tomato and tobacco. *Archives of Virology* 63(3-4):305-309.

De Fazio, G., J. Caner and M. Vicente. 1978. Inhibitory effect of Virazole (Ribavirin) on the replication of tomato white necrosis virus (VNBT). *Archives of Virology* 58(2):153-156.

De Jong, J., and B.M. Custers. 1986. Induced changes in growth and flowering of chrysanthemum after irradiation and in vitro culture of pedicels and petal epidermis. *Euphytica* 35:137-148.

De, Y., Y. Desjardins, M. Lamarre and A. Gosselin. 1992. Photosynthesis and transpiration of in vitro cultured asparagus plantlets. *Sci. Hortic.* 49:9-16.

Desjardins, Y., C. Hdides and J. Reik. 1995. Carbon nutrition in vitro—regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems. In: *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. J. Aitken-Christie, T. Kozai and M. Lila Smith (eds.). Kluwer Academic Publishers. pp. 441-471.

Dewir, Y.H., D. Chakrabarty, M.B. Ali, E.J. Hahn and K.Y. Paek. 2005. effects of hydroponic solution EC, substrates, PPF and nutrient scheduling on growth and photosynthetic competence during acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* plantlets. *Plant Growth Regulation*. 46:241-251.

Dolgov, S.V., T.Yu. Mitiokina and K.G. Skryabin. 1997. Agrobacterial transformation of Chrysanthemum. *Acta Hort* 447:329-334.

Donnelly, P.J., R. Gella and M. Herrero. 1998. Stomata structure and functioning as a response to environmental changes in acclimatized *Prunus ceratus* L. *Ann. Bot.* 62:663-670.

Earle, E.D. and R.W. Langhans. 1974a. Propagation of *Chrysanthemum in Vtiro*: I. Multiple plantlets from shoot tips and the establishment of tissue cultures. *Journal of American Society for Horticultural Science* 99(2):128-132.

Earle, E.D. and R.W. Langhans. 1974b. Propagation of *Chrysanthemum in Vtiro*: II. Production, growth, and flowering of plantlets from tissue cultures. *Journal of American Society for Horticultural Science* 99(4):352-358.

Facio, G., J. Caner and M. Vicente. 1978. Inhibitory effect of Virazole (Ribavirin) on the replication of tomato white necrosis virus (VNBT). *Archives of Virology* 58(2)

153-156.

Falque, M., D. Compan and R. Galzy. 1991. A method for the study of CO₂ exchange in in vitro cultured *Vitis rupestris* plantlets. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*. 27:175-181.

Fosket, D. E. 1994. Light, Hormones, and Cell Signalling Pathways. In *Plant Growth and Development: A Molecular Approach*. Academic Press. pp.271-340.

Fujii, Y. and Shimizu, K. 1990. Regeneration of plants from achenes and petals of *Chrysanthemum coccineum*. *Plant Cell Reports* 8: 625-627.

Fujiwara, K., T. Kozai and I. Watanabe. 1987. Measurements of carbon dioxide gas concentration in closed vessels containing tissue cultured plantlets and estimate of net photosynthetic rates of the plantlets. *J. Agr. Meteorol.* 43:21-30.

Garcia J.L., J. Troncoso, R. Sarmiento and A. Troncoso. 2002. Influence of carbon source and concentration on the in vitro development of olive zygotic embryos and explants raised from them. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*. 69:95-100.

Greno, V., M. Cambra, L. Navarro, N. Duran-Vila. 1990. Effect of antiviral chemicals on the development of virus content of citrus buds cultured in vitro. *Scientia Horticulturae* 45(1-2):75-87.

Guerin, V., F. Lemaine, O. Marfa, R. Caceres and F. Giuffrida. 2001. Growth of *Viburnum tinus* in peat-based and peat-substitute growing media. *Scientia Horticulturae*. 89:129-142.

Gul, A., D. Erogul and A.R. Ongun. 2005. Comparison of the use of zeolite and perlite as substrate for crisp-head lettuce. *Scientia Horticulturae*. 106:464-471.

Gupta, P.P. 1986. Eradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*. 6(1):33-39.

Gupta, P.P. 1986. Eradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture* 6(1):33-39.

Hansen, A.J. and W.D. Lane. 1985. Elimination of apple chlorotic leafspot virus from apple shoot cultures by ribavirin. *Plant Disease* 69:134.

Hdider, C. and Y. Desjardins. 1994. Effects of sucrose on photosynthesis and photofenol pyruvate carboxylase activity of in vitro cultured strawberry plantlets. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture* 36(1):27-33.

Hill, M.F., R.J. Giles, J.R. Moran, and G. Hepworth. 1996. The incidence of Chrysanthemum stunt viroid, Chrysanthemum B carlavirus, Tomato aspermy cucumovirus and Tomato spotted wilt tospovirus in Australian chrysanthemum crops. *Australian Plant Pathology* 25, 174-178.

Himstedt, J.P. and H.J. Jacobsen. 2001. Shoot regeneration from stem and leaf explants of Chrysanthemum (*Dendranthema x grandiflora*). *Acta Hort* 560:421-424.

Hitmi, A., C. Barthomeuf and H. Sallanon. 1999. Rapid mass propagation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* by callus culture and ability to synthesize pyrethrins. *Plant Cell Reports* 19:156-160.

HoracKova, V. 1998. Potato virus eradication by chemotherapy in vitro using ribavirin. *Rostl. Vyroba.* 44:539-544.

Horst, R.K. and Cohen, D. 1980. Amantadine supplemented tissue culture medium: A method for obtaining chrysanthemums free of Chrysanthemum stunt viroid. *Acta Horticulturae* 110:315-320.

Horst, R.K., R.W. Langhans and S.H. Smith. 1977. Effect of Chrysanthemum stunt, chlorotic mottle, aspermy and mosaic on flowering and rooting of chrysanthemums. *Phytopathology* 67:9-14.

Hosokawa, M., A. Otake, K. Ohishi, E. Veda, T. Hayashi and S. Yazawa. 2004. Elimination of chrysanthemum stunt viroid from an infected chrysanthemum cultivar by shoot regeneration from a leaf primordium-free shoot apical meristem clone attached to a root tip. *Plant Cell Reports.* 22(11):859-863.

Hosokawa, M., E. Ueda, K. Ohishi, A. Otake and S. Yasawa. 2004. Chrysanthemum stunt viroids disturbs the photoperiodic response for flowering of chrysanthemum plants. *Planta* 220:64-70.

Jyung, C., R. Kwan, S. Kim, and B. Jin. 2002. *Method of Soil Analysis.* Youngnam University Press. pp. 18-27, 41-45.

Kane, M.E. 1996. Micropropagation of potato by node culture and microtubers production. In: R. Trigiano and D. Gray (ed). *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercise.* CRC Press. pp. 81-86.

Kaul, V., Miller, R.M., Hutchinson, J.F. and Richards, D. 1990. Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1: 21-30.

Kim, S.J., E.J. Hahn and K.Y. Paek. 2000. Mass propagation of chrysanthemum plantlets using bioreactors. *Korean Journal Horti. Sci. & Tech.* 18(5).

Kozai T., K. Fujiwara, M. Hayashi and J. Aitken-Christie. 1992. The in vitro environment and its control in micropropagation. In: Transplant Production Systems. K. Kurata and T. Kozai (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 247-282.

Kozai, T. 1991. Micropropagation under Photoautotrophic Conditions. In: Micropropagation. P.C. Debergh and R.H. Zimmerman (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 447-469.

Kozai, T. and Y. Iwarami. 1988. Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plant growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. J. Japan Soc. Hort. Sci. 57:279-288.

Kozai, T., K. Watanabe and B.R. Jeong. 1995. Stem elongation and growth of *Solanum tuberosum* L. in vitro response to photosynthetic photon flux, photoperiod and difference in photoperiod and dark period temperatures. Scientia Horticulturae. 64:1-9.

Kozai, T., Y. Koyama and I. Watanabe. 1988. Multiplication of potato plantlets in vitro with sugar-free medium under high photosynthetic photon flux. Acta. Hortic. 230:121-127.

Langford P.J. and H. Wainwright. 1987. Effects of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots in vitro. Ann. Bot. 60:633-640.

Latado, R.R., A.H. Adames and A.T. Neto. 2004. *In vitro* mutation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) with ethylmethanesulphonate (EMS) in immature floral pedicels. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 77:103-106.

Lee, R.P., Y. Wetzstein and H.E. Sommer. 1985. Effect of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultra structure in tissue-cultured plantlets and seedling of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. Plant Physiol. 78:637-641.

이정명. 2000. 공정묘의 생장조절기술. 생산환경조절학회지. 8(1):113-134.
PJB. 1994. The seed treatment market. PJB Publications, Ltd.

Leonhardt W., C.H. Wawrosch, A. Aver and B. Kopp. 1998. Monitoring of virus diseases in Austrian grapevine varieties and virus elimination using in vitro thermotherapy. Plant, Cell, Tissue and Organ Culture. 52:71-74.

Lian, M.L., H.N. Murthy and K.Y. Paek. 2002. Culture method and photosynthetic photon flux effect photosynthesis, growth and survival of *Limonium* 'Misty Blue' in vitro. Scientia Horticulturae. 95:239-249.

Lowe, J.M., Davey, M.R., Power, J.B. and Blundy, K.S. 1993. A study of some factors affecting *Agrobacterium* transformation and plant regeneration of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 171-180.

Lu, C.-Y., Nugent, G. and Wardley, T. 1990. Efficient, direct plant regeneration from stem segments of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. Cv. Royal Purple). *Plant Cell Reports* 8: 733-736.

Maloupa, E., I. Mitsios, P.F. Martines and S. Bladeroporlou. 1992. Study of substrate use in gerbera soilless culture grown in plastic greenhouses. *Acta Hort.* 323:139-144.

Mandal, A.K.A., D. Chakrabarty and S.K. Data. 2000. Application of in vitro techniques in mutation breeding of chrysanthemum. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60:33-38.

Marganaris, G.A., A.S. Economov, I.N. Boubourakas and N.I. Katis. 2003. Elimination of PPV and PNRSV through thermotherapy and meristem tip culture in nectarine. *Plant Cell Reports.* 22(3): 195-200.

May, R.A. and Trigiano, R.N. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*. *Journal of American Society for Horticultural Science* 116: 366-371.

McGraw, B.A. and L.R. Burch. 1995. Cytokinin Biosynthesis and Metabolism in Plant Hormones. P.J. Davies (ed). Kluwer Academic Publishers. pp. 98-117.

Menhenett, R. 1982. Interactions of daminozide, 2,2-dipyridyl, and gibberellins A3, A9 and A320 in stem extension in *Chrysanthemum morifolium* Ramat: an indication that daminozide may not inhibit the responses to GA9 or GA20by blocking gibberellin hydroxylation. *Plant Growth Regulation* 1(1):31-36.

Miyashita, Y., Y. Kitaya, C. Kobota and T. Kozai. 1996. Photoautotrophic growth of potato plantlets as affected by explant leaf area, fresh weight and stem length. *Scientia Horticulturae.* 65:199-202.

Moore, T.C. 1989. *Biochemistry and Physiology of Plant hormones.* 2nd ed. Springer-Verlag. pp. 28-93, 158-189.

Moron J.R. 1987. Chrysanthemum B carlavirus. In: *Viruses of Plants: Description and Lists from the VIDE Database.* A. Brunt, K. Crabtree, M. Dallwitz, A. Gibbs and L. Watson (eds.). CAB International 1996. pp. 398-400.

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

bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

Nelson, P.V. 1991. *Greenhouse Operation and Management*. 4th ed. Prentice Hall N.J. pp. 171-208.

Neto, V.B.P. and W.C. Otoni. 2003. Carbon sources and thin osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? *Sci. Hort.* 97:193-202.

Nowa, B., K. Miczynski and L. Hudy. 2004. Sugar-uptake and utilization during adventitious bud differentiation on in vitro leaf explants of 'Wegierka Zuykla' plum (*Prunus domestica*). *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*. 76:255-260.

OEPP/EPPO. 2002. Diagnostic protocols for regulated pests: Chrysanthemum stunt pospiviroid. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 32, 245-253.

OEPP/EPPO. 2004. Recommendations made by EPPO Council in 2003. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 32, 105-144.

Paludan, N. 1985. Inactivation of viroids in chrysanthemum by low-temperature treatment and meristem-tip culture. *Acta Horticulturae* 164:181-186.

Petersen, K.K., J. Hansen and P. Krogstrup. 1999. Significance of different carbon sources and sterilization methods on callus induction and plant regeneration of *Miscanthus x ogiformis* Honda 'Giganteus'. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, 58:187-189.

Robert, V., Z. Jara and M. Ravnikar. 1998. Thermotherapy in virus elimination from garlic: influences on shoot multiplication from meristems and bulb formation in vitro. *Scientia Horticulturae*. 73:193-202.

Romano, A., C. Noronha and M.A. Martins-Lovcao. 1995. Role of carbohydrates in micropropagation of cork oak. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*. 40(2):159-167.

Ross-Karstens, G.S., G. Ebert and P. Ludders. 1998. Influence of in vitro growth conditions on stomatal density, index and aperture of grape, coffee and banana plantlets. *Plant Tissue Cult. Biotechnol.* 4:21-27.

Samartzidis, C., T. Awarda, E. Maloupa, K. Radoglou and H.I.A. Constantinidou. 2005. Rose productivity and physiological responses to different substrates for soilless culture. *Scientia Horticulturae*. 106:203-212.

Schuster, G. 1988. Synthetic antiphytoviral substances. In: *Applied Virology Research*. E. Kurstak, R.G. Marusyk, F.A. Murphy and M.H.V. Van Regenmortel (eds.). New vaccine and chemotherapy. Plenum Press. New York. pp.265-284.

Sha Valli Khan, P.S., T. Kozai, Q.T. Nguyen, C. Kobota and V. Dhawan. 2002. growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 71:141-146.

Shepard, J.F. 1977. Regeneration of plants from protoplasts of potato virus X-infected tobacco leaves II. Influence of Virazole on the frequency of infection. *Virology* 78(1):261-266.

Silber, A., G. Xu, I. Levkoutch, S. Soriano, A. Bilu, and R. Wallach. 2003. High fertilization frequency: the effects on uptake of nutrition, water and plant growth. *Plant and Soil*. 253:467-477.

Slesak, H., A. Skoczowski and L. przywara. 2004. Exogenous carbohydrate utilization by explants of *Brassica napus* cultured in vitro. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*. 79:45-51.

Stace-Smith, R. 1990. Tissue Culture. In: *Plant Viruses Volume II Pathology*. C.L. Mandahar (ed.) CRC Press Inc. pp.69-134.

Staikidou, I., S. Watson, B.M.R. Harvey and C. Selby. 2005. Narcisus bulblets formation in vitro: effects of carbohydrate type and osmolarity of the culture medium.

Styer, R.C. and D.S. Koranski. 1997. *Plug and Transplant Production. A Grower's Guide* Ball Publishing, Illinois, USA. pp. 107-128.

Toussaint, A., J. Kummert, C. Maroquin, A. Lebrun and R. Roggemans. 1993. Use of Virazole to eradicate ondontoglossum ringspot virus from in vitro cultures of *Cymbidium Sw*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32(3):303-309.

Trigiano, R.N. and R.A. May. 1996. Direct shoot organogenesis from leaf explants of chrysanthemum. In: *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. R.N. Trigiano and D. J. Gray (eds.) CRC Press Inc. pp. 105-112.

Vcelar, B.M., D.I. Ferreira and J.G. Niederwieser. 1992. Elimination of ornithogalum mosaic virus in the *Ornithogalum* cv. Rogel through meristem tip culture and chemotherapy. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*. 29(1): 51-55.

Verma N., R. Ram and A.A. Zaidi. 2005. In vitro production of Prunus necrotic ringspot virus free begonias through chemo- and thermotherapy. *Scientia Horticulturae*. 103:239-247.

Verma, N., A. Sharma, R. Ram, V. Hallan, A.A. Zaidi and I.D. Gerg. 2003. Detection, identification and incidence of Chrysanthemum B carlavirus in

chrysanthemum in India. *Crop Protection* 22:425-429.

Weiland, C.M., M. Cantos, A. Troncoso, F. Perez-Camacho. 2004. Regeneration of virus-free plants by in vitro chemotherapy of GFLV (Gravevine fanleaf virus) infected explants of *Vitis vinifera* L. cv. 'Zalema'. *Acta Horticulturae*. 652:463-466.

Yap, M.L., L.T. Lam Chan, C.P. Yik, J. Kueh, S.M.Lee and H.M. Loh. 1999. Eradication of viruses from commercial orchids. *Singapore J. Prim. Indus.* 27: 11-19.

www.flowers.org.uk/flowers/trivia/toptenflowers-sales-02.htm

www.hort.vt.edu/faculty/McDaniel/hort2164/R8Flower_FoliageSources.htm