

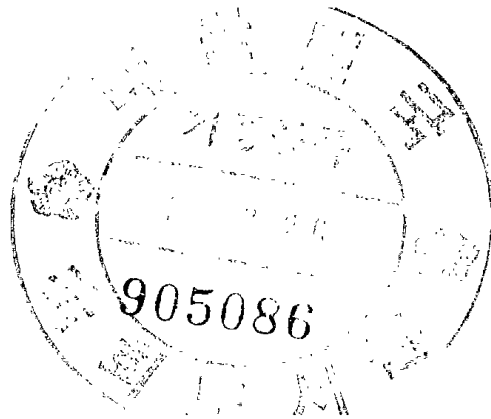
최 중
연구보고서

**원예작물 조직배양묘의 생육 모델링을 통한
기내 최적 환경제어시스템 개발**

Development of Optimum Environment Control System
for Micropropagation of Horticultural Crops
using Growth Modelling

서울대학교

농림부



최 종 보 고 서

1998년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 원예작물 조직배양묘의 생육모델링을 통한 기내 최적 환경제어시스템 개발에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

- 첨부 : 1. 최종보고서 10부
2. 최종보고서 디스켓 1매

2001 년 11월 30일

주관연구기관 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 손정익 (인)

주관연구기관장 : 서울대학교 총장

농 립 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “원예작물 조직배양묘의 생육모델링을 통한 기내 최적 환경제어시스템 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001 년 11 월 30 일

주관연구기관명 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 손정익

연 구 원 : 이 훈

연 구 원 : 장 일

연 구 원 : 김창수

세부과제책임자 : 이병일

연 구 원 : 김진아

연 구 원 : 윤혜진

연 구 원 : 이수영

여 백

요 약 문

I. 제 목

원예작물 조직배양묘의 생육모델링을 통한 기내 최적 환경제어시스템 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

국내 농업이 WTO체제로 돌입하면서 농업생산성의 향상과 국제적인 경쟁력을 제고하는 것이 선결과제로 떠올랐고, 최근에는 생산의 자동화와 첨단화, 과학화를 목표로 많은 연구가 진행되고 있다. 그 중에 조직배양학적인 기법을 이용한 바이러스 무균묘의 생산과 생물반응기를 통한 묘의 대량급속 증식 체계의 확립 및 건전묘의 공장자동화 육묘 등도 중요한 연구과제 중의 하나이다.

기술적 측면에서는, 현재 진행되고 있는 조직배양학을 이용한 원예작물의 대량, 자동 생산 시스템의 연구들은 원예작물에 대한 단편적인 정성적 자료의 수집에 편중되어 있고, 조직배양묘의 생육환경과 생육상태에 관한 정량적인 자료가 부재하여 대량생산체계를 갖추기에는 미흡한 점이 많다. 또한 이로 인하여 수치적인 생육상태에 관한 모델링이 불가능하다. 만약 정량적인 자료의 축적에 의하여 생육 모델링이 가능하게 된다면, 그러한 모델을 이용하여 조직배양묘의 생산 자동화에 큰 도움이 될 것이다.

경제·산업적 측면에서, 조직배양을 이용한 묘의 대량 급속증식은 짧은 시간에 많은 성과물을 최소의 노동력으로 얻을 수 있으므로 연구대상이 되어 왔다. 특히 영양 번식 작물과 유전적인 안정성을 요구하는 작물, 그리고 번식에 노동력이 많이 요구되는 작물에 집중적인 연구가 되어 왔으나, 정량화에 의한 최적조건 구명과 묘의 양적, 질적 생산의 극대화를 기하기는 어려운 점이 많아 효율적인 생산체계의 구축이 어려웠다. 만약 정량적인 모델링이 가능하고 최적 환경제어 시스템이 개발된다면 원예작물의 종묘생산이 있어 양적, 질적 극대화를 이루어 경제적인 성과를 거둘 수 있을 것이다.

사회·문화적 측면에서, 최근의 농업은 단순한 식량증산 산업이 아니라 환경을 보존하고 인간과 친화되는 공간으로서의 기능이 강조되어 식물생장호르몬제 등과 같은

화학제제의 사용을 엄격히 규제하여 인간이 거주하는 공간과 작물을 신선환경으로 유지시키는 것을 중요시하고 있다. 그러한 의미에서 조직배양묘의 대량생산에 있어 환경요인을 최적으로 유지하는 기술과 방법은 생장호르몬제와 같은 화학물질의 과다 사용을 억제하여 환경오염 요인을 최소화하면서 그 생산능률을 극대화시킬 수 있을 것이다.

그러나, 대부분의 연구가 단편적인 환경요인, 곧 공기, 습도, 산소, 탄산가스, 온도, 광 (광질, 광도, 광주기)과 개개의 작물에 대한 단편적, 정성적인 자료의 제공에 그치고 있으며 조직배양묘의 생육과 환경요인과의 정량화가 이루어지지 않아, 생육상태에 대한 예측과 환경요인을 적용하여 적극적으로 기내배양묘의 분화와 생육을 제어하여 건전하고 균일한 우량 묘를 얻는 데 많은 어려움이 있다.

건전묘 생산을 균일하고 안정적으로 유지하기 위해서는 환경의 조절이 가능한 시스템의 개발이 필요하며, 구체적이고 효율적인 방법이 필요하다. 조직배양묘의 기내 환경과 생육과의 정량화를 통한 최적환경의 구명과 기내 환경제어시스템의 적용은 건전한 묘 생산을 가능하게 할 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

원예작물에서 감자와 미나리를 선정하여 조직배양묘의 기내생육과 정량화를 통한 최적 환경구명 및 기내 최적 환경제어시스템 개발을 위하여 다음과 같은 연구를 수행하였다. 감자 조직배양묘의 최적 생산환경 구명 및 환경제어시스템 개발과 미나리 체세포배의 최적 생산환경 구명 및 대량생산체계 확립에 초점을 두었다.

감자 조직배양묘의 최적 생산환경 구명 및 환경제어시스템 개발 연구는, 조직배양묘의 정량화 가능한 요인 분석 및 생육의 정량화 작업, 환경제어기술 개발, 최적생육 조건 구명 및 기내 환경제어시스템 개발로 구성되어 있다.

세부적으로 조직배양묘의 정량화 가능한 요인 분석 및 생육의 정량화 연구는, 기존 문헌에 의한 환경요인 분석, 재분화와 성장에 관련된 환경요인 분석, 조직배양묘의 생육의 정량화, 조직배양묘의 생육 환경 분석으로 구성되어 있다. 조직배양묘의 환경제어기술 연구는, 기내 환경제어 시스템 구축, 조직배양시스템내의 환경 및 생육 정보 계측, 환경 및 생육 정보를 이용한 조직배양묘의 생육 모델링으로 구성되어 있다. 조직배양묘의 최적생육조건 구명 및 환경제어시스템 적용은, 대량생산을 위한 최적환경조건 구명 및 환경제어시스템 적용성 평가 등으로 구성되어 있다.

미나리 체세포배의 최적 생산환경 구명 및 대량생산체계 확립 연구는, 조직배양묘의 정량화 가능한 요인 분석, 액체배지에서의 체세포배 증식, 체세포배 대량생산 체계 확립으로 구성되어 있다. 세부적으로 정량화 가능한 요인 연구는, 기존의 연구 결과를 분석하였다. 액체배지에서의 세포의 증식조건 연구는, 미나리 cell의 증식에 관여하는 조건 구명, 미나리 배발생 세포증식에 유리한 배지공급과 환기조건, 생물반응기를 이용한 세포의 증식방법으로 구성되어 있다. 체세포배 대량생산 체계 연구는, 안정된 체세포배 발생을 위한 배발생능력, 생산량, 동조화 연구, 체세포배 대량생산을 위한 방법 및 처리 조건 연구, 체세포배 생산에 영향을 주는 기내 미세 환경 연구 및 생물반응기를 이용한 체세포배 대량생산체계 연구로 구성되어 있다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 감자의 생육 환경요인 분석

감자 shoot 증식은 aeration이나 CO₂ 농도보다는 광에 영향을 더 많이 받았다. 초장은 광도나 환기 여부와 관계없이 큰 차이를 보이지 않았으나 환기가 되는 경우, 광도가 증가함에 따라 마디수가 크게 증가하였고, 줄기의 굵기도 증가하였다. 초장은 당 농도 1%에서 가장 좋았으나 마디수에는 차이가 없었다. 당 농도가 증가함에 따라 줄기가 굵어지고 지하부가 발달하였다. 수미는 당농도 1.5%에서 마디수와 마디 굵기가 다른 처리구보다 뚜렷하게 우수하였다. 광조건 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 와 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 인 chamber에서 자란 감자 줄기가 가장 생장이 잘 되고 상태가 좋았다. 같은 광조건이라도 환기여부와 당농도에 따라 달랐는데 기존에 많이 사용하던 당농도 3%에서 보다는 1.5%에서 더 잘 자랐고, 특히 당농도 1.5%의 경우 환기의 효과가 컸다. 감자 줄기를 배양하는 데는 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 강광에 자연 환기를 시키거나 1500ppm의 CO₂를 사용하며 배지의 당농도를 1.5%로 하는 것이 마디수도 많고 초장이 길며 굵기도 적당하다. 초장이나 마디수는 두 처리 모두 25일 전후에 가장 많이 증가하였다. Shoot는 약 25일-30일 정도 증식시킨 후에 괴경 형성의 재료로 쓰거나 shoot 증식용 배지에 계대하는 것이 경제적이다.

나. 기내 환경제어 조직배양시스템 구축

조직배양용 환경제어시스템은 총 4개의 챔버(확장 가능)로 구성되며, 각 챔버는 다른 광주기와 광강도를 적용할 수 있다. 실제 배양 부위 광도는 최대 $320 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPFd가 구현 가능하다. 본 시스템은 컴퓨터에 의하여 제어되며, CO₂, 광주기, 온도 등의 제어가 가능하다. CO₂는 비례제어를 사용하여 각 배양 챔버 별로 독립적으로 실시된다. 온도는 최적 생육 온도를 상수로 정해 컨테이너의 히트펌프로 유지하도록 하였고, 광주기에 따른 온도 변화를 관찰하였다. 설정온도는 24℃이며, 오전 6시부터 명기, 오후 10시 이후는 암기로 하였다.

온도는 중앙 부분이 높은 특성을 보이고 있으며, 약광($60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)과 강광($120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 조건, 고체 배지와 액체 배지 조건, 알루미늄 호일과 필터 처리된 알루미늄 호일 등의 조건에 따라 용기내의 배지온도와 기상 온도를 분석하였다. 광강도가 높아짐에 따라 배양 용기 내의 온도는 배지보다 온도의 진폭이 크고, 신속하게 외부의 변화에 반응을 하였다. 고체 배지가 액체배지에 비하여 온도 변화가 외부 온도의 변화에 민감하여 반응의 진폭과 시간이 짧았다.

알루미늄 호일과 필터 처리된 호일을 사용하였을 때의 내부 온도 변화는, 환기횟수가 높아지더라도 온도의 변화는 크지 않았다. 필터별 환기 특성의 경우 Millwrap, SUN cap, CPP, OPP, 알루미늄 호일 순으로 우수하였다. 유량이 증가할수록 내부 풍속이 증가하는 경향을 나타냈고, 유량이 $4\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 에서는 약 $0.2\text{--}1.0\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, $8\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 에서는 $0.5\text{--}2.5\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, $15\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 에서는 $1.0\text{--}4.0\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 분포를 나타냈다.

다. 조직배양 시스템 내의 환경 요인 분석 및 생육 정량화 연구

광조건에 따른 온도차이는 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 PPFd 외에는 거의 유사한 값을 보여주었다. 암기와 명기 모두 습도 80-90%를 유지되었다. 다양한 CO₂ 설정치에서 시정수 27분 정도의 반응을 나타냈다. 최대 $120 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ CO₂ 가량의 오차를 보여주었으며, PPFd 분포는 최대 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 가량의 오차로 균일한 제어가 가능하였다.

자가영양조건의 생육 정량화를 위하여 생육단계를 약 7일 간격으로 3단계로 구분하였다. 제1단계에서는 광 및 이산화탄소 농도 조건에 대해서 생육상태에 유의적인 차이가 없었다. 장해엽 발생을 고려할 때, $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 PPFd와 $350 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 의 CO₂ 조건이 적합하였다. 제2단계에서는 마디수, 초장 및 신초 직경이 광량에 따라 유의적인 차이가 없었으나, 생체중과 건물중은 다소 향상되는 경향을 나타내었다. 에너

지 효율을 고려할 때, $160 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD 처리 이상의 광조건은 불필요하였다. 제 3단계에서는 CO_2 와 PPFD 처리에 따라 유의적인 차이로 생육이 향상되었고, 특히 광량의 영향이 컸다. $240 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 혹은 그 이상의 PPFD 및 $1800 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 의 CO_2 가 적정 조건이라고 판단되었다. 소질이 우수한 소식물체를 생육 초기에는 낮은 환경 조건, 생육 후기에는 집약적인 환경 조건으로 단계별 환경 조절을 통하여 효율적으로 에너지를 투입할 수 있다.

라. 조직배양묘의 기내 최적 환경 구명 및 대량 생산 체계 확립

자가영양조건 생육 모델링을 위하여 제2단계 및 제3단계에 대해서 환경조건에 대한 건물중 변화에 모델링 및 시뮬레이션을 실시하였다. Negative exponential 형태의 함수를 이용하였으며, 정량화 데이터를 근거로 생육 모델을 구축하였다. 제2단계에서는 CO_2 및 PPFD의 향상이 건물중 향상에 영향을 미치며 광량의 경우 $160 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 가량에서 포화됨을, CO_2 는 $1800 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 의 CO_2 처리에서는 광포화점이 다소 상향되며 건물중이 약간 향상되었다. 본 단계에서는 $160 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 PPFD와 $700 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 의 CO_2 처리가 적합하였다. 제3단계에서는 CO_2 수준이 향상됨에 따라 광량 증가에 의한 건물중 향상폭이 매우 크게 나타났다. 본 단계에서는 $320 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 PPFD와 $1800 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 의 CO_2 처리가 적합하였다.

환경 조절 기법이 생육에 미치는 효과로는 마디수, 전개엽수, 신초장, 신초직경 모두 단계별 환경제어 처리구에서 유의적으로 향상된 결과를 보여주었다. 각 환경 조절 처리별 소요된 전기에너지 및 CO_2 양을 근거로 건물중 생산량을 분석하였을 때, 단계별 적정 환경조절 처리구에서 가장 낮은 수치를 보였다. 단계별 적정 환경 조절 처리구는 마디수의 경우, CO_2 및 PPFD의 적산량이 동일한 처리에 비해 높은 발달을 보여주었다. 환경조절 처리별 건물중은 기내 생육의 경우 약 5.4배, 22일 째 기외생육의 경우 6.1배 정도로 기내 환경처리가 기외 생육에도 상당히 큰 영향을 미친 것을 확인하였다. 기내 생육 단계별 환경조절이 기외 이식 후 신속히 적응하여 왕성한 생육을 유지하고 고품질의 괴경을 생산하는데 적합한 체계임을 알 수 있었다.

마. 미나리 배발생 세포의 증식 조건 확립

액체배지에서 배발생 세포를 증식시키는 데는 MS 배지에 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 2,4-D를 넣는 것이 증식률도 높고 세포의 상태도 좋았다. 미나리 세포의 증식은 35일이 주기로서

처음 8일까지는 증식이 되지 않다가, 이후부터 35일까지 급속히 성장하고 다시 생장이 거의 멈추었다. 환기를 시켜서 배양한 세포의 배발생능이 밀폐시켜 배양한 세포보다 더 좋았다. 접종 후 약 2주간 증식된 세포의 양을 비교해 보면 생물반응기에서 증식시킬 때 삼각플라스크를 이용하는 것보다 2배 이상 더 증식되었다.

바. 체세포배 대량 생산체계 확립

액체배양을 시작한 후 10일-27일 사이의 세포의 배발생능이 가장 좋았다. 체세포배는 배발생 배양을 시작한 지 40일 정도의 기간이 경과되면 가장 많은 배를 수확할 수 있다. 체세포배 발달을 동조화시키기 위해 homogenizer로 마쇄한 결과, 11,000 rpm에서 60초간 마쇄한 것과 16,000 rpm에서 10초간 마쇄한 것이 가장 좋았다. 접종밀도는 $600 \text{ mg} \cdot 200 \text{ mL}^{-1}$ 에서 체세포배 생산량이 많았다. 배양 3주까지는 플라스틱 뚜껑으로 밀폐시킨 bottle에서 가장 많은 체세포배를 얻었다. 배양 4주째 이후에는 poly-urethane sponge 마개에서 배의 생장이 가장 왕성하였다. 체세포배 발생은 배양 전 기간인 4주 동안 밀폐시켜 배양한 경우 발생된 배의 수는 많았지만 성숙이 느렸고 배발생이 동조화 되지 않았다. 그러나, 배양 2주째에 환기가 가능한 재료로 sealing 할 경우 배의 수는 다소 적었지만 균일하고 성숙한 배가 많았다. 미나리 체세포배 발생은 60 이나 $90 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 저광조건이 유리하였다. 배양이 끝난 체세포배를 기외에서 발아시킨 실험에서 polyurethane에서 생산된 소식물체의 뿌리가 배지에 공기를 주입하면서 glass bottle에서 생산된 것 보다 길어도 길고 신선증과 건물증도 높았다. 배발생 2주째의 세포를 생물반응기에 접종하면 체세포배를 생산할 수는 있으나 삼각플라스크나 rolling bottle과 달리 배발생 비율이 적었다. 배발생 단계 중 생물반응기에 넣는 시기를 적절하게 설정한다면 체세포배를 대량으로 생산하여 수경 재배 베드에 바로 옮겨 심을 수 있는 형태로 수확할 수 있을 것이다.

IV. 활용에 대한 건의

현재 진행되고 있는 조직배양 기법을 이용한 원예작물의 대량, 자동 생산 체계에 대한 연구들은 원예작물에 대한 단편적인 정성적 자료의 수집에 편중되어 있고, 조직배양묘의 생육환경과 생육상태에 관한 정량적인 자료가 부재하여 대량 생산체제를 갖추기에는 미흡한 점이 많다. 만약 정량적인 자료의 축적에 의한 환경제어체계가 가능하게 된다면 조직배양묘의 생산 자동화에 큰 도움이 될 것이다.

본 연구과제를 통하여 얻은 결과는, 학술적으로 환경 및 생육 정보를 이용한 조직배양묘의 생산체계, 환경요인의 계측과 제어가 가능한 조직배양시스템의 구축 및 조직배양 환경조건 구명을 통한 환경조절 연구에 중요한 기초자료로 제공될 수 있다.

또한 정량화에 의한 조직배양묘의 체계적인 생산, 조직배양묘의 대량생산 체계에 적용, 기존의 조직배양의 대량증식 순환시스템에의 이용 등에 활용될 수 있을 것이다.

SUMMARY

1. Analysis of growth environment of potato plantlet

The growth of potato shoot was mainly affected by light intensity rather than aeration or CO₂ concentration. For instance, shoot length was not so much affected by light intensity and aeration, but number of nodes and shoot diameter highly increased with light intensity at high aeration rate. Shoot was longest at 1.5% sucrose but there was no difference in number of nodes. As the sucrose level increased, shoot became thicker and root developed well. Superior produced remarkable number of nodes and thick shoot at 1.5% sucrose. At 120 and 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPFs, potato shoot showed a favorite growth condition. In spite of same light level, the growth of shoot was better at 1.5% sucrose than at 3%. Especially the effect of aeration on the growth of shoot was greater at 1.5% sucrose. The growth of shoot and number of nodes were promoted under environment conditions such as 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPF and 1.5% sucrose with aeration, or 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPF and 1.5% sucrose with 1500ppm CO₂. Shoot length and number of nodes increased around 25th day from the beginning of the culture. Potato shoots cultured for 25-30 days were found to be ideal as materials for tuberization and subculture.

2. Construction of environment control system for micropropagation

An environment control system consisted of four chambers (extendable), were developed for micropropagation, and CO₂ concentration, light period, light intensity, and temperature could be independently controlled in each chamber. Proportional control method was used for CO₂ control. Temperature and PPF were maintained at 24°C and 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, respectively. Light period was set from am. 6 to pm. 10. As light intensity increased, the air temperature in the culture vessel became higher and responded more quickly to the fluctuation of air temperature in the chamber than that of the medium did. Especially, the temperature of solid medium more quickly responded to the change of outside temperature than that of

liquid medium did. Both of the vessels capped with aluminium foil and filter-attached foil showed little difference in inside air temperature at high air exchange rate. Air exchange rates in the vessels were higher in the order of Millwrap, SUN cap, CPP, OPP, and aluminium foil. The aeration rate of the chamber influenced the wind velocity around the vessel. Wind velocities showed 0.2-1.0, 0.5-2.5, and 1.0-4.0 $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ at aeration rates of 4, 8, and 15 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, respectively.

3. Analysis of in vitro micro-environment factors and quantification of growth

Temperatures in the culture vessels were constantly controlled at various light conditions except at $80 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPFD. Relative humidity maintained at 80-90% during light and dark periods. The time constant of the system was maintained at 27 min for all CO_2 set points. CO_2 and PPFD were controlled with maximum errors of $120 \mu \text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $50 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, respectively.

The growth of potato was divided into 3 stages, each of which is 7 days long, for modelling of growth at photoautotrophic condition. At growth stage I, there were no significant differences in the growth of potato plantlets at various light and CO_2 conditions. Considering damaged leaves, $80 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPFD and $350 \mu \text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ CO_2 were adequate. At growth stage II, there were a little significant differences in shape, number of nodes, shoot length, and shoot diameter at various light and CO_2 conditions. However, fresh and dry weights tended to increase more or less with increased environment conditions. Considering energy efficiency, more than $160 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPFD was not required. At growth stage III, there were significant differences in the growth of potato plantlets at various light and CO_2 conditions. Especially the effect of light intensity was great. Environment conditions such as $1800 \mu \text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ CO_2 and more than $240 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPFD were adequate. Therefore, environment control with growth stage, maintaining relatively low at 1st stage and positively adapting adequate conditions (relatively high) at 2nd and 3rd stages, can produce healthy plants and save the input energy.

4. Optimum growth environment condition and establishment of practical production system

Growth models described with environment factors were constructed and simulated at 2nd and 3rd stages under photoautotrophic conditions. A negative exponential function was used. At growth stage II, dry weight increased with increases of CO₂ and PPF levels, and saturated at 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPF. At 1800 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ CO₂, saturation point became a little higher, and dry weight increased. At this stage, 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPF and 700 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ CO₂ were found to be adequate. At growth stage III, dry weight considerably increased with increase of CO₂ concentration. At this stage, 320 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPF and 1800 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ CO₂ were adequate.

From the results, environment control techniques with growth stage significantly promoted the numbers of nodes and unfolded leaves, shoot length, and shoot diameter of potato. Analyses of the productivity of dry weight based on consumed electrical energy and CO₂ showed low cost with high production efficiency in environment control with growth stage. The number of nodes in environment control with growth stage was greater than that in the constant control consuming same amounts of CO₂ and PPF. Dry weights in environment control with growth stage were 5.4 times in vitro and 6.1 times ex vitro for 22 days as much as those in the constant control. It confirmed that in vitro environment control system directly affected the ex vitro growth of potato. In this system, rapid adaptation of in vitro plantlets to ambient condition, and induction of vigor growth, and production of high-quality of potato were obtained.

5. Establishment of embryogenic cell growth condition of water dropwort

The growth rate of embryogenic cell were promoted at 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 2,4-D in MS liquid medium. The growth period of cell was found to be 35 days. During the first 8 days, the cell did not grow, but after that, it rapidly grew to 35th days. The ability of embryogenesis was better at aeration condition than

non-aeration condition. The total growth of cell in bioreactor showed 2 times as high as those in flask.

6. Establishment of somatic embryos mass production system

The ability of embryogenesis was the most active from 10th to 27th days after the beginning of liquid culture. A great number of somatic embryos were harvested after 40 days from embryogenesis culture. Homogenization by grinding cultured cells at 11,000 rpm for 60 sec and 16,000 rpm for 10 sec was effective in the synchronization of induced somatic embryos. The optimum density of cell inoculation for somatic embryogenesis was 600 mg/200 mL in 50cm rolling bottle. For first 3 weeks of embryogenesis, somatic embryos were well developed in plastic capping, and after that grew vigorously in poly-urethane sponge capping. Non-aeration condition for 4 weeks of all culture period produced more somatic embryos but less synchronized. However, the use of aerated sealing materials after 20 days of culture enabled to produce somatic embryos more homogenized and matured. Low light condition of 60 or 90 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ increased somatic embryogenesis. In ex vitro germination, somatic embryos cultured in urethane-sponge using bioreactor increased the length, fresh and dry weights of root, compared with those in aerated glass bottle. Somatic embryos inoculated in bioreactor after 2 weeks of embryogenesis could be more or less produced, but the embryogenesis rate in bioreactor decreased rather than in flask or rolling bottle. An adequate inoculation time in bioreactor during embryogenesis stage will be able to make mass production and harvest of somatic embryos, and directly move to hydroponic systems.

Contents

Chapter 1. Introduction.....	23
Chapter 2. Optimum growth environment conditions and environment control system for tissue-cultured plantlet of potato.....	25
Section 1. Introduction.....	25
Section 2. Analysis of environment factors for quantification.....	26
1. Introduction.....	26
2. Materials and methods.....	26
a. Analysis of environment factors based on literature.....	26
b. Shoot growth.....	26
c. Micro-tuber formation.....	30
3. Results and discussion.....	31
a. Analysis of environment factors based on literature.....	31
b. shoot growth.....	33
1) Factors affecting shoot growth.....	33
2) Effect of light intensity on shoot growth.....	33
3) Effect of sucrose concentration on shoot growth.....	33
4) Observation of shoot growth with time.....	34
5) Effects of light intensity, sucrose concentration, and ventilation on shoot growth.....	34
c. Micro-tuber formation.....	47
1) Effect of light period on tuber formation.....	47
2) Effect of liquid media on tuber formation.....	47
3) Effects of culture vessels and culture methods on tuber formation.....	47
Section 3. Construction of environment-controlled micropropagation system.....	51
1. Introduction.....	51

2. Materials and methods.....	51
a. System description.....	51
b. Culture system.....	51
c. Detail specification.....	53
d. Analysis of control characteristic.....	55
3. Results and discussion.....	60
a. Environment control system for micropropagation.....	60
b. Environment control of micropropagation system using computer.....	60
c. Environmental characteristics in micropropagation system.....	61
1) CO ₂ control.....	61
2) Light condition.....	62
3) Change of temperature.....	63
4) Ventilation rate.....	66
Section 4. Analysis of in-vitro environment factors and quantification of growth.....	73
1. Introduction.....	73
2. Materials and methods.....	73
a. Environmental measurement in micropropagation system.....	73
b. Quantification of growth with environment factors.....	74
c. Growth modelling using environment and growth information.....	76
3. Results and discussion.....	76
a. Environmental measurement in micropropagation system.....	76
1) Temperature and relative humidity.....	76
2) Carbon dioxide and PPF.....	77
b. Quantification of growth with environment factors.....	79
1) Growth stage I.....	79
2) Growth stage II.....	81
3) Growth stage III.....	85
c. Growth modelling using environment and growth information.....	91
1) Mixotrophic condition.....	91

2) Autotrophic condition.....	93
a) Growth stage II.....	93
b) Growth stage III.....	94
Section 5. Optimum growth environment condition and adaptability of environment control system.....	97
1. Introduction.....	97
2. Materials and methods.....	97
3. Results and discussion.....	99
a. In vitro growth.....	99
b. Ex vitro growth.....	101
 Chapter 3. Establishment of optimum growth environment production system of embryo of water dropwort.....	104
Section 1. Introduction.....	104
Section 2. Analysis of environment factors for quantification.....	105
1. Introduction.....	105
2. Materials and methods.....	105
a. Analysis of environment factors based on literature.....	105
3. Results and discussion.....	105
Section 3. Embryogenic cell growth in liquid medium.....	106
1. Introduction.....	106
2. Materials and methods.....	106
3. Results and discussion.....	107
a. Effect of 2,4-D concentration.....	107
b. Embryogenic cell growth.....	108
c. Effects of medium supplement aeration methods on embryogenic cell growth.....	108
d. Embryogenic cell growth using bioreactor.....	108
Section 4. Establishment of somatic mass production system.....	111
1. Introduction.....	111

2. Materials and methods.....	111
a. Somatic embryogenesis.....	111
b. Mass production of somatic embryos.....	112
c. Effect of in vitro micro-environments on somatic embryogenesis.....	113
3. Results and discussion.....	114
a. Somatic embryogenesis.....	114
1) Embryogenesis ability of cell produced in liquid medium.....	114
2) Change in number of somatic embryos with time.....	114
3) Synchronization of somatic embryogenesis.....	115
4) Change in pH during embryogenesis.....	115
b. Mass production of somatic embryos.....	118
1) Mass production methods.....	118
2) Effect of inoculum density of cell on embryogenesis.....	118
3) Effect of aeration on embryogenesis.....	118
c. Effect of in vitro micro-environment on somatic embryogenesis.....	121
1) Light intensity.....	121
2) Sealing material with different aeration rate.....	121
3) Aeration rate.....	121
4) Effect of areation rate on embryogenesis.....	121
d. Mass production system using bioreactor.....	125
 Chapter 4. Conclusions.....	 127
 References.....	 133

목 차

제 1 장 서론.....	23
제 2 장 감자 조직배양묘의 최적 생산환경 구명 및 환경제어시스템 개발....	25
제 1 절 서론.....	25
제 2 절 정량화 가능 환경요인 분석.....	26
1. 서언.....	26
2. 재료 및 방법.....	26
가. 문헌에 의한 환경분석.....	26
나. Shoot의 증식조건.....	26
다. 소괴경의 형성조건.....	30
3. 결과 및 고찰.....	31
가. 문헌에 의한 환경분석.....	31
나. Shoot의 증식조건.....	33
1) Shoot 증식에 미치는 영향을 미치는 요인.....	33
2) Shoot 생장에 미치는 광량의 효과.....	33
3) Shoot 생장에 미치는 sucrose 농도의 효과.....	33
4) Shoot 생장의 경시적 관찰.....	34
5) Shoot 생장에 미치는 광, sucrose농도 및 환기의 영향.....	34
다. 소괴경의 형성조건.....	47
1) 명배양기간에 따른 괴경형성.....	47
2) 액체배지의 배양에 따른 괴경 형성.....	47
3) 용기 및 배양종류에 따른 괴경 형성.....	47
제 3 절 기내 환경제어시스템 구축.....	51
1. 서언.....	51
2. 재료 및 방법.....	51
가. 시스템 구성.....	51

나. 배양장치 개요.....	51
다. 부분별 상세 설계.....	53
라. 시스템 특성 분석.....	55
3. 결과 및 고찰.....	60
가. 조직배양용 환경제어시스템 구성.....	60
나. 컴퓨터에 의한 조직배양시스템의 환경제어.....	60
다. 조직배양시스템내의 환경특성.....	61
1) 이산화탄소 제어.....	61
2) 광환경 제어.....	62
3) 온도변화 분석.....	63
4) 환기특성 해석.....	66
제 4 절 조직배양 시스템 내의 환경 요인 분석 및 생육 정량화 연구.....	73
1. 서언.....	73
2. 재료 및 방법.....	73
가. 조직배양시스템의 환경 계측.....	73
나. 환경요인별 생육정량화.....	74
다. 환경과 생육정보를 이용한 조직배양묘의 생육모델링.....	76
3. 결과 및 고찰.....	76
가. 조직배양시스템의 환경계측.....	76
1) 온도 및 습도.....	76
2) 이산화탄소 및 PPF.....	77
나. 환경요인별 생육정량화.....	79
1) 생육단계 I.....	79
2) 생육단계 II.....	81
3) 생육단계 III.....	85
다. 환경과 생육정보를 이용한 조직배양묘의 생육모델링.....	91
1) 혼합영양조건 생육모델링.....	91
2) 자가영양조건 생육모델링.....	93
가) 생육단계 II.....	93
나) 생육단계 III.....	94

제 5 절 조직배양묘의 기내 최적 환경 구명 및 환경제어시스템의 적용성.....	97
1. 서언.....	97
2. 재료 및 방법.....	97
3. 결과 및 고찰.....	99
1) 기내 생육.....	99
2) 기외 생육.....	101
제3장 미나리 체세포배의 최적 생산환경 구명 및 대량생산체계 확립.....	104
제1절 서론.....	104
제2절 정량화 환경요인 분석.....	105
1. 서언.....	105
2. 재료 및 방법.....	105
가. 문헌에 의한 환경요인 분석.....	105
3. 결과 및 고찰.....	105
제3절 액체배지에서의 세포의 증식조건.....	106
1. 서언.....	106
2. 재료 및 방법.....	106
3. 결과 및 고찰.....	107
가. 액체배지에서 체세포증식에 미치는 2,4-D의 효과.....	107
나. 미나리 세포의 증식.....	108
다. 미나리 배발생 세포증식에 유리한 배지공급 조건과 환기조건.....	108
라. 생물반응기를 이용한 세포의 증식.....	108
제4절 체세포배 대량생산 체계 확립.....	111
1. 서언.....	111
2. 재료 및 방법.....	111
가. 체세포배 발생.....	111
나. 체세포배 대량생산.....	112
다. 체세포배 생산에 영향을 주는 기내 미세환경.....	113
라. 생물반응기를 이용한 대량 생산.....	114
3. 결과 및 고찰.....	114

가. 체세포배 발생.....	114
1) 액체배지에서 증식된 세포의 배발생 능력.....	114
2) 체세포배 생산의 경시적 관찰.....	114
3) 체세포배 동조화.....	115
4) Embryogenesis동안 발생하는 pH의 변화.....	115
나. 체세포배 대량생산.....	118
1) 체세포 대량생산 방법.....	118
2) 세포 접종밀도에 따른 배발생.....	118
3) aeration에 따른 배발생.....	118
다. 체세포배 생산에 영향을 주는 기내 미세환경.....	121
1) 체세포배 생산에 미치는 광도의 영향.....	121
2) Sealing 재질의 환기율.....	121
3) 체세포배 발생에 미치는 환기의 영향.....	121
4) 체세포배의 기외발아에 미치는 환기의 영향.....	121
라. 생물반응기를 이용한 대량 생산.....	125
제4장 결론.....	127
참고문헌.....	133

여 백

제 1 장 서론

조직배양 기법을 통하여 건전한 묘를 대량으로 빠른 시일 내에 최소의 노동력을 사용하여 고부가가치를 가지도록 생산하고자 하는 노력은 국내외를 막론하고 상당히 오래 전부터 시도되어 왔고 많은 성과를 얻어낸 연구과제 중의 하나이다. 생물반응기를 이용한 인공 씨감자의 생산은 가장 대표적인 연구 중의 하나이며, 서양란의 경우 조직배양를 통해 생산된 바이러스 무균묘의 대량 육묘, 순화, 생산은 상업화되어 농가에 보급된 지가 이미 오래되었다.

최근에는 이러한 기초적인 작물에 대한 연구성과를 바탕으로 영양번식작물에서 종구의 생산 기간을 단축하고, 대량으로 건전한 종구를 얻기 위해서 나리, 아이리스 등의 구근 화훼작물과 마늘과 같은 구근 채소작물에서 그 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한, 유전공학의 발달과 더불어 양산된 많은 종류의 형질전환 식물체를 대량으로 안정적으로 생산하기 위하여 조직배양을 통해 재분화율을 향상시키고 순화율을 높이고자 하는 연구도 많이 진행되고 있다. 미나리와 같이 종자 공급 및 발아율이 불안정한 작물에 대하여 체세포배를 이용한 대량 육묘생산 연구도 진행중에 있다. 또한 기내 환경조절을 통해 작물의 재분화율과 순화율이 현저히 증가한다는 것이 담배나 토마토, 난과 같은 작물에서 밝혀지고 있다.

조직배양 및 이의 대량 생산 시스템에 관한 연구 들은 개개의 원예작물의 생육 환경과 생육 상태에 대한 정성적 자료에 근거하며, 정량적 방법은 사용하지 않고 있다. 이제까지의 연구는 단편적인 환경요인, 곧 공기, 습도, 산소, 탄산가스, 온도, 광(광질, 광도, 광주기)과 개개의 작물에 대한 단편적인 정성적인 자료의 제시에만 그쳐서 조직배양묘의 생육과 환경요인에 관한 정량화가 필요한 건전묘의 생산공정 확립에 적용되지 못하였다. 국외에서는 모델링이 간편한 감자에서 몇가지 환경요인을 변수로 하여 정량화를 통한 모델링을 시도한 예가 있었으나 기내 배양묘의 분화와 생육을 제어하여 우량하고 건전하고 균일한 묘를 얻는 데 많은 어려움이 있다.

최근 광독립 영양성 체계가 진행되고 있으며, 배지의 고형물질, 배양 방식 등 관행의 조직배양과 다른 생산 체계를 병합하여 생산 효율을 극대화 하는 것에 대한 연구도 많이 진행되고 있다. 결국, 최근 연구의 목적은 노지재배와 동일한 수준의 광독립 영양생장 체계를 확립하는 것에 있으며, 필요한 경우 조직배양 중 일부단계를 과감히

생략하여 대량 미세 증식 체계로서의 조직배양을 재정립함에 있다.

조직배양 식물체를 대량생산하는데 있어서 중요한 것은 식물 생육의 동조화이다. 특히 체세포배 발생의 동조화에 관한 연구가 많이 수행되고 있다. 식물 생장이 동조화되면 배양기간을 예측할 수 있어 배양에 드는 비용이나 시간의 낭비를 줄이면서 식물을 계획적으로 생산할 수 있다. 또한 기내에서 성장한 식물체는 기외 환경에 노출되기 전에 순화를 시켜야하는데 이 단계에서 많은 노력이 필요로 되며 실제로 효율이 낮아 큰 효과를 보기 어려웠다. 이에 기내 배양 동안 광과 CO₂를 높이고 당을 낮추는 기존의 방법을 좀 더 구체적으로 하여 식물 생육단계를 고려하면서 시기적으로 다른 환경을 주어 그 효과를 크게 하려는 연구가 진행 중이다.

건전묘생산을 자동화하고, 균일하고 안정적으로 유지하기 위해서는 환경 조절이 가능한 시스템의 개발이 필요하고 모델링에 의한 자료의 축적이 필요하다. 현재의 대부분의 연구는 정성적인 자료의 축적에 초점이 맞추어져 있었으므로 이를 개선하여 좀 더 구체적이고 효율적인 방법의 강구가 필요하다.

제2장 감자 조직배양묘의 최적 생산환경 구명 및 환경제어시스템 개발

제1절 서론

관행의 미세증식 체계가 지닌 단점인 타가 영양화, 부실한 배양묘 발달등을 극복할 수 있는 수단으로서 광독립 영양성 체계가 연구되어 왔다. 최근 들어서는 효율적인 생산체계 확립 등에 관한 연구도 많이 진행되고 있다.

관행의 미세증식 기법보다 우수한 묘의 생산을 위해서는 기내 환경조절이 필요하며, 기내 환경과 생육간 관계를 정량화할 필요가 있다. 이를 위해서 정량화 환경요인 제어가 가능한 조직배양시스템의 환경제어체계 및 환경제어시스템이 필요하며, 이러한 시스템의 환경조절 특성의 분석이 필요하다.

기본적으로 기내에서 소괴경을 생산하기 위해서는 건전한 줄기를 기내에서 무균적으로 생산하고 이것을 괴경 형성 배지에 넣어 괴경 형성을 유도하여야 한다. 따라서 보다 효율적인 생산을 위해서는 감자 줄기가 기내에서 생육되는 기간 중에 요구되는 배지 및 환경요인과 괴경의 형성에 관한 조건 확립이 필요하다.

효율적인 생육환경 제어를 위해 소식물체의 생육을 예측하고 환경과 생육간 관계를 보다 명확히 밝혀내기 위해 정량화에 근거한 생육모델도 필요하다. 이러한 생육모델링은 생육과 환경요인과의 관계를 통한 최적 생육환경 구명 및 대량생산체계 확립에 적용 할 수 있을 것이다.

본 연구는 생육환경요인 분석, 생육 환경 정량화, 환경 제어 시스템 구축 및 제어 특성, 광독립영양 조건하에서의 생육모델 구축 및 해석, 단계별 적정 환경 조건 확립에 목표를 두었다.

제2절 정량화 가능 환경 요인 분석

1. 서언

기내에서 소괴경을 생산하기 위해서는 우선 건전한 줄기를 기내에서 무균적으로 생산하고 이 줄기를 괴경 형성 배지에 넣어 괴경의 형성을 유도하여야 한다. 현재까지 감자 대량 생산 체계를 확립하려는 시도가 많았는데, 이를 위해서는 감자 줄기가 기내에서 자라는 동안 요구되는 배지 및 환경요인과 괴경이 형성되는 조건에 관한 정립이 필요하다.

2. 재료 및 방법

가. 문헌에 의한 환경 요인 분석

이제까지 수행된 감자 기내 소괴경 생산에 관한 문헌을 조사하여 보았다. 소괴경을 생산하는 방법 별로 소요되는 시간과 생산에 관여하는 환경 및 배지 조건을 조사하여 앞으로 수행하게 되는 실험에서 최적 조건을 찾아 이를 대량화 및 정량화하는 지표로 사용하고자 하였다. 광도, CO₂, sucrose 농도, MS strength, 호르몬, 접종 밀도, 일장 및 생물반응기를 이용한 대량화 등에 관하여 조사하고 공통점과 차이점을 조사하였다.

나. Shoot 증식 조건

1) Shoot 증식에 영향을 미치는 요인

감자 shoot의 증식에 미치는 광, CO₂ 및 sucrose의 효과를 알아 보려고 수행되었다. 처리별로 chamber를 만들어 CO₂ 농도를 조절하였고, 광원을 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 와 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 하여 chamber를 배치하였다. 300mL 삼각플라스크에 배지를 분주하고 여기에 수미를 재료로 single node를 5개씩 치상하였다. 배지는 MS를 기본으로 하고 sucrose를 0, 1.5 및 3%로 처리하여, 삼각플라스크의 마개를 호일로 한 것과 filter를 달아 환기가 되도록 한 것으로 구분하였다. 삼각플라스크는 처리별로 3반복으로 하고 10일 배양 후 각 플라스크에서 3개체씩 꺼내어 초장, 마디수 및 생체중을 조사하였다. Table 1-1은 처리별 조건을 나타낸 것이다.

2) Shoot의 생장에 미치는 광량의 효과

Shoot의 생장에 미치는 광의 효과를 구체적으로 알아보려고 수행되었다. Chamber를 이용하여 CO₂의 농도를 1500mg · L⁻¹으로 하고 광원은 형광등을 사용하여 각각 60, 90, 120, 150 및 180 μmol · m⁻²s⁻¹로 처리하였다. 이 Chamber에 수미를 재료로 single node를 5개씩 치상한 300mL 삼각플라스크를 넣었다. 배지는 MS를 기본으로 하고 sucrose는 1.5%로 처리하였으며, 삼각플라스크의 마개를 호일로 한 것과 filter를 달아 환기가 되도록 한 것으로 구분하였다. 삼각플라스크는 처리별로 2반복으로 하고 30일 배양 후 두 플라스크에서 5개체를 꺼내어 초장, 마디수 및 마디 직경을 측정하였다. 또한 초장을 마디수로 나눈 값을 k로 하여 shoot 생장의 지표로 삼았다. 배양 조건은 25℃, 16시간 일장으로 하였다.

3) Shoot의 생장에 미치는 sucrose 농도의 효과

Shoot의 생장에 미치는 sucrose 농도의 효과를 구체적으로 알아보려고 수행되었다. Chamber에 광원은 형광등을 사용하여 120 μmol · m⁻²s⁻¹로 하고 대지를 재료로 single node를 5개씩 치상한 거버병을 넣었다. 마개는 거버병용 플라스틱으로 하고 처리별로 2반복으로 하여 30일 배양한 후 각각 3개체씩 꺼내어 초장, 마디수 및 마디 직경을 측정하고, k값을 구하였다. 배양조건은 25℃, 16시간 일장으로 하였다.

4) Shoot 생장의 경시적 관찰

Shoot의 생장을 경시적으로 관찰하기 위해 test tube에 눈금을 표시한 종이 테이프를 붙이고 3일 간격으로 초장과 마디수를 측정하였다. MS배지에 sucrose 1.5 및 3%를 넣고 대지를 재료로 single node 2개체씩 치상한 후 7일이 지난 후부터 초장과 마디수를 측정하기 시작하였다. Test tube는 각 처리당 10개씩으로 하여 식물체 수로 보면 각각 20반복이다. 배양은 40일간 하였고 k값을 계산하였다. 배양 조건은 광 120 μmol · m⁻²s⁻¹에 25℃, 16시간 일장으로 하였다.

5) Shoot 생장에 미치는 광, sucrose 농도 및 환기의 영향

Shoot 생장에 미치는 광, sucrose 농도 및 환기의 영향을 종합적으로 살펴보기 위해 수행하였다. 광조건은 60, 90, 120, 150 및 180 μmol · m⁻²s⁻¹로 하였고, sucrose 농도는 1.5와 3%로 하였다. 환기조건은 Sigma SUN cap을 사용하여 1.2회의 환기가 가능한 것과 일반 알루미늄 호일을 사용하여 환기율을 0.3으로 해준 것을 각각

ventilated와 airtight로 간주하였다. 그밖의 배양 조건은 25℃, 16시간 일장으로 하였고, 총 배양기간은 35일이었다. 기본 배지는 MS배지로, test tube를 이용하여 고체 배양하고, 실험은 대지와 수미 두 품종 각각 test tube 하나에 single node 2마디를 치상한 것을 1반복으로 하여 3반복 실험하였다.

Table 2-1. Treatments for growth conditions of potato shoot.

PPF ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	CO ₂ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Sucrose (%)	Filter	Code	Chamber no.
60	500	0	0	1	I
			X	2	
		1.5	0	3	
			X	4	
		3	0	5	
			X	6	
	1500	0	0	7	II
			X	8	
		1.5	0	9	
			X	10	
		3	0	11	
			X	12	
120	500	0	0	13	III
			X	14	
		1.5	0	15	
			X	16	
		3	0	17	
			X	18	
	1500	0	0	19	IV
			X	20	
		1.5	0	21	
			X	22	
		3	0	23	
			X	24	
1800	1800	0	0	25	V
			X	26	
		1.5	0	27	
			X	28	
		3	0	29	
			X	30	

다. 소괴경 형성 조건

소괴경을 생산하는 방법은 문헌마다 매우 다양하였다. 그러나 소괴경의 생산은 우연적이며 괴경의 형성 위치나 정확한 시기 및 초기 접종 마디의 생리에 관한 연구가 충분히 수행되어 있지 않아 이에 대한 정확한 정보를 얻고자 하였다. 감자는 원예연구소에서 분양을 받은 대지와 수미를 재료로 하였다. 배지는 test tube에 MS + sucrose 3% + phytigel $2\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 을 10mL씩 분주하여 single node를 두 개씩 치상하고 30일마다 계대하면서 유지, 증식하였다. 배양 조건은 25°C 16시간 일장을 유지하였고 이를 실험 재료로 사용한 구체적인 방법은 다음과 같다.

1) 명배양기간에 따른 괴경 형성

명배양의 기간과 치상 마디의 위치가 괴경 형성에 주는 영향을 알아보기 위하여 수행되었다. 대지, 수미 두 품종 각각에서 single node를 마디 위치별로 취하였는데 싹의 정아 부분과 아래 한마디 정도를 상위(T), 기부 부분과 여기에 가까운 2-3마디를 하위(B)로 하고 나머지 가운데 그룹을 중간(M)으로 분류하였다. 마디는 각 거부병마다 10개씩 치상하였다. 배양 조건은 25°C, 16시간 일장 하에 0일, 10일 및 20일 동안 배양(명배양)하고 이를 18°C, 암상태로 옮겨 30일간 배양한 후 괴경수 및 평균 괴경중을 조사하였다. 배지는 MS + sucrose 9% + phytigel $2\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 70×140mm 거부병에 40mL씩 분주하였고 배양기간 동안 계대는 하지 않았다. 실험은 3반복으로 하였다.

2) 액체 배지에서의 배양에 따른 괴경 형성

액체 배지에서 shoot를 증식시킬 경우 shoot가 굽어지는 경향이 있는데 배양 기간과 shoot의 굽기와의 관계를 알아보고 이 굽기가 괴경의 형성에 어떤 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 수행되었다. 수미를 재료로 하여 중간부분에서 single node를 취하고 300mL 삼각플라스크를 이용하여 액체 배지에서 명배양한 후 괴경 형성 고체배지로 옮겨 30일간 배양한다. 배지는 액체의 경우 MS + GA $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + vitamin $5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + kinetin $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + sucrose 3%를, 괴경 형성 배지의 경우 MS + sucrose 9% + phytigel $2\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 적용하였다. 배양 조건은 저온과 ekstdf에서 명배양할 경우 괴경 형성이 촉진된다는 문헌을 토대로 20°C 8시간 일장에서 2주, 3주, 4주, 5주 및 6주 배양 후 18°C, 암상태로 옮겨 배양하였다. 마디는 각 용기마다 5개씩 치상하고 액체 배양 동안 2주마다 계대하였으며 괴경 형성 동안에는 70×140mm 거부병을 이용하였

다. 실험은 3반복으로 하였고 괴경수, 괴경중을 조사하였다.

3) 용기 및 배양 종류에 따른 괴경 형성

괴경 형성 동안 사용되는 용기 및 배지 특성이 괴경을 형성하는데 미치는 영향을 알아보려고 수행하였다. 수미를 재료로 하여 중간부분에서 single node를 취하고 25℃ 16시간 일장에서 10일 및 20일 동안 배양한 후 18℃, 암상태로 옮겨 30일간 배양하여 괴경수 및 평균 괴경중을 조사하였다. 용기는 직경 90mm petri-dish, 70×140mm 거버병, 70×70mm 거버병 및 300mL 삼각플라스크(액체 배지)를 이용하여 각 용기마다 single node를 5개씩 치상하였으며 실험은 3반복으로 하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 문헌에 의한 환경 요인 분석

실험 재료로 쓰고 있는 대지와 수미는 원예연구소에서 분양 받은 것이다. 문헌의 자료를 참고로 원예연구소에서 배양하고 있는 방법을 도식화하였다(Table 2-2). Fig. 2-1은 문헌의 자료를 토대로 광 및 CO₂와 감자 shoot 증식과의 관계를 나타낸 것이다.

Table 2-2. Methods of in vitro potato tuber production.

	Shoot growth	Tuberization
Medium	MS + sucrose 3%	MS + sucrose 9%
Temperature	25℃	18℃
Photo period	16h	dark
Vessel	test tube	culture bottle/flask
Inoculum	single node	single node

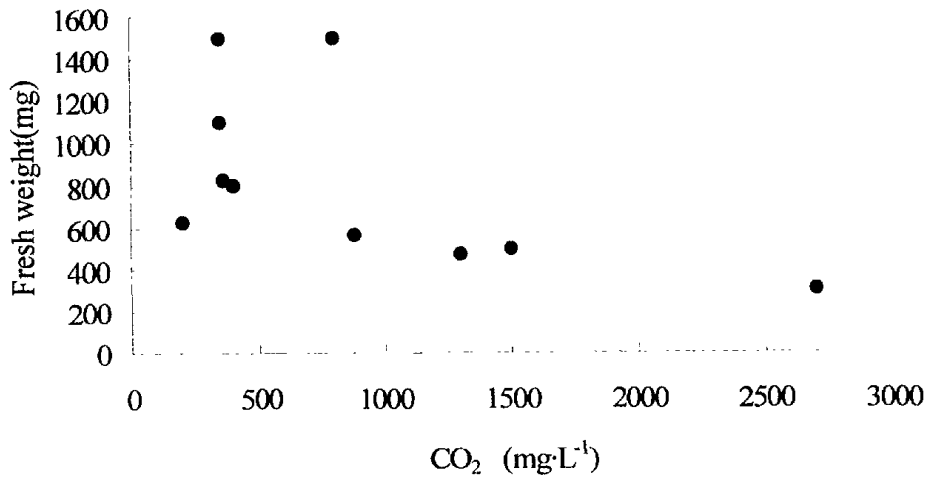
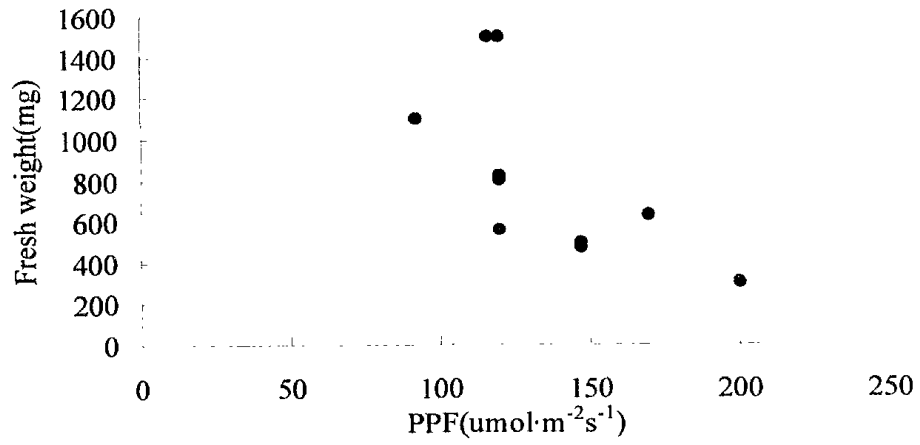


Fig. 2-1. Effects of light intensity(up) and CO₂(down) on fresh weight of potato shoot.

나. Shoot 증식 조건

1) Shoot 증식에 영향을 미치는 요인

광도, CO₂ 및 배지의 sucrose 농도가 감자 shoot의 생장에 미치는 영향을 알아보았다(Table 2-3). 광도가 낮을 경우 초장은 길고 상대적으로 마디의 수는 적었다. 그러나 광도가 높을 경우에는 이와 반대의 현상을 보였다. 특이할 점은 120 μmol · m⁻² · s⁻¹의 강광과 1500mg · L⁻¹의 높은 CO₂ 처리의 경우 배지의 당농도 1.5%에서 마디수가 가장 많았는데 감자의 경우 배양의 시작을 single node로 하였기 때문에 마디수가 많은 것이 바람직하다. 강광과 고농도 CO₂를 연관지어 설명했던 문헌의 내용과는 달리 강광이 주어지면 1.5%이상의 sucrose가 첨가된 배지에서의 shoot 증식은 거의 유의차를 보이지 않았다(Fig. 2-2). 이는 foil이 공기를 완전히 차단하지 않았거나, 배양기간이 짧고 묘가 너무 어려 광합성이 활발하지 않았기 때문으로 생각된다. CO₂ 농도의 효과를 살펴본 결과 감자의 shoot 증식에는 높은 농도의 CO₂를 요구하지는 않는 것으로 나타났다(Fig. 2-3). 감자의 shoot 증식에는 aeration이나 CO₂ 농도보다는 광이 더 많이 영향하는 것 같다. 다른 문헌의 경우 CO₂농도가 높아지면서 낮은 sucrose 농도를 요구하는 것으로 나타났으나 감자의 경우 강광이 조사되면 CO₂ 농도와 무관하게 낮은 농도의 sucrose에서도 잘 자라는 것으로 나타났다(Fig. 2-4, 2-5).

2) Shoot의 생장에 미치는 광량의 효과

광도가 증가함에 따라 환기가 되는 플라스크의 초장은 크게 변화하지 않았다(Fig. 2-6). 마디의 수가 크게 증가하였고, 줄기의 굵기도 증가한 것으로 나타났다. 반면에 환기가 되지 않는 플라스크의 경우, 초장이 환기가 되는 경우보다 전반적으로 길었지만 마디수나 마디의 굵기는 현저히 작아 감자 shoot의 증식에는 120 μmol · m⁻² · s⁻¹의 광에 CO₂ 1500mg · L⁻¹을 사용하는 것이 유리한 것으로 보였다.

3) Shoot의 생장에 미치는 sucrose 농도의 효과

초장은 1% sucrose에서 가장 좋았으나 마디수는 농도별로 차이를 보이지 않았다(Fig. 2-7). 마디의 굵기는 sucrose의 농도가 증가함에 따라 증가하였고, 또한 지하부의 발달이 이에 따라 증가한 것으로 나타났다(Fig. 2-9). Shoot의 증식량이나 잎 등의 형태만으로 본다면 저농도의 sucrose에서 shoot의 증식이 더 잘 되지만 마디의 굵기와 괴경 형성과의 상관관계를 좀 더 고려하여, 사용하는 sucrose의 농도를 결정

해야 할 것으로 사료된다. 그러나 수미의 경우는 1.5% sucrose를 처리할 때 마디수나 마디 굵기 면에서 다른 처리구보다 뚜렷하게 우수하여, 추후 실험에서 이를 충분히 활용할 필요가 있다(Fig. 2-8).

4) Shoot 생장의 경시적 관찰

초장이나 마디수의 증가는 두 처리 모두 25일 전후에서 가장 높았다(Fig. 2-10). 계대를 하지 않고 계속 증식시킬 경우 그 이후에 성장은 하지만 속도가 늦고 특히 1.5% sucrose를 처리한 경우에는 갈변 현상을 보였다. 따라서 shoot는 약 25일-30일 정도 증식시킨 후에 괴경 형성의 재료로 쓰거나 shoot 증식용 배지에 계대하는 것이 경제적인 것으로 사료된다. 대지와 수미의 생장을 경시적으로 관찰하여 shoot 성장과 마디수를 측정하는 것이다(Fig. 2-11, Fig. 2-12). 초장이나 마디수의 증가는 두 품종 공히 sucrose의 농도에 관계없이 25일 전후에서 가장 높았다. 계대를 하지 않고 계속 해서 증식시킬 경우, 그 이후에도 성장하지만 속도가 늦고 특히 1.5% sucrose를 처리한 경우에는 갈변 현상을 보였다. 따라서 shoot는 약 25-30일 정도 증식시킨 후에 괴경 형성의 재료로 쓰거나 shoot 증식용 배지에 계대하는 것이 경제적인 것으로 판단된다. 또한 마디의 수는 배양 초기에 충분히 증가하고 이후에는 신장만을 하는 것으로 생각된다.

5) Shoot 성장에 미치는 광, sucrose 농도 및 환기의 영향

광조건 $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 와 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 인 chamber에서 자란 감자 줄기가 가장 생장이 잘되고 상태가 좋았다(Table 2-4, Table 2-5). 같은 광조건이라도 환기와 당 농도에 따라 상이하었는데 기존에 많이 사용하던 당농도 3%에서 보다는 1.5%에서 더 잘 자랐고, 특히 당농도 1.5%의 경우 환기의 효과가 커서, 환기가 된 것의 감자 줄기는 성장 상태나 잎의 모양, 크기 및 색이 매우 좋았다(Fig. 2-13, 2-14, 2-15, 2-16, 2-17). 이러한 결과는 수미, 대지 두 품종에서 공통적으로 나타났다.

Table 2-3. Effects of PPF, CO₂, sucrose concentration, and aeration on growth of potato shoot.

Treatment				Shoot length	No. of node	Fresh weight
PPF ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	CO ₂ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Sucrose (%)	Filter			
60	500	0	0	2.17eghf ^z	6.0egfh	40.56edf
			X	1.31ih	4.7ih	36.78edf
		1.5	0	3.44bac	7.2ebdac	91.11a
			X	2.54ed	6.0egfh	52.22ebdcf
		3	0	4.09a	7.8bac	54.11ebdcf
			X	3.14bdc	7.9bac	87.56ba
	1500	0	0	1.39igh	6.0egfh	41.67edf
			X	1.27ih	4.3i	33.44edf
		1.5	0	1.89ieghf	6.1egfh	50.11edcf
			X	2.04ieghf	6.4edfc	47.22edf
		3	0	2.62edc	6.9ebdac	60.44ebdacf
			X	1.99ieghf	7.2ebdac	45.89edf
120	500	0	0	1.58ighf	4.9gih	34.56edf
			X	1.30ih	3.9i	27.56f
		1.5	0	3.77ba	6.8ebdcf	86.22bac
			X	2.36edf	6.9ebdac	60.22ebdacf
		3	0	3.14bdc	7.9bac	87.56ba
			X	3.46bac	7.7bdac	63.44ebdacf
	1500	0	0	1.19i	5.3gih	29.00ef
			X	1.23ih	4.7ih	35.89edf
		1.5	0	2.54ed	8.3a	66.56ebdac
			X	2.28egdf	8ba	68.44bdac
		3	0	1.69ieghf	6.2egdf	37.44edf
			X	1.86ieghf	6.1egfh	51.44ebdcf

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test, P=0.05.

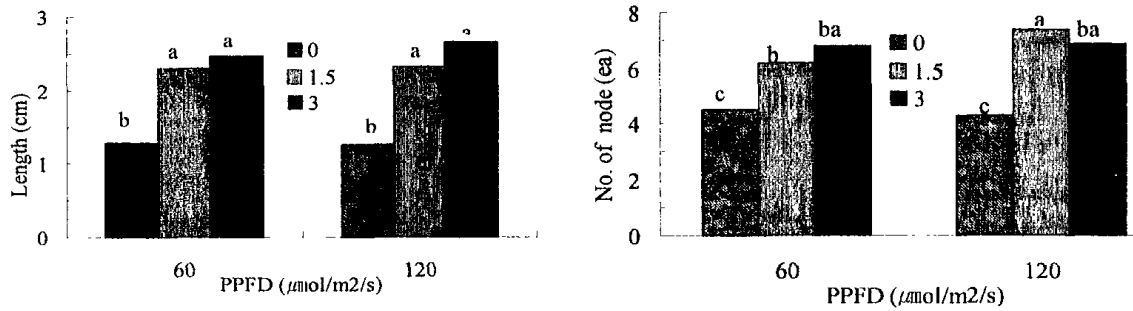


Fig. 2-2. Effects of PPFD and sucrose concentration on growth of potato shoot

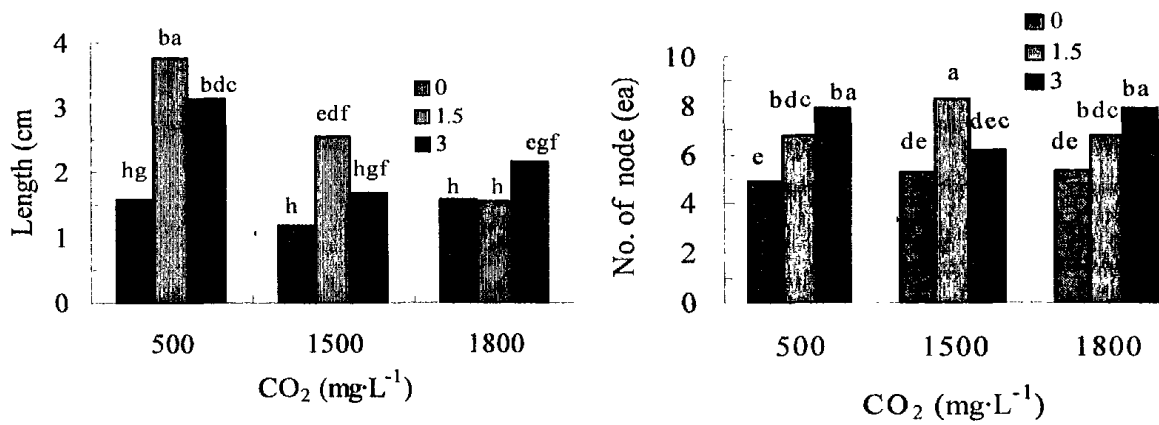


Fig. 2-3. Effects of CO_2 and sucrose concentration on growth of potato shoot under $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

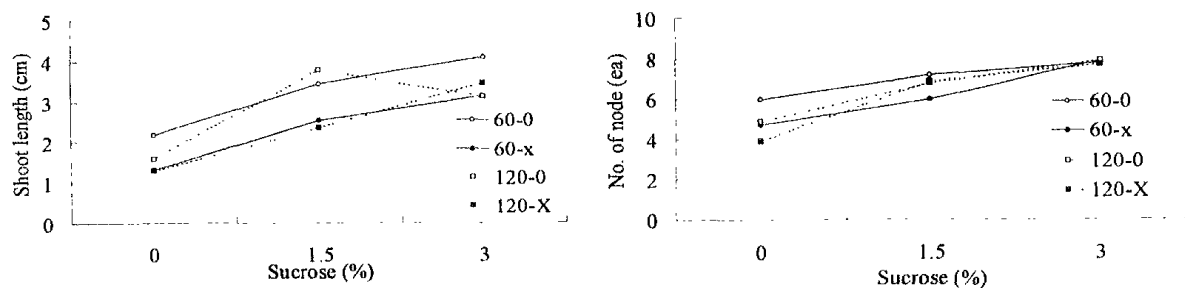


Fig. 2-4. Effects of sucrose, PPF, and aeration on growth of potato shoot under $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CO}_2$.

○: $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, filter foil, ●: $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, foil, □: $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, filter foil, ■: $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, foil.

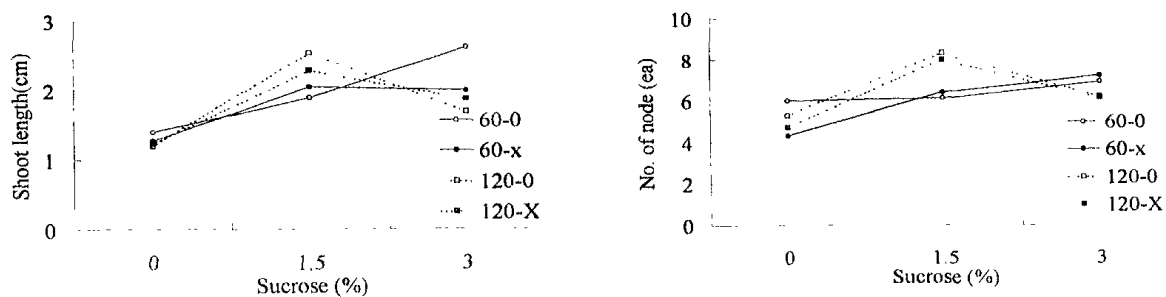


Fig. 2-5. Effects of sucrose, PPF, and aeration on growth of potato shoot under 1500 ppm CO_2 .

○: $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, filter foil, ●: $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, foil, □: $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, filter foil, ■: $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, foil.

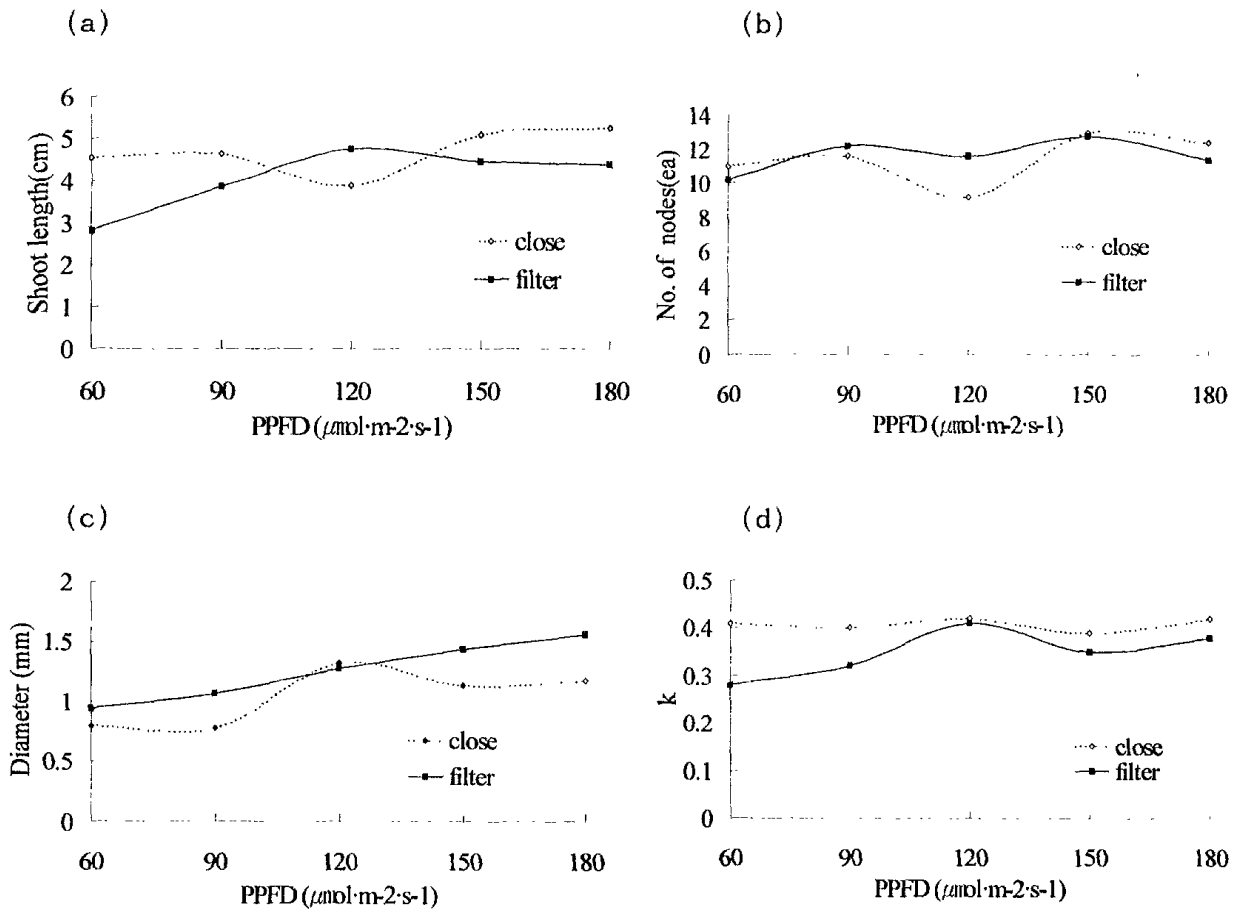
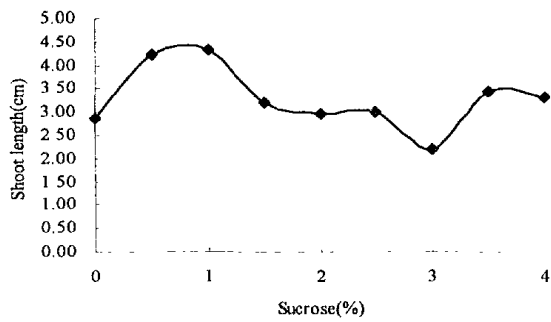
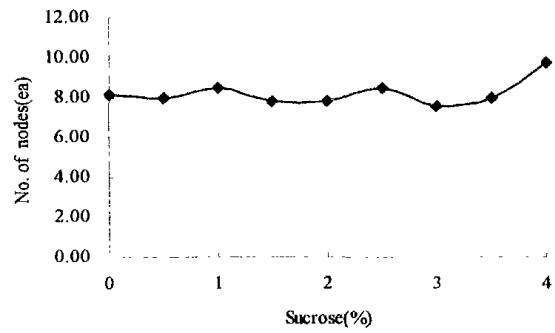


Fig. 2-6. Effect of PPFD on growth of potato shoot.

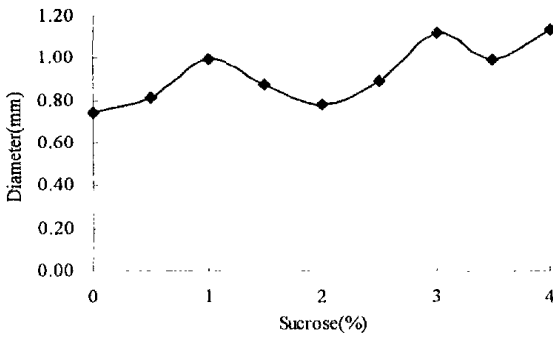
(a)



(b)



(c)



(d)

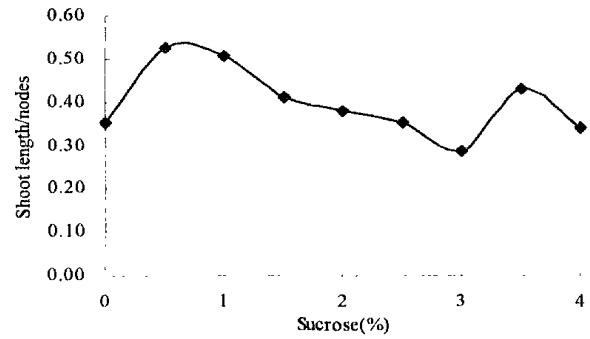


Fig. 2-7. Effect of sucrose concentration on growth of potato shoot(Dejima).

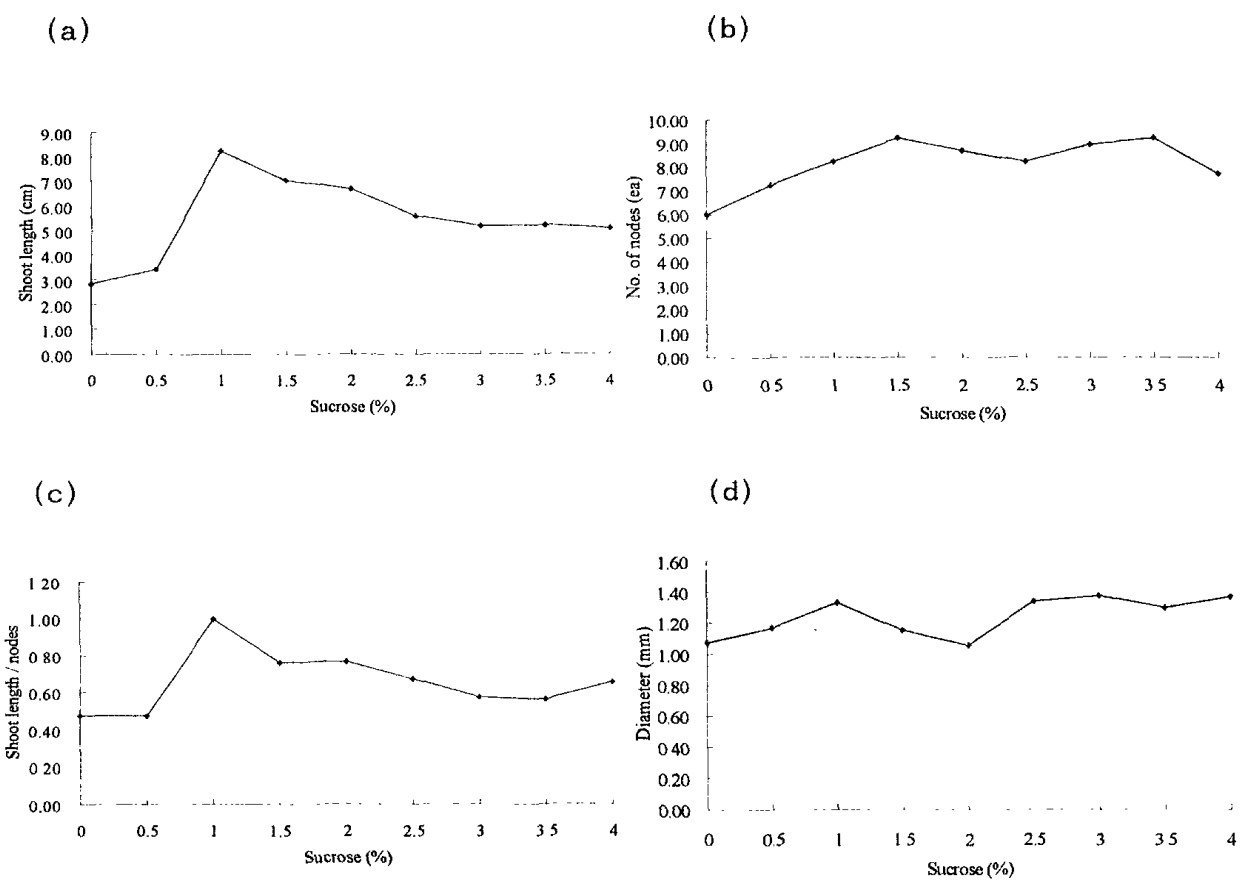


Fig. 2-8. Effect of sucrose concentration on growth of potato shoot(Superior).



Fig. 2-9. Effect of sucrose concentration on growth of potato shoot(Dejima)
 (sucrose concentrations ranged from 0%(right) to 4%(left))

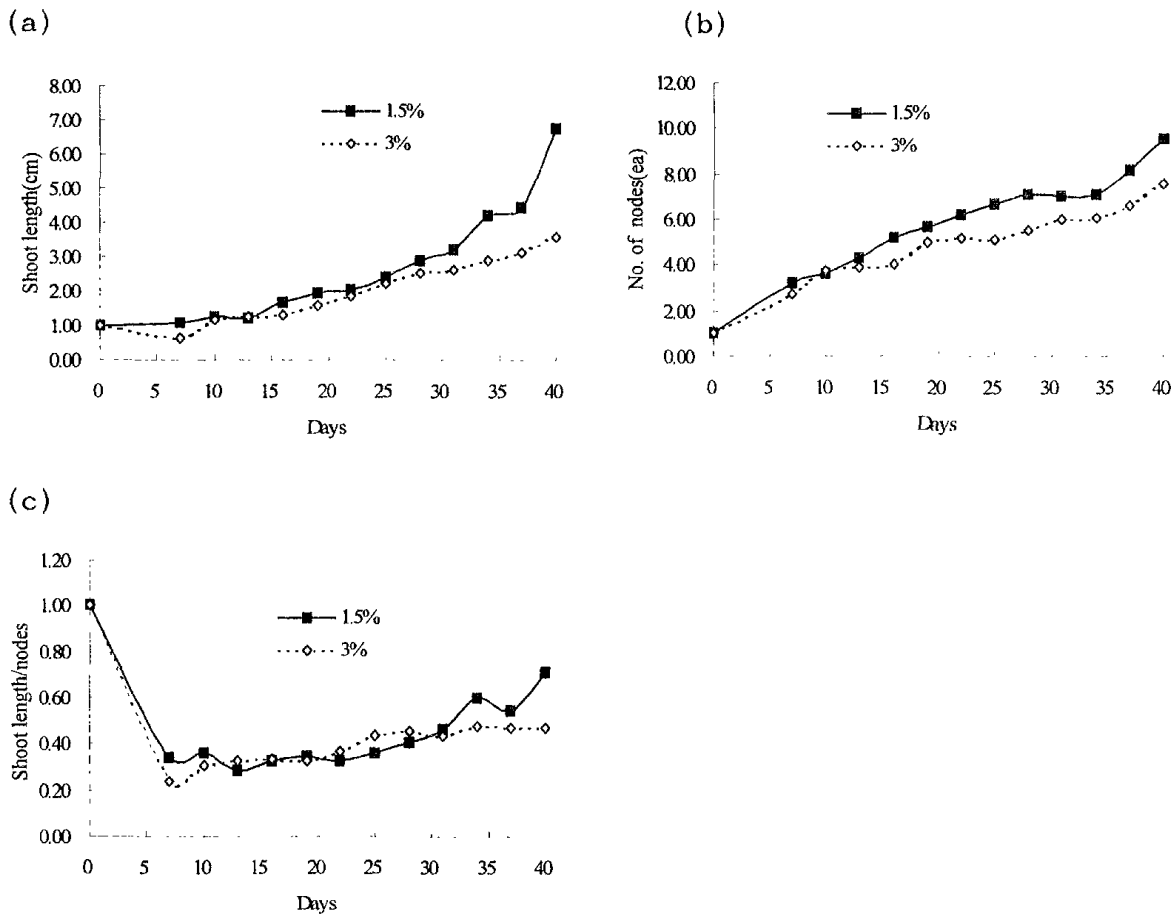


Fig. 2-10. Time course of shoot growth.

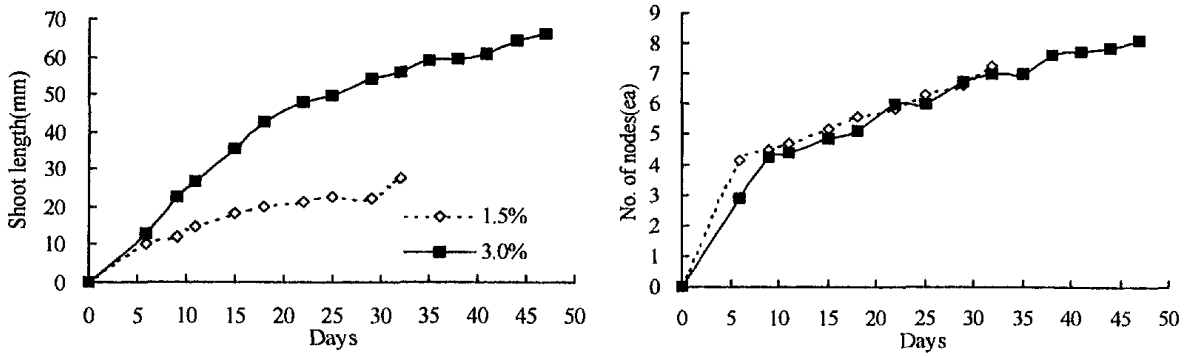


Fig. 2-11. Growth curves of potato shoots (*Solanum tuberosum* L. cv. Dejima).

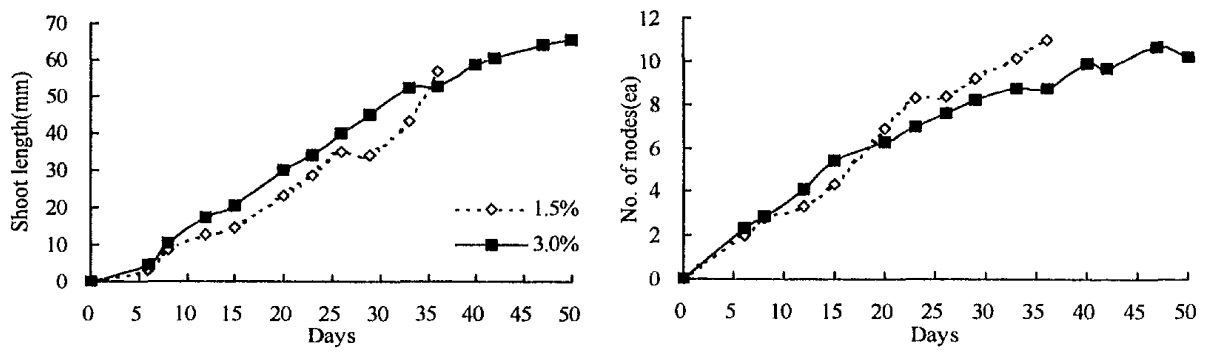


Fig. 2-12. Growth curves of potato shoots (*Solanum tuberosum* L. cv. Superior).

Table 2-4. Effects of PPF, sucrose concentration, and ventilation on growth of potato shoot (*Solanum tuberosum* L. cv Dejima).

Treatment		Shoot length(cm)	No. of nodes(ea)	Diameter of node(mm)	
ch1 ^z	su1.5 ^y	0 ^x	7.433abcd	8.0abcd	1.3abc
		X	3.867e	7.7bcd	0.7cd
	su3	0	7.600abcd	9.0abc	1.4a
		X	8.700abc	8.0abcd	0.9abcd
ch2	su1.5	0	7.667abcd	8.0abcd	1.2abcd
		X	6.850abcde	9.5ab	0.8bcd
	su3	0	5.500cde	6.3d	1.1abcd
		X	6.450abcde	7.5bcd	1.1abcd
ch3	su1.5	0	8.300abc	9.0abc	1.5a
		X	5.400cde	7.3bcd	0.9abcd
	su3	0	6.167abcde	7.7bcd	1.4ab
		X	6.333abcde	7.0cd	0.9abcd
ch4	su1.5	0	9.067ba	8.7abc	1.3abc
		X	4.700de	7.7bcd	0.6d
	su3	0	5.767bcde	8.0abcd	1.4ab
		X	9.133a	7.7bcd	1.1abcd
ch5	su1.5	0	7.700abcd	8.3abcd	1.1abcd
		X	7.500abcd	10.0a	0.8bcd
	su3	0	5.900abcde	8.7abc	1.3abc
		X	8.333abc	9.0abc	0.9abcd

^z Chamber number

^y Sucrose concentration (suc 1.5 = 1.5%)

^x Treatment (0), non-treatment (X)

Table 2-5. Effects of PPF, sucrose concentration, and ventilation on growth of potato shoot (*Solanum tuberosum* L. cv Superior).

Treatment		Shoot length(cm)	Nodes(ea)	Diameter of node(mm)	
ch1 ^z	su1.5 ^y	0 ^x	9.200abc	7.5cd	1.275ab
		X	10.887ab	9.0abcd	1.117abc
	su3	0	8.067abc	9.3abcd	1.333a
		X	11.100ab	7.3d	1.133abc
ch2	su1.5	0	9.100abc	9.0abcd	1.100abc
		X	12.450a	10.0ab	1.000abc
	su3	0	5.600c	8.3bcd	1.367a
		X	7.367bc	7.3d	0.867bc
ch3	su1.5	0	9.000abc	9.5abc	1.250ab
		X	6.700bc	8.0bcd	0.767c
	su3	0	6.833bc	9.0abcd	1.083abc
		X	10.100abc	10.5a	1.000abc
ch4	su1.5	0	9.567abc	9.0abcd	1.383a
		X	6.800bc	8.3bcd	0.933abc
	su3	0	5.733c	8.0bcd	1.3167a
		X	8.200abc	8.3bcd	1.100abc
ch5	su1.5	0	8.333abc	8.0bcd	1.333a
		X	6.533bc	8.0bcd	0.833bc
	su3	0	6.300bc	8.0bcd	1.233ab
		X	7.333bc	9.7ab	1.133abc

^z Chamber number

^y Sucrose concentration (suc 1.5 = 1.5%)

^x Treatment (0), non-treatment (X)

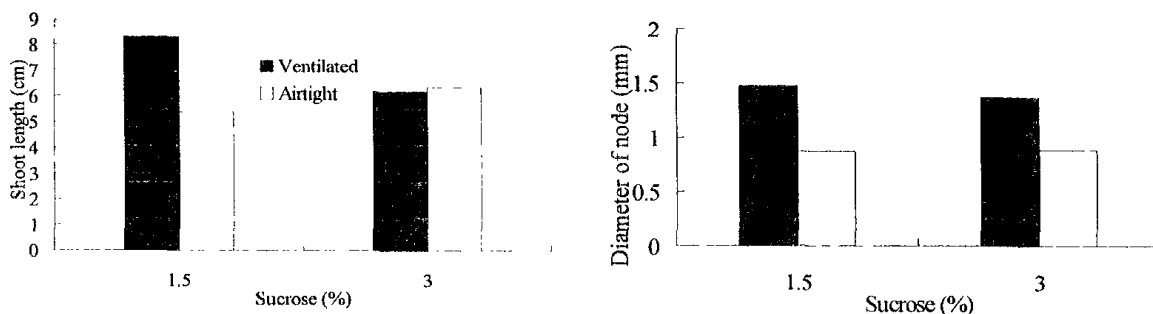


Fig. 2-13. Effects of sucrose concentration and ventilation on growth of potato shoot under $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (*Solanum tuberosum* L. cv Dejima).

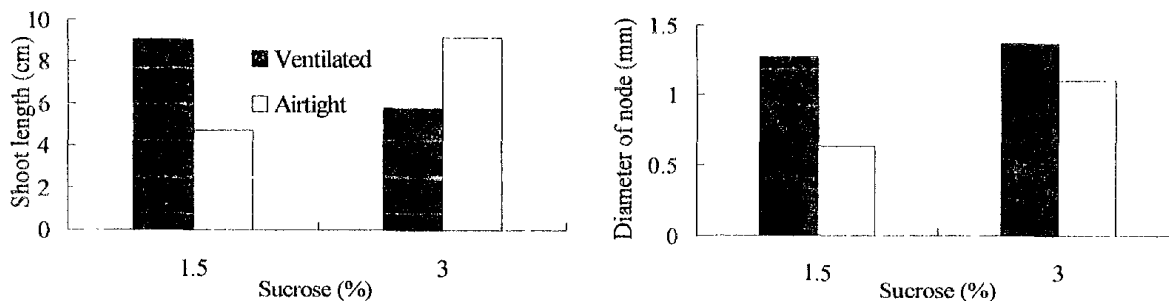


Fig. 2-14. Effects of sucrose concentration and ventilation on growth of potato shoot under $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (*Solanum tuberosum* L. cv Dejima).

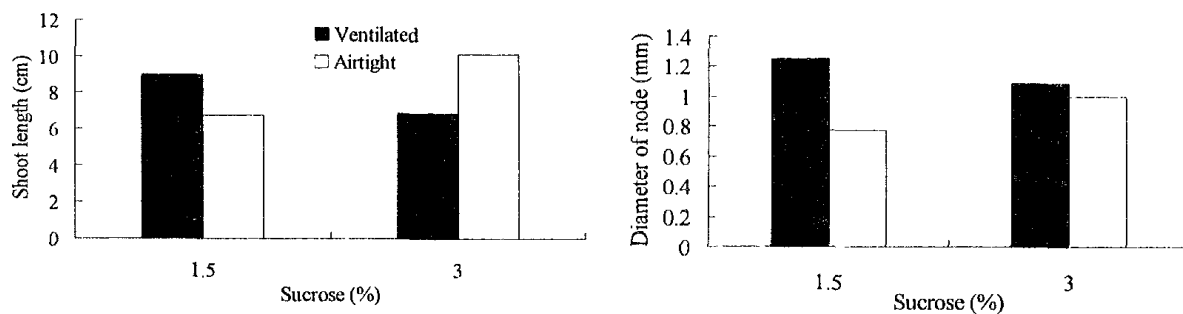


Fig. 2-15. Effects of sucrose concentration and ventilation on growth of potato shoot under $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (*Solanum tuberosum* L. cv. Superior).

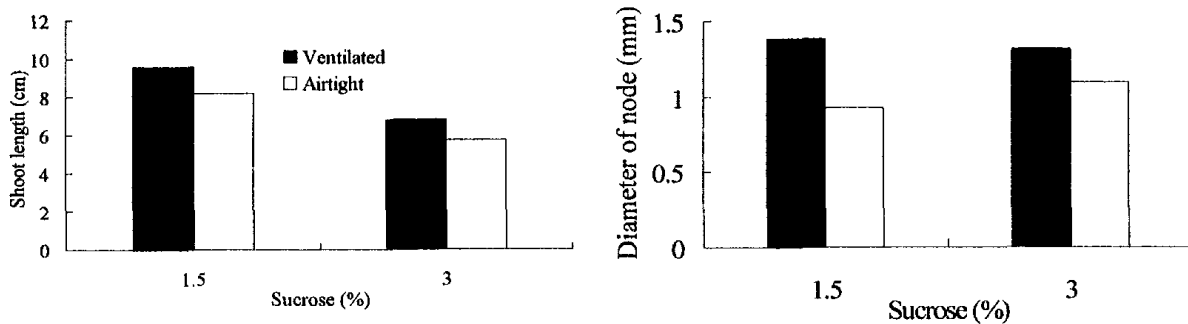


Fig. 2-16. Effects of sucrose concentration and ventilation on growth of potato shoot under $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (*Solanum tuberosum* L. cv. Superior).

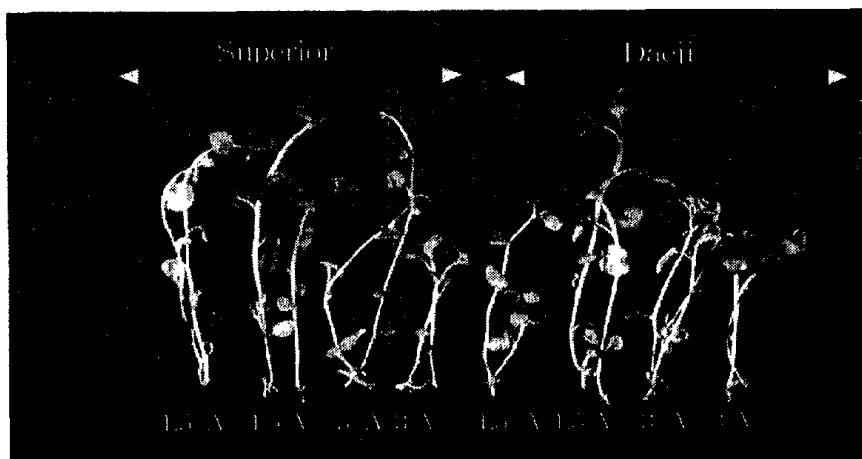


Fig. 2-17. Potato shoots grown under $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Treatment code 15, 3, V, and A represent 1.5% sucrose, 3% sucrose, ventilation, and airtight, respectively.

다. 소괴경 형성 조건

1) 명배양기간에 따른 괴경 형성

Fig. 2-18은 명배양의 길이 및 절편 마디의 위치가 괴경 형성에 미치는 영향을 보여 준다. 문헌에 나타난 경향은 명배양이 30일 정도가 가장 많았으나 실제로 실험한 20일 배양한 것과 큰 차이를 보이지 않았다. 명배양 기간을 20일로 줄이면 전체 배양 기간을 줄이게 되어 비용을 줄일 수 있을 것이다. 그러나 10일이나 0일의 경우 괴경 형성률이 매우 낮아 이 이상 배양 기간을 줄일 수는 없을 것이다. 괴경 형성률은 절편의 위치에 따라서도 매우 큰 차이를 보였는데 대지의 경우 중간 마디에서 괴경 형성률이 높았고 괴경의 크기도 컸다. 반면 수미는 신초 근처의 상위 마디나 기부 근처의 하위 마디에서 큰 괴경이 잘 형성되었다. 전반적으로 대지의 괴경 형성률이 낮은 것은 다른 조건의 영향인 것으로 판단되었다.

2) 액체 배지에서의 배양에 따른 괴경 형성

Fig. 2-19은 액체 배지에서의 배양 기간이 괴경 형성에 미치는 영향을 나타내고 있다. 배양기간이 길어질수록 괴경 형성이 잘 되었다. 그러나 5주 정도 배양한 것의 괴경이 크고 좋았다. Shoot의 굵기가 괴경의 형성에 어느 정도 영향을 미치는 것 같지만, 실제로 괴경은 명배양의 길이나 온도 등에 영향을 더 많이 받는 것으로 판단되며 전반적으로 액체 배지에서의 괴경 형성이 고체 배지에서의 괴경 형성보다 좋았다.

3) 용기 및 배양 종류에 따른 괴경 형성

Table 2-6은 배양 종류 및 aeration에 따른 괴경 형성률을 나타낸다. 괴경 형성이 가장 잘 된 경우는 삼각플라스크에서 액체 배양한 것이다. Aeration이 되는 삼각플라스크의 괴경은 수량이 많을 뿐만 아니라 괴경의 색이 약한 갈색을 띠고 괴경의 모양도 일정한 반면 같은 액체 배양이라도 aeration이 없었던 것은 괴경의 색이 하얗고 부정형이 많았다. 전반적으로 aeration이 되는 경우 괴경 형성률이 잘 되었고 액체 배지에서의 괴경 형성률은 고체 배지와 비교할 때 현저한 차이를 보였다.

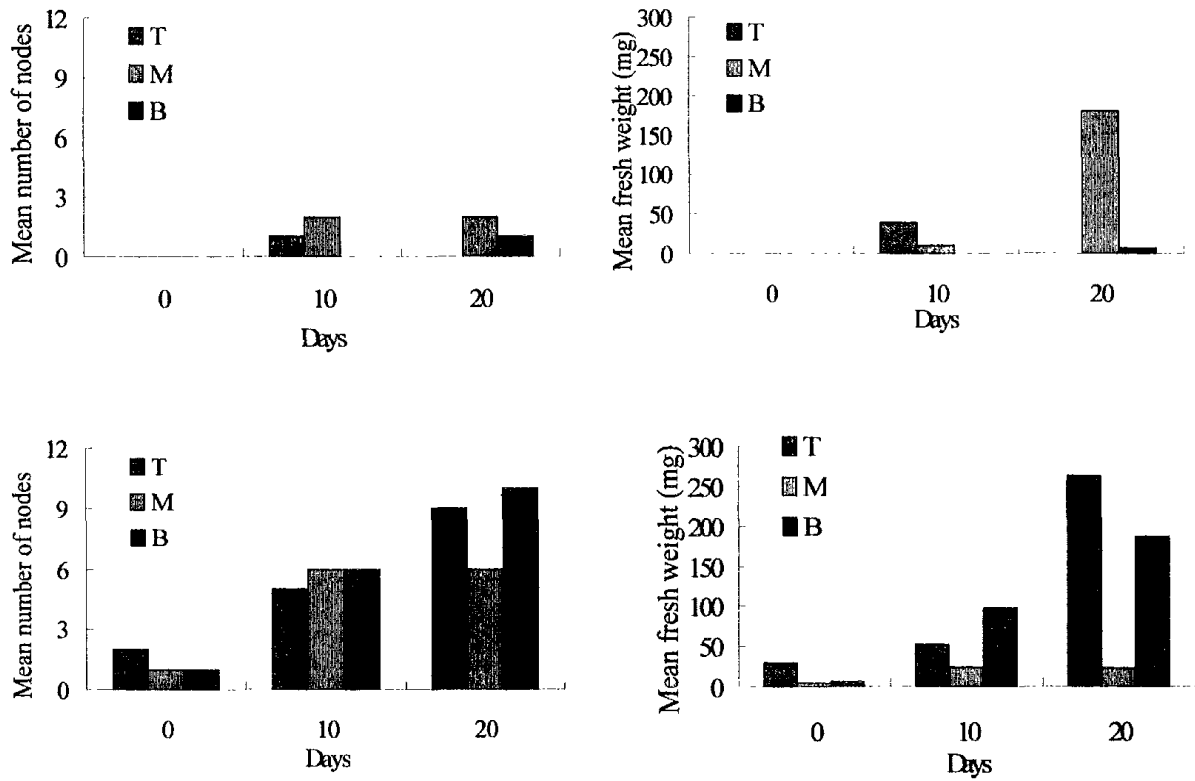


Fig. 2-18. Effects of the duration of light culture and node position on potato tuberization, cv. Dejima (up), cv. Superior (down)
 T(top) : apical tip of shoot and one node below it
 B(base) : most proximal node and 2nd or 3rd node above it
 M(mid) : all nodes between T and B

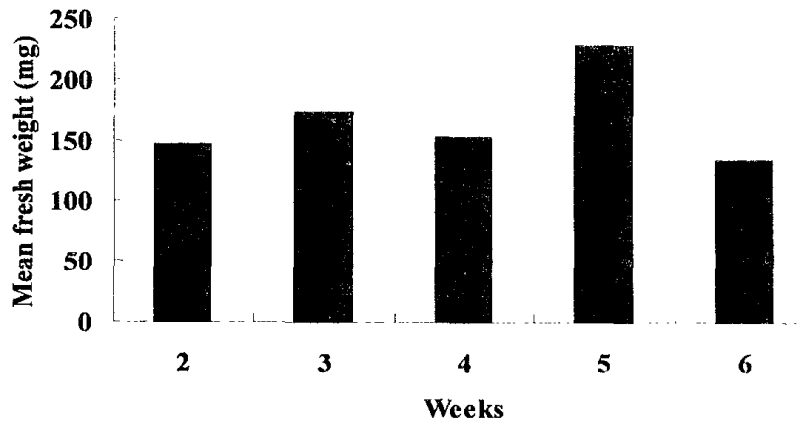
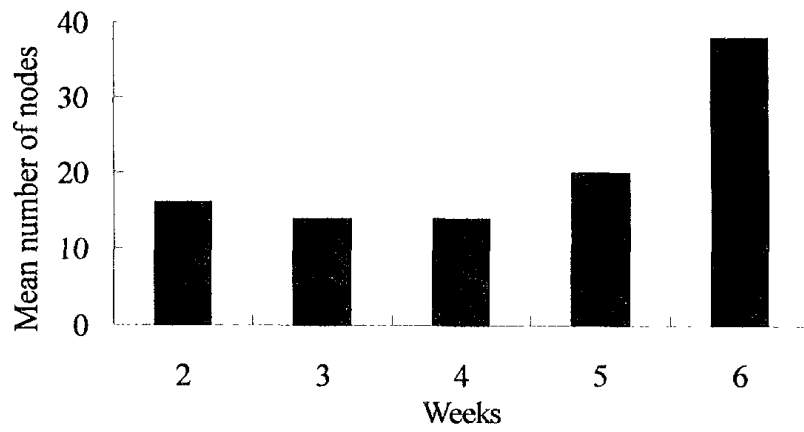


Fig. 2-19. Effects of the duration of liquid culture on potato tuberization

Table 2-6. Effects of culture type and aeration on potato tuberization.

Treatment		Duration of light culture	
Vessel type	Aeration	10 days	20 days
Petri-dish	filter	1	0
	closure	1	0
1/2 bottle	filter	2	2
	closure	2	1
bottle	filter	0	2
	closure	2	1
△-flask	filter	0	24
	closure	0	20

^z Mean separation within a column by Duncan's multiple range test at 5% level.

^y Close by foil.

^x Aeration by foil with 0.2 μmol membrane filter.

제 3 절 기내 환경제어시스템 구축

1. 서언

기내 소식물체 미세증식은 무균 상태의 건전묘를 대량 생산할 수 있는 유일한 생산 체계이기 때문에 다양한 작물에 있어 미세증식 연구가 활발히 진행중이다. 그러나, 생산비용 및 효율이 상용화 수준에 도달하지 않았으며, 이는 주로 기내 소식물체의 비정상화, 기외 이식시 낮은 생존율, 오염에 의한 손실 등에 그 원인이 있다고 할 수 있다. 주로 밀폐에 의해 발생하는 일부 화합물의 결핍 내지 축적에 기인하며, 기내 환경을 기외 조건과 유사한 수준으로 향상시키거나 식물체가 요구하는 최적 조건으로 유지할 수 있다면 상기의 문제를 해결할 수 있게 된다. 따라서, 기내 환경조절의 필요성이 점차 대두되고 있으며, 환경제어시스템에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한, 기내 환경을 단지 정성적으로 분석하여 조절하기보다는 기내 환경 및 생육간 관계 정량화를 통하여 최적 조건을 구명하고 최적 조건으로 제어할 수 있다면 보다 효율적인 대량 묘 증식 체계를 마련할 수 있을 것이다. 이를 위해서는 정밀한 환경 조절이 가능한 기내 환경 제어 조직배양 시스템 구축이 반드시 요구된다. 본 연구는 기내 환경 조절 시스템을 구축하고 본 시스템의 환경제어 특성을 구명함에 목적을 두었다.

2. 재료 및 방법

가. 시스템 구성

최적 환경 제어 시스템을 구축하기 위해서는 최적 제어를 위한 환경과 생육간 정량화가 필요하다. 정밀한 환경제어 시스템은 환경조절이 가능한 시설(300×600×300(h)cm) 내부에 시스템을 배치하였다. 본 시스템은 주 제어 환경요인을 CO₂ 및 광량으로 결정하였으며, 4개(확장가능)의 배양 챔버를 설치하여 동시에 다양한 조건을 구현할 수 있도록 하였다. 온도 및 습도도 일정 조건으로 유지 가능하도록 설계하고자 하였다. 또한 이상의 시스템과 동일한 특성을 갖는 1개의 환경제어시스템을 구축하였다.

나. 배양장치 개요

온도 제어를 위해 냉방/난방장치를 시설 내부에 설치하였으며, 배양 챔버 외부의

공기를 제어함으로써 배양 공간의 온도가 조절되도록 설계하였다. 대규모의 배양실험을 효율적으로 수행하기 위해서는 하나의 CO₂ 공급원 및 센서를 이용하여 다수의 배양 챔버를 동시에 제어할 필요가 있다. 따라서, CO₂ 공급원으로부터 각 배양 챔버에 독립적으로 가스를 공급하기 위해 튜브 및 솔레노이드 밸브로 각 챔버의 유입구를 연결하였으며, CO₂ 센서 또한 하나의 센서로 모든 챔버를 정확히 계측할 수 있도록 튜브 및 솔레노이드 밸브로 각 챔버의 배출구를 연결하였다. 따라서, 동시 제어 가능한 챔버의 수를 무한대로 확장할 수 있도록 확장성을 고려하여 시스템을 제작하고자 하였다.

CO₂ 가스는 현재 공법 상 ethylene이 유입될 수 밖에 없다. 따라서, 제조 과정에 ethylene purge과정이 추가된다. 그러나, 완전한 정제는 불가능하며, 따라서 배양 작물의 ethylene 반응 정도에 따라 CO₂ 가스의 순도를 결정할 필요가 있다. 본 연구에서는 감자(cv. dejima and superior)를 공시작물로 선택하였으며, 감자는 에틸렌에 매우 민감한 작물로 알려져 있다. 99.95%의 순도를 지닌 CO₂ 가스를 CO₂ 공급원으로 이용하였다. 그 외에 각 챔버별 가습 및 제습 장치를 설치하여 상대습도를 일정 수준으로 유지할 수 있도록 하였다. 본 시스템의 모식도는 Fig. 2-20과 같다.

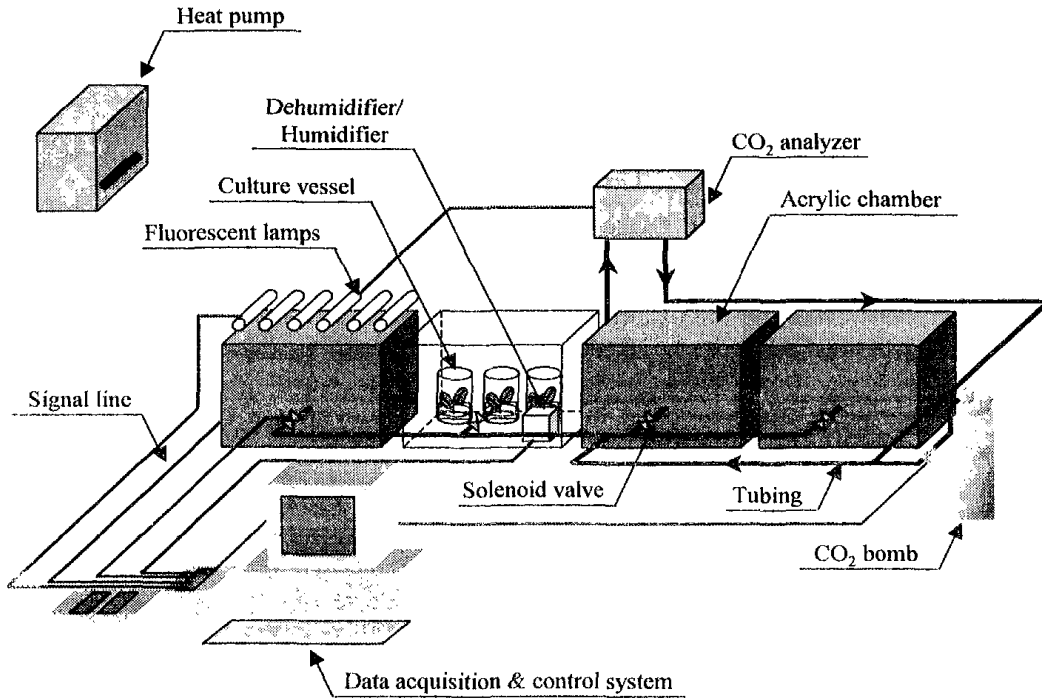


Fig. 2-20. Schematic diagram of micropropagation system.

다. 부분별 상세 설계

본 시스템은 크게 기기부, 배양부, 계측 및 제어부로 분류할 수 있다.

1) 기기부

온도 제어기기로는 air conditioner(Samsung Co. Ltd, AP-705) 및 electrical radiator(Mando Co. Ltd)-heating source를 이용하여 실내(컨테이너)의 온도를 제어하였다. Thermocouple T-type을 이용하여 챔버 외부 및 챔버 내부의 온도를 측정하였다. 챔버내의 온도는 컨테이너 온도 조절을 통해 간접적으로 제어하였다. CO₂ 제어를 위하여, 각 챔버에 inlet, outlet tubing을 연결하고 CO₂ 센서(PP systems Co. Ltd, WMA-3)를 챔버 후방에 위치하여 병렬로 배치되어 있는 각 챔버의 기체를 직접 흡입할 수 있도록 하였다. 이 때 각 챔버에 연결되어있는 tube에는 solenoid valve를 부착하여 시간에 따라 순차적으로 한 챔버만의 기체를 흡입할 수 있도록 하였다. CO₂ 공급은 챔버 전면에 연결된 inlet tube를 이용하여 공급하였으며 각 챔버 inlet에 solenoid valve를 설치하여 시간에 따라 순차적으로 CO₂ 가스를 독립적으로 공급할

수 있게 하였다. inlet solenoid valve는 outlet solenoid valve와 동기화 되어 각 챔버의 CO₂ 제어 시간대와 측정 시간대가 일치하도록 설계되어있다.

상대습도는 챔버내에 thermocouple을 2개를 삽입하여 건습구 온도차로 측정하도록 하였다. 건습구 온도차는 psychrometer의 원리를 이용하여 제작한 통풍건습도계로 측정하였다. 습도 조절의 경우 습도 상승은 내부 공기 bubbling으로, 습도 하강은 챔버 내외간 공기교환으로 구현하고자 하였다. 만약 실제 습도와 제어 목표 습도간 차이가 상대적으로 클 경우, 본 제어 방법은 적절치 않으나 본 시스템내의 환경 조건은 설정치와 실제 측정치간 큰 차이가 없는 경우가 대부분이므로 충분히 제어 가능하였다. 또한 습도는 본 실험에서 중요한 제어 조건이 아니다.

2) 배양부

배양챔버(400×300×600mm, 72L)는 10mm지름의 아크릴판을 제작하였다. 총 4개로 제작된 챔버는 유입구와 배출구를 두어 비닐튜브로 독립적으로 연결하였으며 각각 솔레노이드 밸브를 부착하여 외부 신호로 각 챔버의 유입구와 배출구를 여닫을 수 있게 하였다. 유입구는 CO₂ bomb로 연결되어 각 챔버별 적합한 양의 CO₂ 가스를 주입하게 되며 배출구는 CO₂ 센서와 연결되어 챔버내 CO₂ 농도를 신속하고 안정되게 측정할 수 있도록 하였다. 배양 챔버 상단에는 삼파장 형광등(Kumho Co Ltd, 20W)을 설치하여 챔버내로 큰 광량의 손실없이 전달될 수 있도록 설치하였으며, 광량은 광원수로 조절하도록 하였다. 또한 광원에서 발생한 복사열을 신속히 배출할 수 있도록 챔버와 광원사이에 강제 흡기팬(220V, 120mm in diameter)을 설치하였다.

3) 계측 및 제어부

계측 및 데이터 수집기기로는 CR10X(Campbell Co Ltd.)를 이용하였으며 측정점을 확장하기 위해 총 32점의 AM416 multiplexer(Campbell Co. Ltd)를 부착하였다. 또한, 계측값을 이용하여 다양한 제어를 구현할 수 있는 총 16점의 SDM-CD16AC(Campbell Co. Ltd)를 연결하여 온도, CO₂, 습도, 광주기등을 유기적으로 제어하도록 하였다. 이렇게 구성된 환경 조절 시스템의 모식도는 Fig. 2-21과 같다.

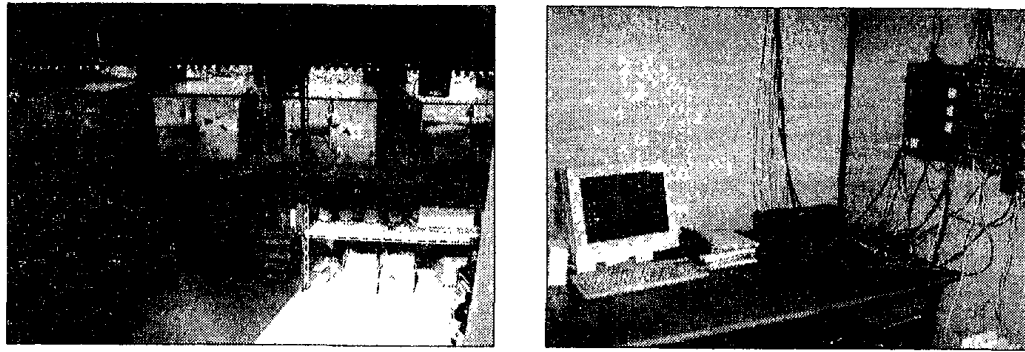


Fig. 2-21. Photographs of environmental control and micropropagation systems.

라. 시스템 특성 분석

일반적으로 배양 챔버와 같은 크기의 밀폐환경은 광, 온도, 풍속 등의 다양한 외부 물리적인 환경요인들에 의해 쉽게 변화된다. 본 연구에서 사용되는 배양 챔버 내부의 환경요인 변화를 분석함으로써, 배양시스템의 환경 특성을 파악하는 것을 목적으로 하였다.

1) 조직배양시스템내의 온도 측정

밀폐 환경에서 광에 따른 온도 구배 형성 및 온도 분포의 변화는 챔버 내부나 배양 용기 내부의 미기상 및 조직배양묘의 생육에 영향을 미치게 된다. 광주기에 따른 챔버의 온도 변화, 온도 분포를 살펴보고, 실제로 작물에 영향을 미치는 배양 용기 내의 온도 변화를 조사하였다.

가) 명기/암기변화에 따른 배양조내의 온도 분포

온도 분포는 밀폐 공간의 미기상 변화에 중요한 요소로 작용한다. 이를 구명하기 위해 시스템과 동일한 광 환경을 구현하는 세트를 제작하였다. 챔버로부터 광원까지의 거리는 상방향 100mm이고 광강도를 배양체 위치 기준 $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 로 설정하였다. 광주기는 16/8hr(명기/암기)로 하여 24hr동안의 온도 변화를 관찰하였다. 수평 온도 분포는 배양체에 직접 영향을 미칠 수 있는 챔버 내부의 지면으로부터 400mm 윗 부분이며 thermocouple(T-type)을 이용하여 총 12점을 측정하였다(Fig. 2-22). 수직 온도 분포는 챔버 중앙 부분을 기준으로 3점을 측정하였다(Fig. 2-23).

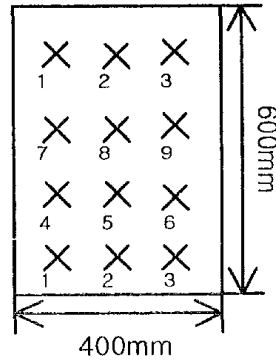


Fig. 2-22. Spatial distribution of temperature measurement point in horizontal direction.

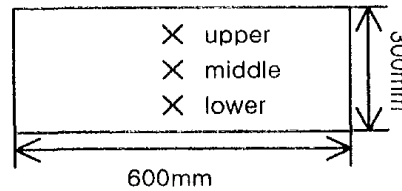


Fig. 2-23. Spatial distribution of temperature measurement point in vertical direction.

나) 명기/암기 변화에 따른 챔버 및 용기 내부의 온도

배양 챔버는 미기상 환경으로 외부와는 다른 온도 변화 특성을 지니고 있다. 또한 용기 내부의 미기상 환경도 챔버 환경과는 다른 온도 변화 특성을 지닌다. 일반적으로, 배양실 규모의 온도 제어 및 계측은 이루어지고 있으나 실제로 배양묘에 미치는 배양 용기 내의 미기상 온도나 배지의 온도 계측 및 구멍에는 큰 비중을 두고 있지 않다.

본 연구에서는 광도, 광주기, 배지종류에 따라 배양 챔버의 온도 변화 양상과 함께 배양용기의 기상 온도, 배지 온도의 변화 양상을 구명하고자 하였다. 광도는 60, 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 설정하여 각 광도간 온도 변화를 관찰하였고, 광주기는 16/8hr(명기/암기)으로 설정하여 명기와 암기 전환기 동안의 변화를 관찰하였다(Fig. 2-24). 또한 배지는 고체배지와 액체배지간 비열의 차에 근거한 온도 변화 특성을 관찰하기 위하여 고체배지와 액체배지를 넣은 배양용기를 동일 환경에 적용하여 변화를 분석하였다(Fig. 2-25).

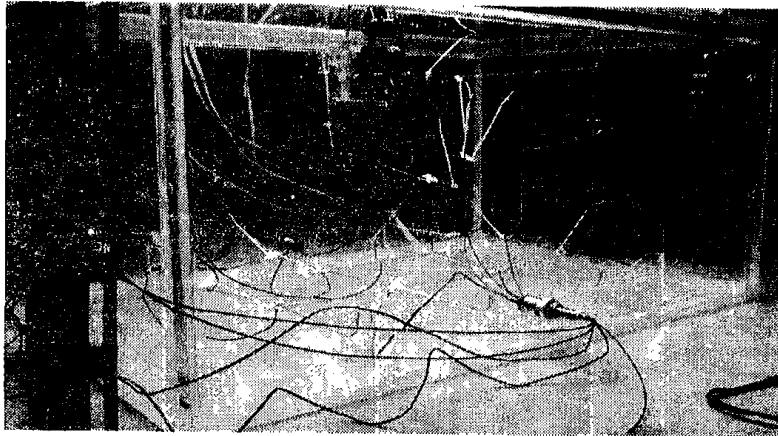


Fig. 2-24. Photograph of temperature measurement.

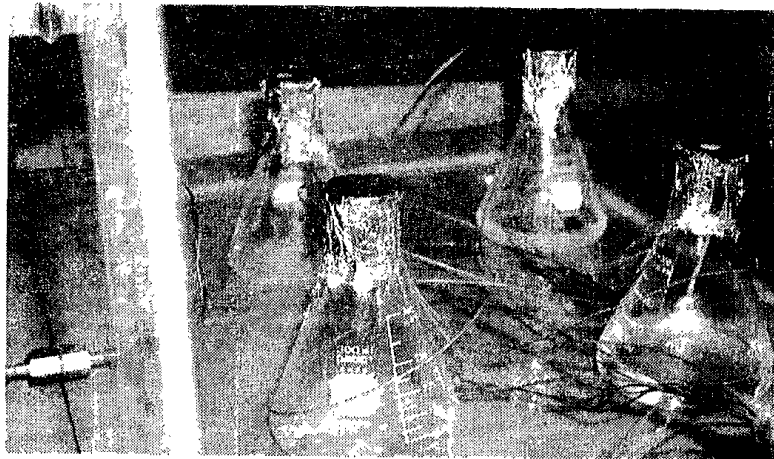


Fig. 2-25. Photograph of temperature measurement in the vessels.

2) 조직배양시스템내의 환기율 측정

배양 챔버의 CO₂농도는 배양 용기내의 CO₂농도와 큰 차이를 보인다. 이는 배양 용기의 마개로 인한 공기 유입의 차단이며 배양묘의 생육에 영향을 미친다. 명기의 경우 배양 용기 내부의 CO₂ 농도는 점차 줄어들게 되며, 암기의 경우 불필요한 축적을 일으킨다. 특히 에틸렌등 유해물질의 축적을 수반하므로 생육 저해를 촉진할 수 있다. 배양 용기의 환기 횟수는 이러한 점에서 챔버의 CO₂ 제어와 함께 주요 환경 제어 요인으로 설정할 필요가 있다. 이와 함께, 환기횟수를 높이는 환경 요인에 대한 조사를 수반되어야 한다.

본 연구에서는 알루미늄 호일과 SUN cap, Milliwrap, OPP, CPP 필름으로 용기의 마개를 이용하였을 때, 면적을 10mm, 20mm로 변경하였을 때 각각의 환기 횟수를 결정하였다. 그리고, 배양 챔버를 밀폐했을 때와 4L·min⁻¹, 8L·min⁻¹, 15L·min⁻¹의 유량을 주었을 때의 환기 횟수를 측정함으로써 밀폐 환경의 미기상 변화가 배양 용기의 환기 횟수에 미치는 영향을 조사하였다. 또한, 각 유량 별로 배양 챔버의 위치에 따른 풍속을 측정함으로써 환기 횟수에 미칠 수 있는 미기상 상태를 조사하였다. 풍속 측정에는 열선풍속계(Kanomax)를 이용하였으며 총 9점을 측정하였다.

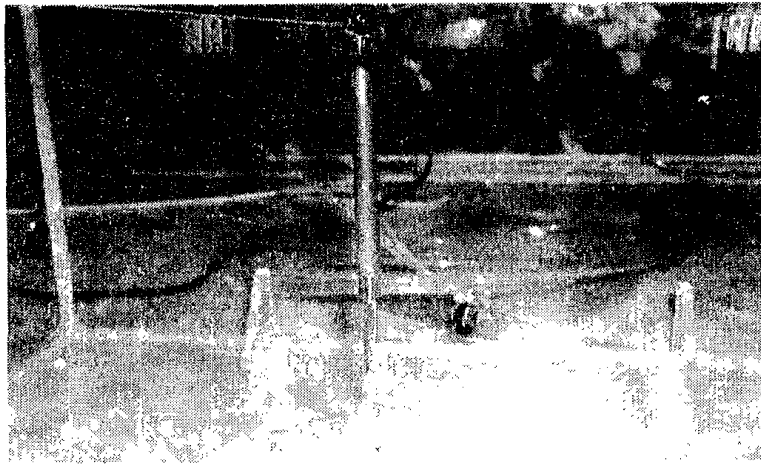


Fig. 2-26. Photograph of wind velocity measurement in the chamber

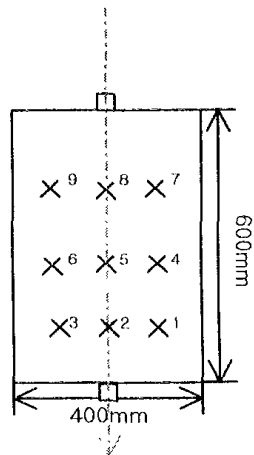


Fig. 2-27. Spatial distribution of wind velocity measurement.

3. 결과 및 고찰

가. 조직배양용 환경제어 시스템 구성

본 연구에서 제작한 조직배양 환경 제어 시스템의 형태는 Fig. 2-23, Fig. 2-24와 같다. 기본적으로 CO₂ 농도를 제어하고 diaphragm을 이용하여 각각의 챔버로 기체 송출이 가능하며, 각 챔버의 CO₂ 농도 측정이 가능하다. 이는 제어 알고리즘을 이용하여 각 챔버의 고유 번호를 지정하고 CO₂센서의 측정시간을 고유 번호와 연결되도록 하는 제어 로직을 추가함으로써 가능하였다. 이러한 방식은 각 챔버를 별도로 측정 및 제어함으로써 각기 다른 CO₂농도를 구현할 수 있는 장점이 있다. 배양 챔버의 측면 상단에 소형 팬을 설치하여 기체가 신속히 균일하게 되었다.

현 시스템에서는 총 5개의 챔버가 설치되어 있지만, 그 이상의 챔버 설치 확장이 가능하다. 각 챔버의 광원을 독립시켰기 때문에 서로 다른 광주기를 적용할 수 있었고, 챔버 내부의 실제 배양 부위 광도는 최대 $320 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 를 구현할 수 있었다. 또한 이상의 특성을 갖는 1개의 전용 조직배양용 환경제어 시스템을 구축하였다.

나. 컴퓨터에 의한 조직배양 시스템의 환경제어

본 시스템의 환경 제어 및 계측은 크게 CO₂, 광주기, 온도 등으로 나눌 수 있다. CO₂는 배양 챔버에 고유 번호를 할당하여 특정시간에 해당하는 고유 번호를 지닌 챔버만을 계측하도록 알고리즘을 구성하였다. CO₂ 농도 제어는 비례제어를 응용하여 목적치에서 일정 농도를 벗어나면 주입시간을 길게하고, 목적치에 근접했을 경우 짧게 하는 방법을 적용하였다. 프로그램 제어 알고리즘은 Fig. 2-28과 같다.

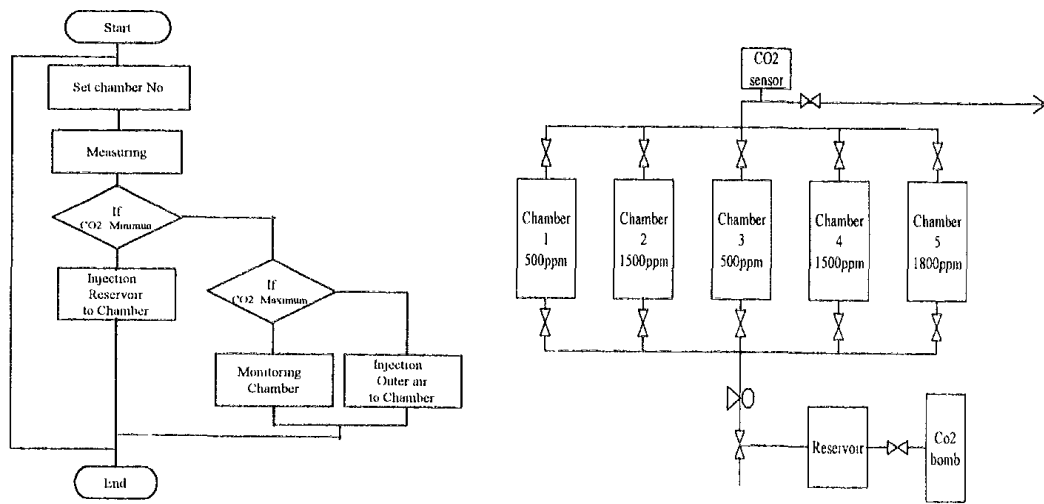


Fig. 2-28. Schematic diagram of CO₂ control algorithm and sequence CO₂ control.

본 시스템은 5개의 배양 챔버를 연결하였으므로 1번 챔버를 계속 제어할 때 2, 3, 4, 5번 배양 챔버는 밀폐된 상태로 유지된다(Fig. 2-28). 순차적으로 계속 및 제어가 실행되며, 제어대상을 변경하는 신호는 CO₂ 센서의 보정 시간을 이용하였다. CO₂ 센서를 최종 경로에 설치(Fig. 2-28)하였으므로 다음 배양 챔버로 경로를 전환할 때 잔여가스의 영향을 받지 않도록 하기 위하여 CO₂ 센서의 보정 시간으로 설정하였고, 그 결과 잔여가스의 대부분은 방출되어 계속에 큰 영향을 미치지 않았다. 광주기는 CR10X에서 기본적으로 제공하는 전용 프로그램의 타이머 옵션으로 제어되었다.

다. 조직배양시스템의 환경 특성

1) 배양시스템내의 CO₂ 제어

본 시스템의 CO₂ 계속 및 제어는 각 배양 챔버별로 독립적으로 실시된다. 한 챔버 제어에 1분이 소요되므로, 현 구축 시스템에서는 총 5분의 1순환을 가지며 제어 시간 외의 4분은 밀폐 상태로 유지된다. 그에 따라, 수집되는 데이터는 외견상 각 배양 챔버의 연속적인 CO₂ 변화량을 보여주지 못한다(Fig. 2-29). Fig. 2-29는 본 시스템을 1번 챔버 500ppm, 2번 챔버 1500ppm, 3번 챔버 500ppm, 4번 챔버 1500ppm, 5번 챔버 1500ppm으로 맞추었을 때의 CO₂ 변화값을 보여준다.

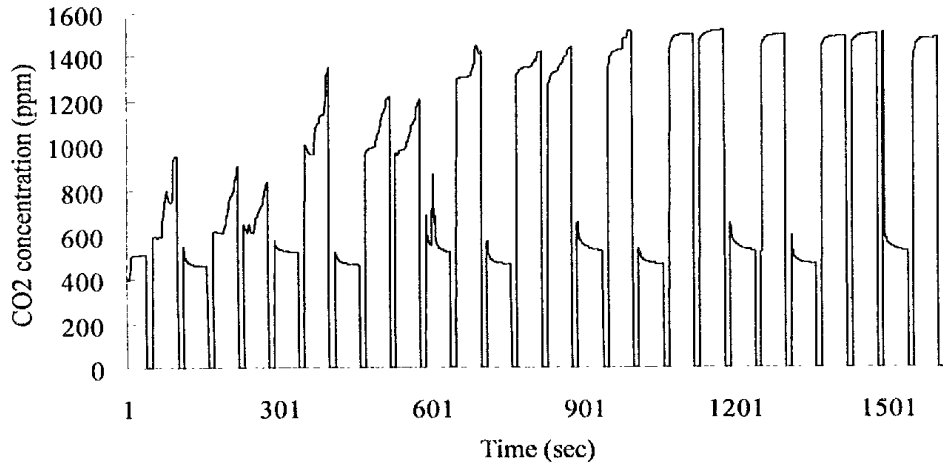


Fig. 2-29. Control characteristics of CO₂ control.

본 그림은 1초를 시스템 시작 시작시간으로 간주하여 각 챔버를 1분씩 제어하고 있음을 보여준다. 초기 데이터는 1번 챔버를 계측, 제어하고 있음을 의미한다. 0으로 바뀌었을 때는 약 10초 정도의 보정 시간이고 이 시간을 기준으로 하여 다음 챔버로 제어를 전환한다. 그러므로 다음의 데이터는 2번 챔버의 계측, 제어 값이다. 이러한 순서를 계속하여 5번 챔버의 제어가 종료된 후에는 다시 최초의 챔버로 되돌아가기 때문에, 각 챔버의 데이터를 분석할 수 있다. 2, 4, 5번 챔버의 CO₂ 농도가 약 10분 내로 목적치인 1500ppm에 근접하고, 20분내에 목표치에 도달하므로 안정된 제어를 하고 있음을 알 수 있다.

본 시스템에서는 비례제어를 적용하였기 때문에, CO₂ 농도가 목표치 보다 매우 낮은 경우 급격한 증가와 함께 목표치에 근접한 경우 완만한 증가를 하여 정확히 목표치에 도달할 수 있다. 1, 3번 챔버는 초기치가 목표치보다 높기 때문에 외부 연결 경로를 통해 외부 공기를 주입하여 조금씩 감소시키고 있다. 각 챔버의 계측 제어시 초기 데이터는 CO₂ sensor에서의 챔버 기체를 추출할 때 발생하는 오차로서, 약 3초 정도 경과 후 정확한 CO₂ 농도를 계측할 수 있다. 그에 따라, 초기 3초 동안은 계측만 하도록 제어 알고리즘을 작성하였다.

2) 광환경 제어

본 시스템의 광원은 광도와 광주기를 제어할 수 있도록 설계되어 있다. 광도는 1차적으로 고정식 안정기를 사용했기 때문에, 형광등의 수로 제어해야 하지만, 차기에는

가변식 안정기를 사용할 예정이다. 1, 2번 챔버는 $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 3, 4, 5번 챔버는 $120 \mu\text{mol} / \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 로 설정하였다. 광주기는 시스템의 제어 계측기기로 제어하고 있으며 현재 16:8hr(명기:암기)로 설정하였다.

3) 온도 변화 분석

본 시스템에서 온도는 계측 환경 요인으로서 최적의 생육을 보이는 온도를 상수로 정해 컨테이너의 히트펌프로 유지하도록 하였고, 광주기에 따른 온도 변화를 관찰할 수 있도록 하였다. 16/8hr의 광주기로 시스템을 작동시킬 때의 컨테이너와 각 챔버의 온도 변화는 Fig. 2-30과 같다.

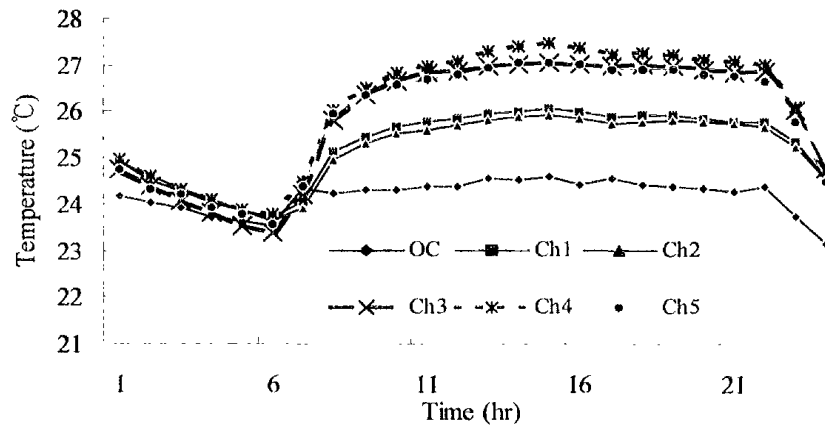


Fig. 2-30. Photoperiodic time course of temperature in the chamber.

설정온도는 24°C 이며, 오전 6시부터 명기, 오후 10시 이후는 암기로 하였다. 광강도가 높을수록 챔버의 온도는 상승하였다. 또한, 광주기에 따른 광 분포는 Fig. 2-31 및 2-32와 같다.

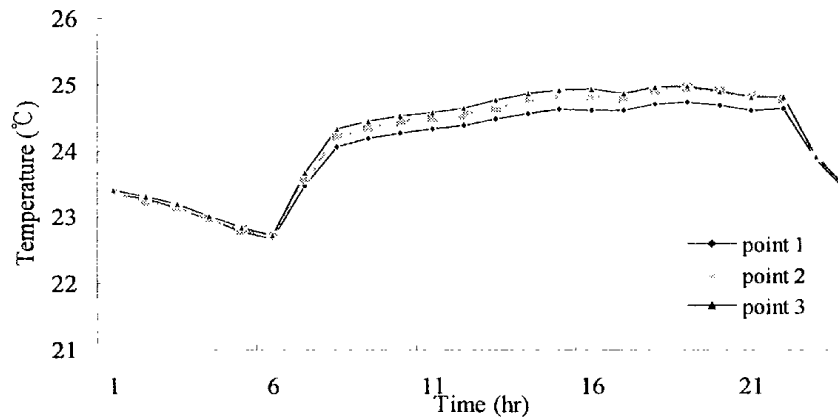


Fig. 2-31. Time course of temperatures with vertically different point.

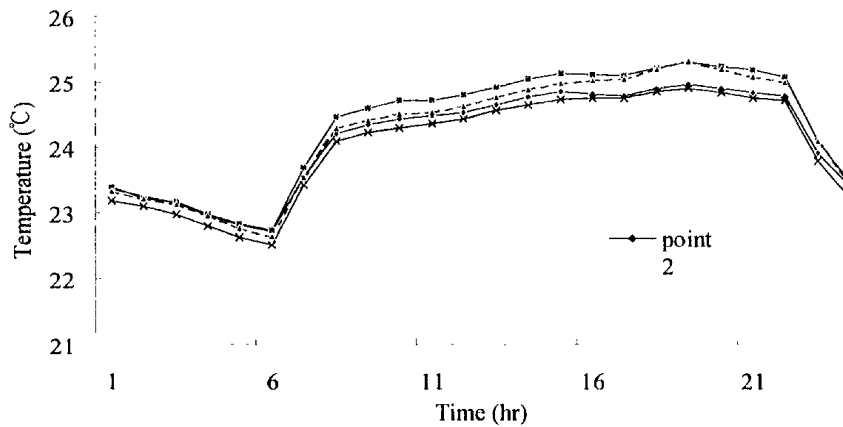


Fig. 2-32. Time course of temperatures with horizontally different points.

온도 분포는 명기일 때, 가로 방향의 분포를 보았을 때 중앙 부분(point 2)이 높은 특성을 보이고 있으며, 세로 방향의 분포도 마찬가지로 중앙 부분(point 5, 8)이 높은 특성을 보였다. 실제로 조직배양묘의 생육에 영향을 미치는 온도는 배양 용기 내부의 온도이므로 이에 대한 구명도 매우 중요하다. 본 연구에서는 이를 약광($60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)과 강광($120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 조건, 고체 배지와 액체 배지 조건, 알루미늄 호일과 필터 처리된 알루미늄 호일 등의 조건에 따라 용기내의 배지온도와 기상 온도를 측정된 결과는 Fig. 2-33, 2-34, 2-35와 같다.

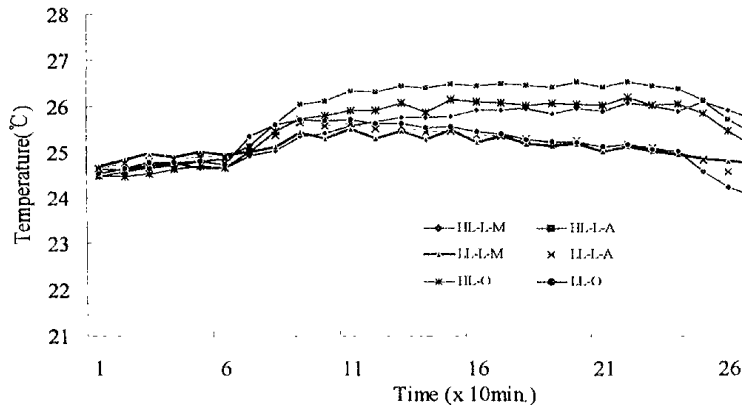


Fig. 2-33. Temperature difference between aerial part and liquid medium. HL, LL, L, M, A, and O represent high PPFD, low PPFD, liquid medium, medium part, aerial part, and outside of the vessel, respectively.

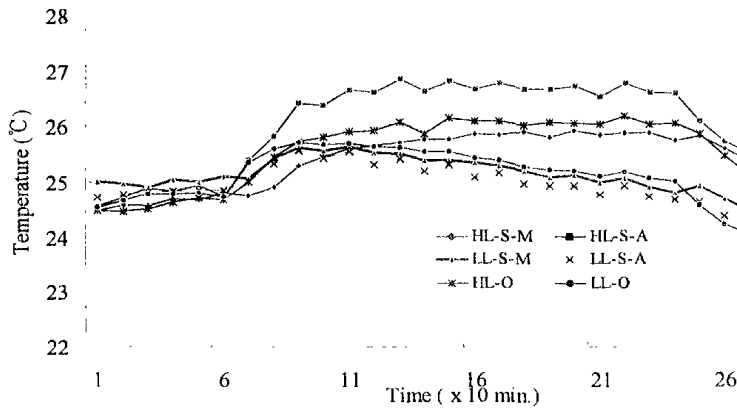


Fig. 2-34. Temperature difference between aerial part and solid medium. HL, LL, S, M, A, and O represent high PPFD, low PPFD, solid medium, medium part, aerial part, and outside of the vessel, respectively.

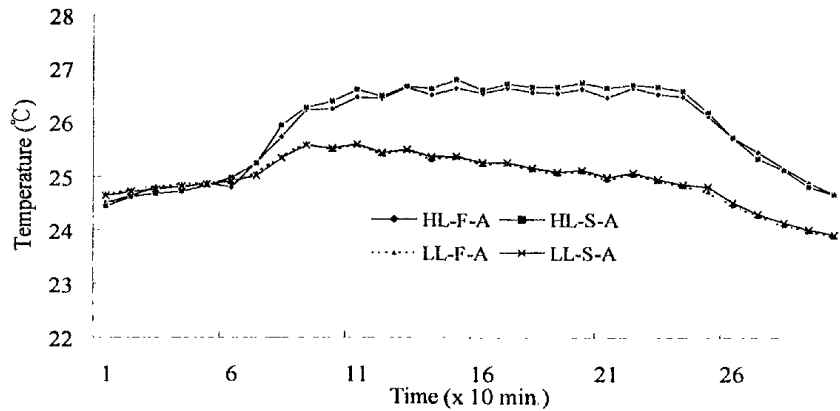


Fig. 2-35. Temperature difference between closed and ventilated vessels. HL, LL, F, S, and A represent high PPFD, low PPFD, alluminium foil, SUN cap, and aerial part, respectively.

모든 실험 데이터의 값은 3시간/2시간의 광주기를 적용한 것이다. 즉, 1시간 암기-3시간 명기-1시간 암기 조건을 설정하였다. Fig. 2-33, 2-34의 경우 액체 배지와 고체 배지간 챔버와 용기내의 배지, 미기상 온도를 관찰하였다. 모든 처리에서 강광의 경우, 명기로 전환되었을 때 용기내의 배지와 미기상 온도가 챔버의 온도보다 높아지는 양상을 보였다. 약광의 경우, 용기내의 모든 온도가 챔버의 온도에 근접하여 비슷한 유형을 나타내며 유지되었다.

따라서 광도가 높아짐에 따라 배양 용기 내의 온도 변화는 진폭이 더욱 커짐을 알 수 있다. 용기내 온도는 배지보다 온도의 진폭이 크고, 신속하게 외부의 변화에 반응을 하였다. 배지 종류간 비교에서 고체 배지의 온도 변화가 외부 온도의 변화에 민감하여 반응의 진폭과 시간이 짧았다. 액체배지의 경우, 명기에서 암기로의 전환시에 챔버, 용기내 미기상 기온의 변화에 빠르게 반응하지 못한 것으로 분석되었다. 또한 용기의 덮개를 알루미늄 호일을 사용하였을 때와 필터 처리된 호일을 사용하였을 때의 환기횟수 차에 의해 용기 내부의 온도 변화를 분석한 결과, 환기횟수가 높아지더라도 온도의 변화는 크게 차이가 없는 것으로 나타났다(Fig. 2-35).

4) 환기특성 분석

조직배양시스템 내의 환기 횟수를 구하기 위하여 적용된 식은 다음과 같다.

$$\text{환기횟수} = \frac{1}{T_2 - T_1} \times (\ln(C_1 - C_0) - \ln(C_2 - C_0)) \text{ -----(2-1)}$$

필터별 환기 특성의 경우 Milliwrap, SUN cap, CPP, OPP, aluminium foil 순으로 환기효율이 우수함을 알 수 있다(Fig. 2-36). 이는 필터 자체의 pore 크기와 관련된 것으로서 필터 자체의 특성으로 간주할 수 있다. 여기서 CPP, OPP는 투명한 재질의 필터로서 광투과효율이 우수한 특징이 있으나, 환기 효율이 많이 떨어지기 때문에 비효율적이라고 판단된다.

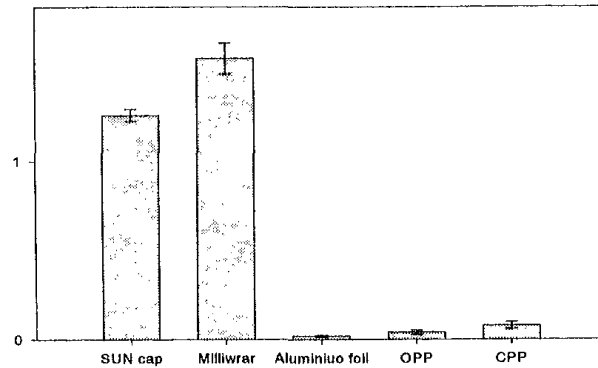


Fig. 2-36. Effect of various filters on number of air exchange.

본 실험에 적용된 각 유량의 내용은 Table 1과 같으며, 이러한 유량 처리에 따라 각 용기의 환기횟수는 Fig. 2-37과 같다.

Table 2-7. Description of flow rate treatments.

Treatment code	1	2	3	4
Flow rate ($\ell \cdot \text{min}^{-1}$)	0	4	8	15

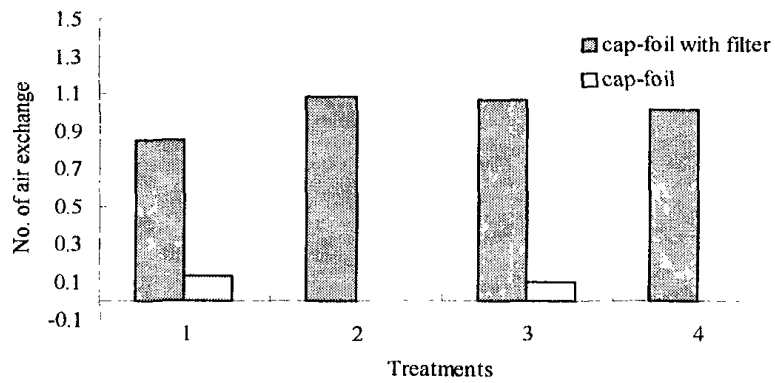


Fig. 2-37. Number of air exchanges with different flow rates and closure treatments.

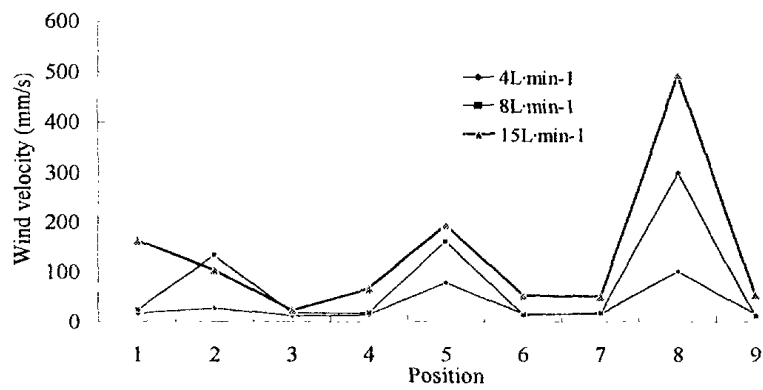


Fig. 2-38. Spatial distribution of wind velocity.

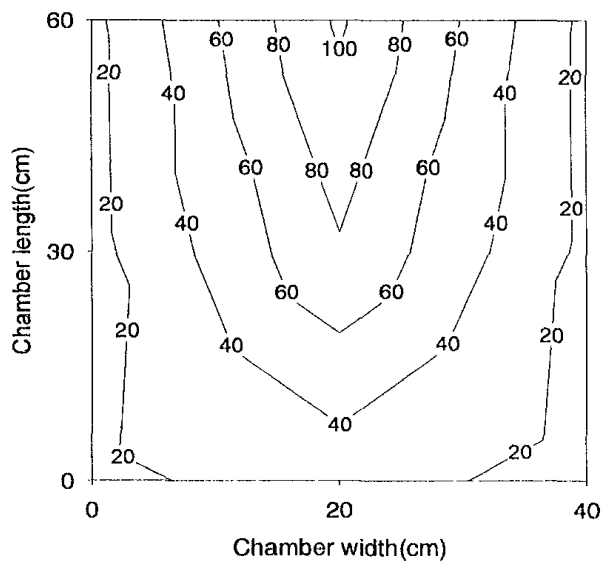


Fig. 2-39. Distribution of wind velocity in the chamber by $4L \cdot \text{min}^{-1}$ flow rate

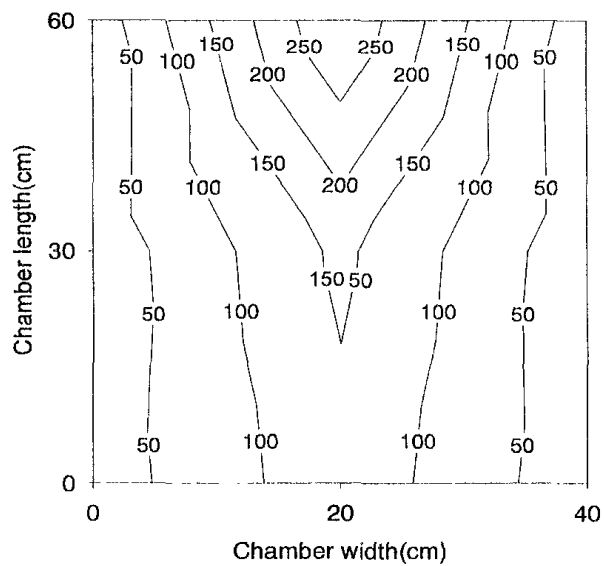


Fig. 2-40. Distribution of wind velocity in the chamber by $8L \cdot \text{min}^{-1}$ flow rate.

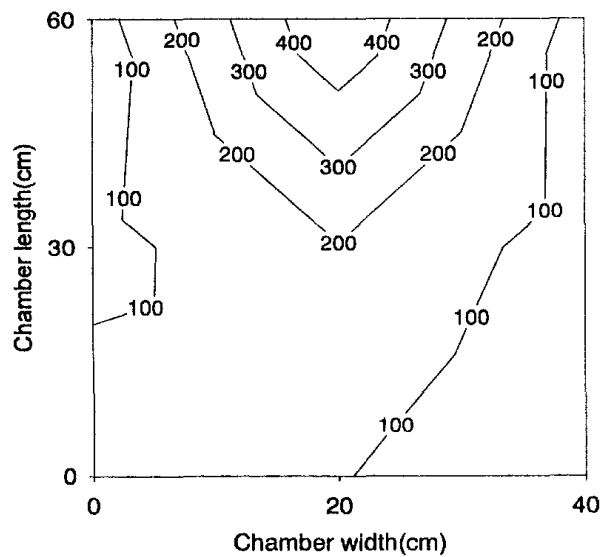


Fig. 2-41. Distribution of wind velocity in the chamber by $15\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ flow rate.

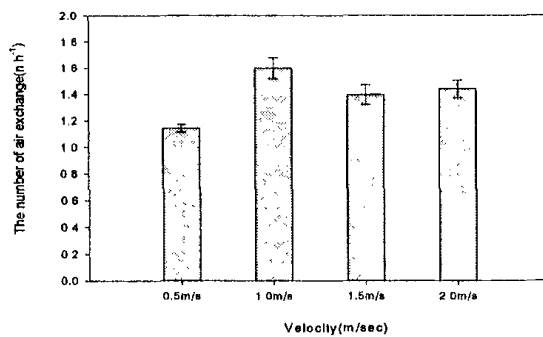


Fig. 2-42. Effect of air velocity on ventilation rate (SUN cap, $D : 10\text{mm}$).

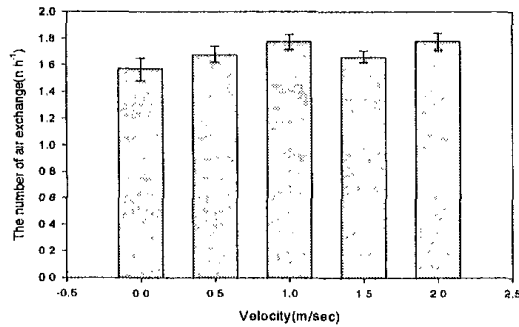


Fig. 2-43. Effects of air velocity on ventilation rate(Milliwrap, D : 10mm).

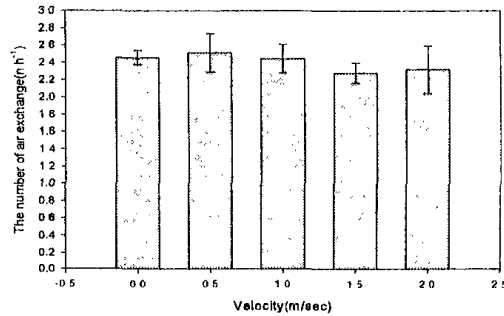


Fig. 2-44. Effects of air velocity on ventilation rate(Milliwrap, D : 20mm).

배양 챔버의 유량 증가에 비례하여 환기횟수가 높아질 것이라고 예상했으나, 유량의 유무만이 환기횟수의 차에 영향을 미쳤다. 유량이 없는 정적 공간일 경우와 유량이 존재하는 동적 공간일 경우 환기횟수는 약 20%의 차이가 발생하였다. 여기서 적용된 용기의 처리는 환기용 필터를 부착한 것과 알루미늄 호일을 사용한 것과의 비교한 것이다.

배양시스템내의 중심에서의 각 유량에 대한 위치별 풍속은 Fig. 2-38과 같고, 배양시스템내의 풍속 분포는 Fig. 2-39, 2-40, 2-41과 같다. 유량이 4L·min⁻¹, 8L·min⁻¹, 15L·min⁻¹으로 증가할수록 내부 풍속이 증가하는 경향을 나타냈고, 특히, 공기가 유입되는 부분을 중심으로 공기 유동이 발달되는 경향을 나타냈다. 유량이 4L·min⁻¹에서는 약 0.2-1.0m·s⁻¹, 8L·min⁻¹에서는 0.5-2.5m·s⁻¹, 15L·min⁻¹에서는

$1.0-4.0\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 분포를 나타냈다. 보다 균일한 환기조건을 위해서 적정 풍속 분포 및 적정 유량의 결정이 필요하다. 필터 면적별 환기 특성의 경우도 CPP, OPP는 면적에 비례하여 환기효율이 증가하지 않았으므로 비효율적이라는 결론을 내릴 수 있다(data not shown).

Milliwrap, SUN cap의 경우 필터 면적이 10mm 일 경우, 풍속이 증가할수록 환기효율이 증가하다가 다시 감소하는 추세를 보여주고 있다(Fig. 2-42). 이는 풍속 증가에 따라 필터 내외간 압력차가 발생하여 미풍에서는 적절한 환기효율 향상을 보여주지만, 강풍이 될수록 압력차가 커져 공기의 교환 균형이 파괴됨에 따라 야기되는 결과라 할 수 있다. 그러나, 필터 면적이 넓어질수록 풍속이 환기효율에 미치는 영향은 상쇄되는 결과를 나타낸다(Fig. 2-43, Fig. 2-44). 필터의 면적이 작을 경우는 풍속을 제공하는 것이 환기효율 향상에 효과를 나타내며 필터의 면적이 클 경우는 풍속을 제공할 필요가 없다고 판단된다.

제4절 조직배양 시스템 내의 환경 요인 분석 및 생육 정량화 연구

1. 서언

관행의 미세증식 기법보다 우수한 묘의 생산을 위해서는 기내 환경 조절이 반드시 요구된다. 이러한 환경 조절을 통하여 묘의 생육을 향상시키기 위해서는 기내 환경과 생육간 관계를 정량화 할 필요가 있으며, 정량화를 위해서는 이용되는 시스템의 환경 조절 특성의 분석이 선행될 필요가 있다. 따라서, 본 연구는 기초 실험인 생육 환경 정량화 실험에 이용할 환경 제어 시스템에 대한 제어 특성을 관찰함에 그 목적을 두고 있다.

2. 재료 및 방법

가. 조직배양 시스템 내의 환경 계측

시스템 구축 후, 시스템내의 환경 제어 특성을 관찰하고자 하였다. 챔버 내 환경이 동일한 조건이라고 가정한다면 챔버 별 광조건에 따라 온도의 차이가 발생할 것이다. 우선, 60, 90, 120, 150, 180 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 광 조건으로 각 챔버를 설정하였을 때 24시간 동안 내부의 온도 변화를 관찰하고자 하였다. 이때의 온도는 25°C로 설정하여 제어하였다. 또한, 챔버 별 건, 습구 온도를 측정할 수 있도록 제작하여, 내부 습도를 측정하였으며 80, 160, 240 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 광 조건 하에서 수행하였다. 이때의 습도는 80%로 설정하여 제어하였다. CO₂의 경우 각 제어 수준 별 24시간 동안의 제어 값을 계측하여 표준편차로 분석하였다. 또한, 각 제어 수준 별 CO₂ 사용량을 분석할 수 있도록 제어 프로그램 내에 관련함수를 추가하였다. 광량의 경우 배양 챔버내 각 제어 수준 별 광분포를 기록하였다. 챔버내 측정위치는 너비 방향으로 2점, 깊이 방향으로 3점씩 설정하였다. 본 시스템에서 CO₂ 제어는 보다 정밀한 제어가 가능하도록 비례제어를 응용하였다. 그러므로, 시스템 제어 반응 시간의 적합성에 대한 분석이 반드시 요구된다. 본 연구에서는 목표치의 63.2% 수준에 도달하는데 소요되는 시간을 의미하는 시정수를 이용하여 반응 특성을 분석하였다. 시정수 결정은 다음 식으로 이루어진다.

$$Y = A(1 - e^{-t/T}) \text{-----} (2-2)$$

단, A: set point, T: time constant, t: time

그러나, CO₂를 기준으로 하였을 때 초기 값은 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 이 아닌 대기중 농도인

350 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 이라 할 수 있다. 그러므로, (2-2)식은 다음 함수로 보정되어야 한다.

$$Y = Y_0 + A(1 - e^{-t/T}) \text{ ----- (2-3)}$$

단, Y_0 : initial point, A: set point, T: time constant, t: time
본 식을 근거로 하여, 시정수를 계산하였다.

나. 환경 요인 별 생육 정량화

자가영양 조건 연구의 경우 생육 단계 별 생육 정량화에 목적을 두었다. 생육 단계를 결정한 후, 본 데이터를 근거로 하여 생육 단계 별 개개의 생육 정량화를 수행하였다. 생육 단계의 구분 기준은 근계 활착기간, exponential phase의 도입부 및 본격적인 exponential phase 등 세단계로 하였으며, 선행 연구를 통하여 각각 6, 7, 7일로 구분하였다. 각 단계 별 환경 처리는 Table 2-8, 2-9에 제시하였다. 생육 단계 결정 실험에 따라 분류된 단계 중 첫 번째 단계는 활착기라 가정할 수 있다. 그러므로, 큰 환경량을 요구하지 않으며 이에 따라 비교적 낮은 처리 조건을 구현하고자 하였다. 환경 처리는 광량의 경우 80, 160, 240 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 이며, CO_2 의 경우 350, 700, 1400 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 로 처리하였다. 초기 하루 동안은 이식 후 스트레스를 최소화하기 위하여 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 PPF로 제어하였고 CO_2 및 RH는 제어하지 않았다. 각 처리 별 반복은 20개체로 하였다. 마디수, 전개엽수, 신초장, 신초직경, 생체중, 건물중, PDM을 측정하였고 첫 번째 단계의 경우 장해 받은 잎의 발생 비율을 별도로 측정하였다.

Table 2-8. Description of environment condition at 1st stage.

Environment Condition	
Vessel	Magenta vessel
Vessel volume(mL)	370
No. of air exchange(h ⁻¹)	6.2
Supporting material	Polyurethane
Medium	MS basal (Macro/Micro elements without vitamin)
PPFD($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	80 160 240
CO ₂ conc. ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$)	350 700 1400
Photoperiod(h)	16/8
Relative humidity(%)	90±3

2번째 및 3번째 단계의 경우 exponential phase에 해당하므로 보다 높은 환경 조건이 요구된다. 그러므로, 첫 번째 단계보다 한 단계 높은 환경 조건이 요구된다. 광량의 경우 80, 160, 240, 320 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 를 CO₂의 경우 700, 1400, 1800 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 로 처리하였다. 본 단계의 처리는 결정된 첫 번째 단계의 최적 조건을 제공한 이후 시작되며, 2번째 및 세 번째 단계는 독립적이 아닌 연속적으로 이루어진다. 초기 하루 동안은 이식 후 스트레스를 최소화하기 위하여 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 PPFD로 제어하였고 CO₂ 및 RH는 제어하지 않았다. 각 단계의 반복수는 10개체이다. 측정항목은 신초 직경, 신초장, 마디수, 전개엽수, 생체중 및 건물중이었다. 그 외 두 번째 및 세 번째 단계 종료시 기내 CO₂농도를 분석하여 NPR을 조사하였다. NPR계산식은 다음과 같다.

$$NPR = \frac{K \cdot E \cdot V \cdot (C_i - C_o)}{N} \text{-----(2-4)}$$

K : conversion coefficient(40.9 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$)

E : number of air exchanges of the vessel(6.2 h⁻¹)

V : volume of air in the vessel(370 m³)

C_o : CO₂ concentration outside the vessel(mol · mol⁻¹)

C_i : CO₂ concentration inside the vessel(mol · mol⁻¹)

N : number of plantlets inside the vessel(4 plantlets)

첫 번째 단계의 경우 활착과 관련된 단계라 가정할 수 있으므로 NPR 측정을 제외하

였다. 기내 CO₂ 분석은 200uL의 기내 샘플을 추출한 후 Gas chromatograph(Hewlett Packard Co Ltd., HP-6890 II)를 이용하여 분석하였다. 본 기기는 FID detector에 methanizer를 부착하여 저농도의 CO₂를 정밀하게 분석할 수 있도록 설정하였다. 샘플 추출은 기내 CO₂ 농도의 변화가 안정화되는 명기 개시 후 4시간 후에 추출하여 곧바로 측정하였다.

Table 2-9. Description of environment conditions at 2nd and 3rd stages.

Environment Condition	
Vessel	Majenta vessel
Vessel volume(ml)	370
No. of air exchange(h ⁻¹)	6.2
Supporting material	Polyurethane
Medium	MS basal
	(Macro/Micro elements without vitamin)
PPFD($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	80 160 240 320
CO ₂ conc. ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$)	700 1400 1800
Photoperiod(h)	16/8
Relative humidity(%)	90±3

다. 환경 및 생육 정보를 이용한 조직배양묘의 생육 모델링

광혼합 및 자가영양 조건하에서의 생육 모델링은 정량화 데이터를 근거로 하여 작성하였다. 광혼합의 경우는 제2절의 Shoot 증식조건에 관련된 자료(Fig. 2-10~2-17, Table 2-4~2-5)의 자료를 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 조직배양 시스템 내의 환경 계측

1) 온도 및 습도

24시간 동안 광량 별 챔버내 온도 변화는 Fig. 2-45A와 같다. 암기에는 광량에 무관하게 일정한 온도로 유지되었던 반면, 명기가 시작되는 오전 6시 이후 급격한 온도의 상승이 발생하여 광조건에 따른 온도 차이가 발생하였다. 그러나, 큰 폭의 차이는 아니며 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 PPFD 외에는 거의 유사한 값을 보여주었다. 이는 환기팬이 광원에서 발생한 복사열을 제거하는데 큰 효과가 있음을 의미한다. 24시간 동안 광량

별 챔버 내 습도 변화는 Fig. 45B와 같다. 암기 와 명기 모두 90%를 상회하는 수준으로 유지되었으며, 광량 별 큰 차이는 발생하지 않았다. 제어치인 80% 보다 다소 높은 습도로 유지된 이유는 챔버 내 환경이 외부와 밀폐되어 있는 반면, 습구 온도 측정시 거즈의 수분이 증발하여 챔버 내부의 수증기압이 증가하였기 때문이라고 판단된다. 그러나, 내부의 상대습도가 일정하게 유지되는 경향을 관찰할 수 있었는데, 이는 챔버의 CO₂ 제어 시기에 내부의 공기를 센서로 송출하면서 순환될 때 수분 제거 경로에 의해 어느 정도 수분이 제거되었으며, 챔버 외부와의 공기교환을 통해 비교적 안정된 습도를 유지할 수 있었다고 생각된다. 또한, 대략 90% 정도의 습도는 기내 식물체 의 생육에 문제가 없는 적합한 수준이라고 생각된다. 본 결과를 종합적으로 판단하였을 때, 광량에 따른 온도 및 습도는 매우 안정적이었으며, 광 및 CO₂에 대한 정량화 조건을 충분히 만족시킬 수 있었다.

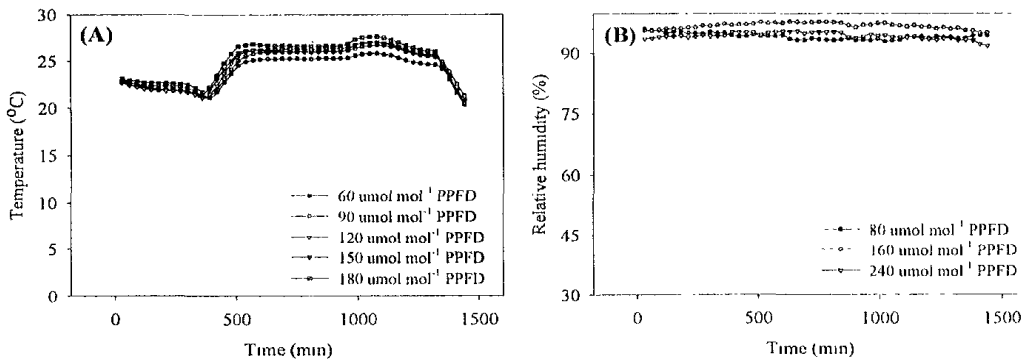


Fig. 2-45. Time courses of temperature (A) and relative humidity (B) inside the acrylic chamber.

2) 이산화탄소 및 PPFD

700, 1000, 1400, 1800 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 의 CO₂ 수준으로 제어하였을 때 CO₂ 반응 특성은 Fig. 2-46과 같다. 모든 CO₂ 설정치에서, 초기에는 신속히 상승하며 목표치 부근에서는 완만하게 증가하는 전형적인 비례제어 특성을 보여주었다. 본 데이터를 근거로 시정수를 분석하였다(Table 2-10). 각 CO₂ 수준 별 시정수는 최소 13분에서 최대 27분 까지 다양하게 측정되었다. 이는 본 시스템의 CO₂ 제어 구간이 3단계로 적기 때문에 제어 설정치에 따라 시정수가 달라진다고 분석할 수 있으며, 그 외 하나의 센서로 다수의 챔버를 순차적으로 제어함에도 원인이 있다고 할 수 있다. 그러나, 본 시스템에

서 보여준 최대 27분 가량의 시정수는 비록 신속한 반응은 아니지만 대부분의 배양기간이 목표치 수준에서 CO₂ 농도를 유지하고 있음을 감안하였을 때 충분한 반응시간이라고 할 수 있다.

CO₂ 및 PPFD의 제어 특성은 Table 2-11에 제시하였다. CO₂ 농도의 경우, 목표치에 도달한 후 제어 시기를 임의로 선택하여 이때의 제어 편차를 분석하였다. 모든 CO₂ 수준에서 최대 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ CO₂ 가량의 오차를 보여주었으며, 매우 안정된 수준으로 유지되었다. 그 외 챔버 내 PPFD 분포 또한 최대 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD 가량의 오차로 매우 균일한 제어가 가능하였다. 본 결과를 종합적으로 판단하였을 때, 생육과 환경간 관계 정량화에 있어 본 시스템의 응용이 적합함을 알 수 있었다.

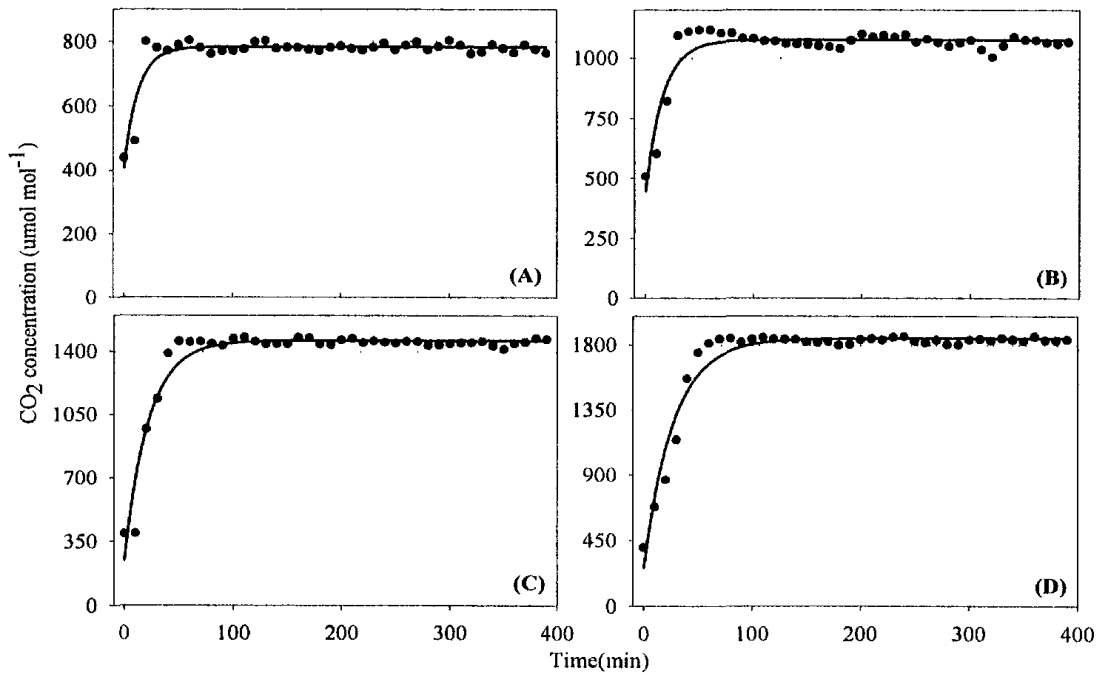


Fig. 2-46. Response characteristics of CO₂ in the system under 700, 1000, 1400, and 1800 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$. (A), (B), (C), and (D) mean response curves under 700, 1000, 1400, and 1800 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ CO₂, respectively.

Table 2-10. Coefficients of the equation expressed by negative exponential.

CO ₂ set point ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$)	C ₀	C _A	T	R ²
700	408.245	374.852	12.920	0.844
1000	447.603	627.265	16.103	0.875
1400	247.821	1212.151	22.075	0.934
1800	268.141	1578.0309	27.473	0.956

C₀, C_A, and T: coefficients of the equation, $C = C_0 + C_A(1 - e^{-t/T})$.

Table 2-11. Controlled characteristics in micropropagation system.

Environment factors						
CO ₂ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$)	Set point	350	700	1000	1400	1800
	Controlled	374 ± 32 ^z	782 ± 28	1065 ± 39	1445 ± 42	1820 ± 62
PPFD ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Set point	80	160	240	320	
	Controlled	78 ± 3.7	160 ± 4.5	242 ± 9.4	329 ± 27	

^z Mean ± SD.

^y Not collected.

나. 환경 요인 별 생육 정량화

1) 생육단계 I

첫 번째 단계의 경우, 마디수, 전개엽수, 신초장, 신초직경, 생체중, 건물중, PDM 등이 측정되었다(Fig. 2-47). 마디수, 신초장, 신초직경 등은 CO₂ 및 PPFD 처리에 따라 전반적으로 유의적인 차이가 없었으나, 신초장의 경우 CO₂ 및 PPFD가 증가함에 따라 감소하는 경향을, 신초직경은 점차 증가하는 경향을 보여주었다(Fig. 2-47A, B, C). 생체중과 건물중의 경우 CO₂ 및 PPFD 처리에 더 큰 영향을 받았음을 알 수 있다(Fig. 2-47D, E). 그러나, 낮은 CO₂ 수준에서는 생체중과 건물중이 광량에 영향을 받지 않았던 반면, 높은 CO₂ 수준으로 갈수록 광량에 더 큰 영향을 받고 있는 것으로 관찰되었다.

전반적으로 CO₂ 및 PPFD 처리 수준에 따라 생육이 향상되는 경향은 무시할 수 있는 수준이었으며, 본 단계가 활착기라 가정한다면, 환경 처리에 의한 다소의 생육 향상 보다는 스트레스를 받지 않고 신속히 활착, 적응하는 것이 더욱 중요하다고 할 수 있다. 장애엽 발생율의 경우 광량이 증가함에 따라 현저히 증가하였으며, 80 μmol · m⁻²s⁻¹의 광처리에서는 어떠한 CO₂ 처리에서도 장애엽이 발생하지 않았다(Fig. 2-47F). 따라서 스트레스를 야기하지 않았던 80 μmol · m⁻²s⁻¹의 PPFD와 350 μmol · mol⁻¹의 CO₂ 처리가 본 단계에서 적합하다고 생각되었다.

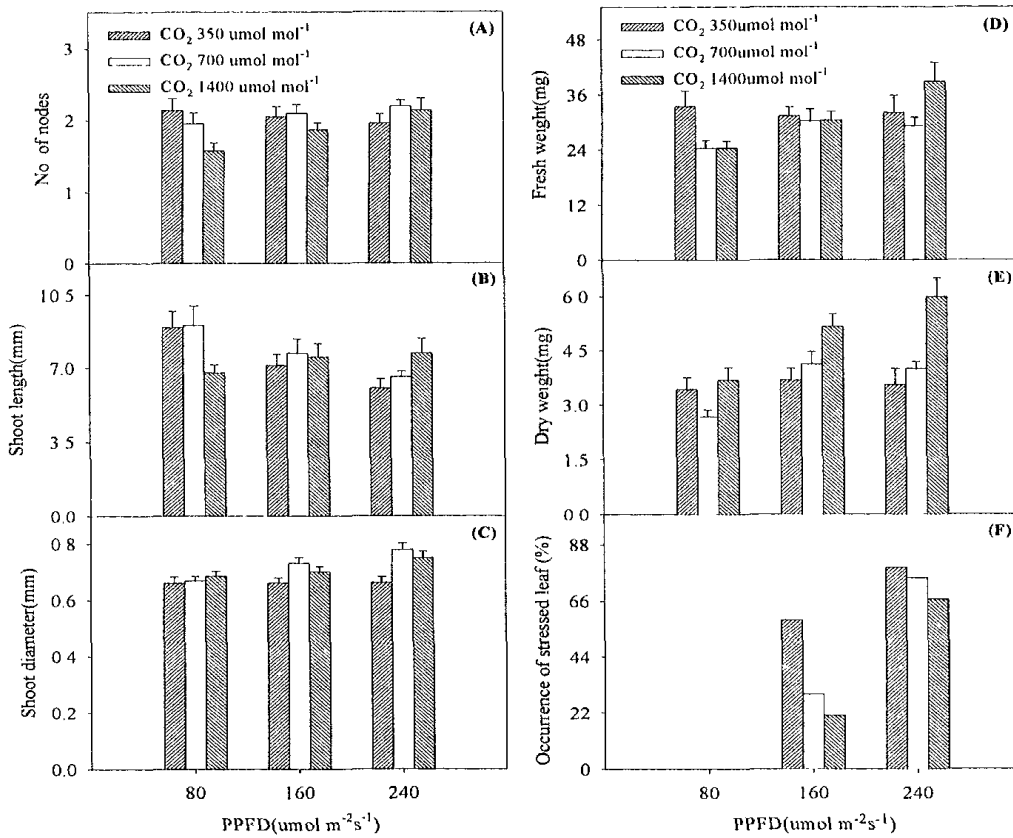


Fig. 2-47. Effects of PPFD and CO₂ concentration on number of nodes(A), shoot length(B), shoot diameter(C), fresh weight(D), dry weights(E), and occurrence of stressed leaf(F) at 1st stage.

2) 생육단계 II

2번째 단계의 경우, 마디수, 전개엽수, 초장, 직경, 생체중 및 건물중이 기록되었다(Table 2-12). 본 데이터를 근거로 판단하였을 때 $700 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 이하의 CO_2 처리에서는 광량에 따라 마디수, 초장 및 신초직경이 광량에 따라 유의적인 차이가 없었으며, 생체중과 건물중은 광량이 증가함에 따라 다소 향상되는 경향을 나타내었다. $1400, 1800 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 의 CO_2 처리에서 또한 유사한 경향을 보여주었다. 건물중과 생체중의 비율인 PDM(%)은 CO_2 와 PPFD가 증가함에 따라 향상되었다(Fig. 2-48A). 그러나, 160 부터 $320 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 까지의 PPFD 처리간에는 유의적인 차이가 없었다. 상대생장률은 일정시간 동안 각 개체 혹은 군락의 건물중 증가율을 표현하기 때문에 생육특성을 파악하는데 매우 중요한 요인이다.

2번째 단계에서의 각 처리간 RGR은 Fig. 2-48B와 같다. RGR의 경우 $240 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD 처리 이상에서 CO_2 처리가 높아질수록 점차 증가하였다. 또한, 80 과 $160 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD 처리간 RGR은 유의적인 차이가 존재하였지만, 그 이상부터는 유의적인 차이가 없었다. 따라서 두 번째 단계에서는 $160 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD 처리 이상의 광조건은 불필요하다고 판단된다. 두 번째 단계에서의 순광합성율(NPR)은 Fig. 2-49에 제시하였다. NPR 또한 모든 처리간 명확한 경향은 관찰되지 않았다. 그러나, CO_2 및 PPFD 수준이 높아짐에 따라 다소 증가하는 경향을 보여주었다.

Table 2-12. Growth characteristics under different PPFD and CO₂ conditions at 2nd stage.

Treatment		No. of	No. of	Shoot	Shoot	Fresh weight	Dry weight
CO ₂	PPFD	nodes	unfolded leaves	height (mm)	diameter (mm)	(mg/plantlet)	(mg/plantlet)
700	80	4.14	3.07	38.30	1.05	110.49	9.41
	160	4.31	4.50	42.57	1.09	134.14	12.09
	240	4.07	4.87	37.25	1.03	104.50	10.21
	320	3.77	4.15	39.81	1.05	142.41	13.97
1400	80	4.17	4.67	45.79	1.01	119.79	10.25
	160	3.70	4.50	38.75	1.05	108.79	11.55
	240	4.00	5.45	39.17	1.08	127.47	12.76
	320	3.63	4.18	35.08	1.04	122.56	13.86
1800	80	4.00	4.25	47.53	1.09	107.14	8.79
	160	4.23	5.15	40.31	1.17	143.84	13.55
	240	4.14	4.93	38.50	1.13	145.49	15.26
	320	3.82	4.63	32.49	1.11	141.95	16.21
	CO ₂	NS	*	NS	*	NS	*
	PPFD	NS	**	*	NS	NS	***
	CO ₂ × PPFD	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS, *, **, *** Nonsignificant or significant at P=0.05, 0.01 or 0.001, respectively.

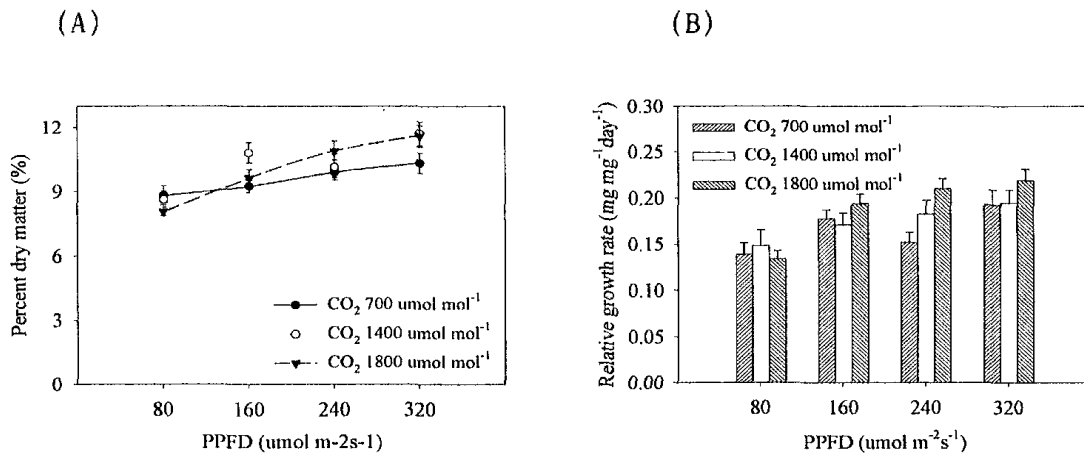


Fig. 2-48. Effects of PPFD and CO₂ concentration on percent dry matter(A) and relative growth rate(B) at 2nd stage.

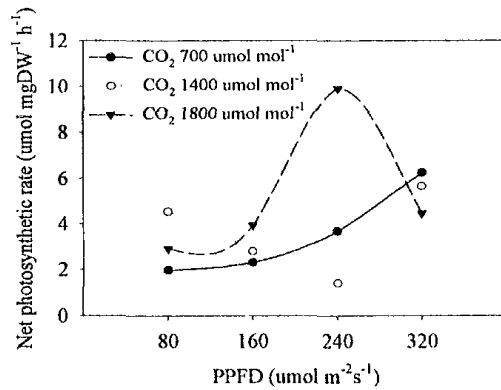


Fig. 2-49. Effects of PPFD and CO₂ on net photosynthetic rate at 2nd stage.

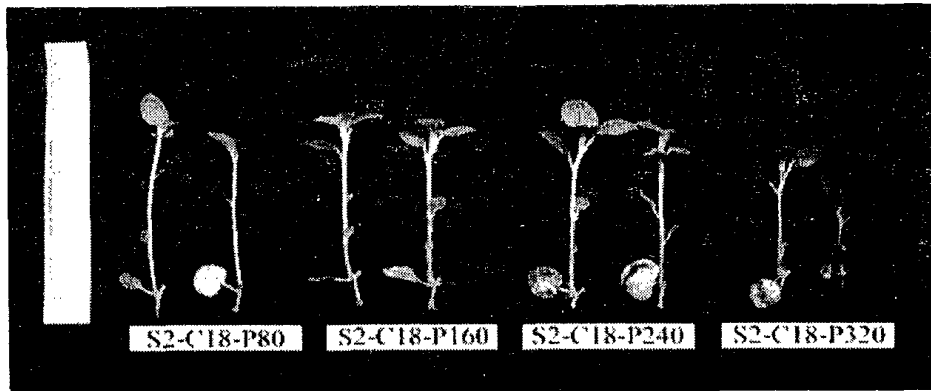
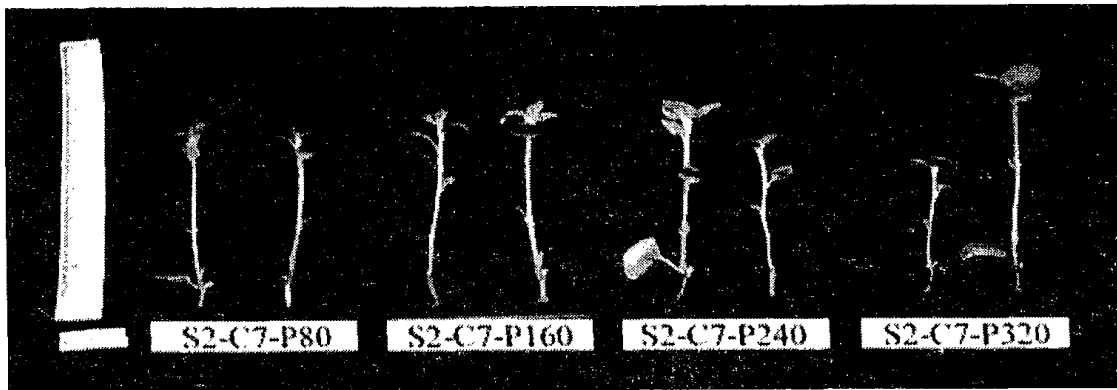


Fig. 2-50. Plantlets cultured during 2nd stage. Treatment code S2, C14, and P80 represent 2nd stage, $1400 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1} \text{CO}_2$, and $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPFD, respectively.

3) 생육단계 III

세 번째 단계의 경우 CO₂와 PPFD 처리에 따라 유의적인 차이로 생육이 향상되었으며, 두 번째 단계와는 상반된 결과를 보여주었다(Table 2-13). 특히 CO₂ 보다는 광량에 의해 생육이 보다 향상되었으며 이는 본 단계에서의 광조건이 묘 소질을 결정하는데 매우 중요함을 의미한다. 또한, 한 단계 높은 CO₂ 처리에 의해 한 단계 낮은 광처리가 충분히 보상될 수 있음을 관찰할 수 있었다. PDM(%) 또한 CO₂ 처리에는 유의적인 차이가 없었으나 광량이 증가함에 따라 유의적인 차이로 향상되는 경향을 보여주었다(Fig. 2-52A). 그러나, 세번째 단계보다는 두번째 단계에서 보다 높은 PDM을 나타내었으며(Fig. 2-48A, 2-52A), 이는 생체중의 증가율이 건물중보다 높기 때문이다. 세번째 단계에서의 RGR의 경우 두 번째 단계와는 다른 경향을 보여주었다(Fig. 2-51A).

전반적으로 CO₂ 및 광조건이 향상됨에 따라 큰 차이로 RGR이 향상되었으나, 낮은 CO₂ 및 광조건으로 갈수록 두 번째 단계에서 보다 낮은 RGR을 나타내었다. 이러한 경향은 두 번째 및 세 번째 단계간 RGR 차를 관찰하였을 때 보다 명확해진다(Fig. 2-51B). 만약 환경 조건이 기내 소식물체의 생육에 충분하다면, 상대 생장율은 임의 두 시기간 동일하거나 다소 향상된 수치를 보여야만 한다. 두번째 및 세번째 단계간 상대생장율 차이는 $160 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPFD 이하에서 음의 값을 나타낸 반면, $240 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 이상에서는 모든 CO₂ 처리에서 양의 값을 나타내었다. 음의 RGR 차는 exponential phase인 세 번째 단계에서의 환경 조건으로는 부적합함을 의미한다.

따라서, $240 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 이상의 광량이 본단계의 환경조건으로 적합하다고 생각되었다. NPR 또한 CO₂ 및 광조건이 향상됨에 따라 유의적인 차이로 증가하였으며 $240 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 광처리에서 포화되었다(Fig. 2-52B). 또한 $1400 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 보다 $1800 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ CO₂ 처리에서 상당한 NPR 향상이 관찰되었으며 CO₂ 또한 큰 영향을 미친 것으로 판단된다. 본 결과를 근거로 판단하였을 때, $240 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 혹은 그 이상의 PPFD 및 $1800 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 의 CO₂가 3번째 단계에서의 생육 극대화에 적합한 조건이라고 판단되었다.

지금까지의 결과를 종합하여 생육 단계별 마디수, 전개엽수, 생체중 및 건물중의 변화를 분석해 보았다(Fig. 2-53A, B, C, D). 생체중 및 건물중의 경우 두 번째 단계에서는 환경처리간 생육에 차이가 관찰되지 않았으나, 세 번째 단계에서는 광 및 CO₂ 수준이 증가함에 따라 상당히 큰 폭의 생체중 및 건물중 향상을 관찰할 수 있었다

(Fig. 2-53C,D). 마디수 및 전개엽수에서도 유사한 경향을 보여주었다(Fig. 2-53A,B). 본 데이터를 근거로 하여 두 번째 단계에서는 필요없는 환경 조건은 과감히 제거하되 세 번째 단계에서는 환경 조건을 향상시킴에 따라 환경 조건에 따라 큰 폭의 생육 향상을 기대할 수 있다는 가정을 세울 수 있게 된다. 소질이 우수한 소식 물체를 생육 초기에는 낮은 환경 조건, 생육 후기에는 집약적인 환경 조건으로 단계 별 환경 조절을 통하여 낮은 에너지 투입으로 효과적으로 획득할 수 있을 것으로 판단된다. 최적환경을 도출하기 위해서는 엄청나게 많은 조합의 실험을 통하지 않으면 불가능하다. 본 연구에서는 환경과 생육 정량화를 통하여 단계 별 어느 정도의 적정 조건을 도출하였다. 제한된 조합 실험자료를 이용하여 최적조건을 구명하기 위해서는 생육모델에 의한 방법이 필요하다.

Table 2-13. Growth characteristics under different PPFD and CO₂ conditions at 3rd stage.

Treatment		No. of	No. of	Shoot	Shoot	Fresh weight	Dry weight
CO ₂	PPFD	nodes	unfolded leaves	height (mm)	diameter (mm)	(mg/plantlet)	(mg/plantlet)
700	80	5.78	7.00	73.18	1.31	203.44	16.10
	160	6.31	8.38	83.17	1.65	477.82	40.39
	240	7.00	9.53	76.37	1.68	485.83	44.61
	320	8.00	10.67	77.15	1.74	586.62	53.85
1400	80	5.25	6.25	81.81	1.35	261.19	19.32
	160	5.62	7.69	68.28	1.59	398.69	35.28
	240	7.11	9.78	80.12	1.79	625.80	56.91
	320	5.88	12.38	72.32	1.96	801.91	75.76
1800	80	5.79	6.57	76.51	1.31	233.35	18.49
	160	5.69	9.25	74.71	1.70	589.24	49.99
	240	6.54	10.92	75.13	1.98	782.46	71.53
	320	6.20	11.40	69.94	2.05	889.11	87.19
	CO ₂	***	NS	NS	*	**	**
	PPFD	***	***	NS	***	***	***
	CO ₂ × PPFD	NS	NS	NS	*	*	**

NS, *, **, *** Nonsignificant or significant at P=0.05, 0.01 or 0.001, respectively.

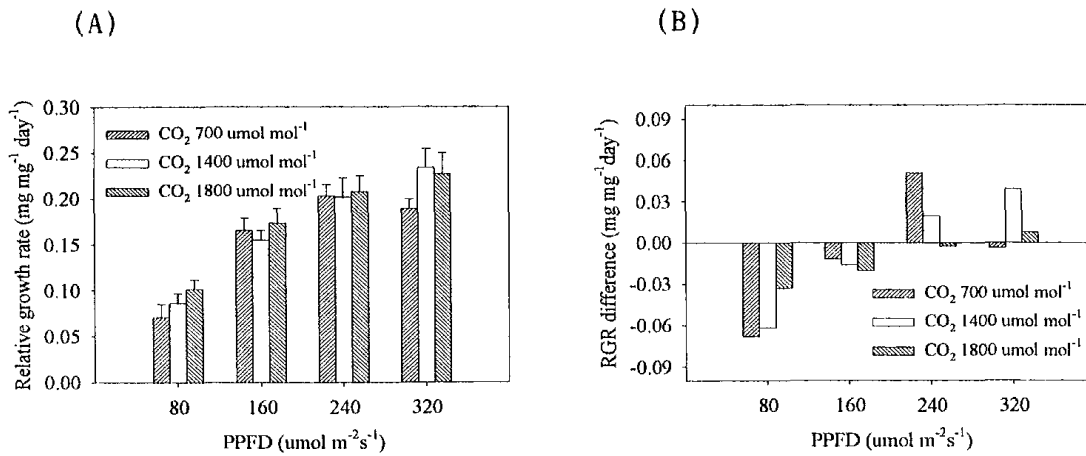


Fig. 2-51. Relative growth rate (A) and relative growth rate difference between 3rd stage and 2nd stage (B) in all the treatments.

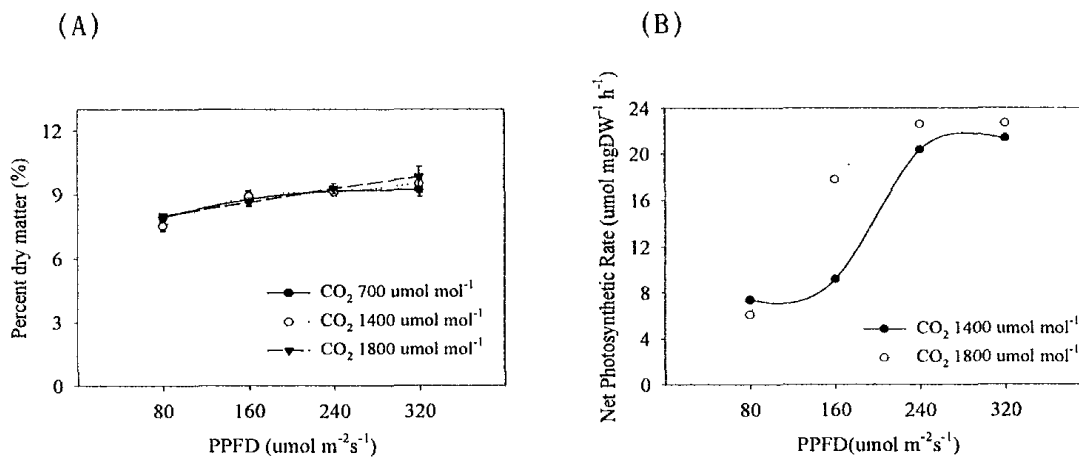


Fig. 2-52. Effects of PPFD and CO₂ concentration on percent dry matter (A) and net photosynthetic rate (B) at 3rd stage.

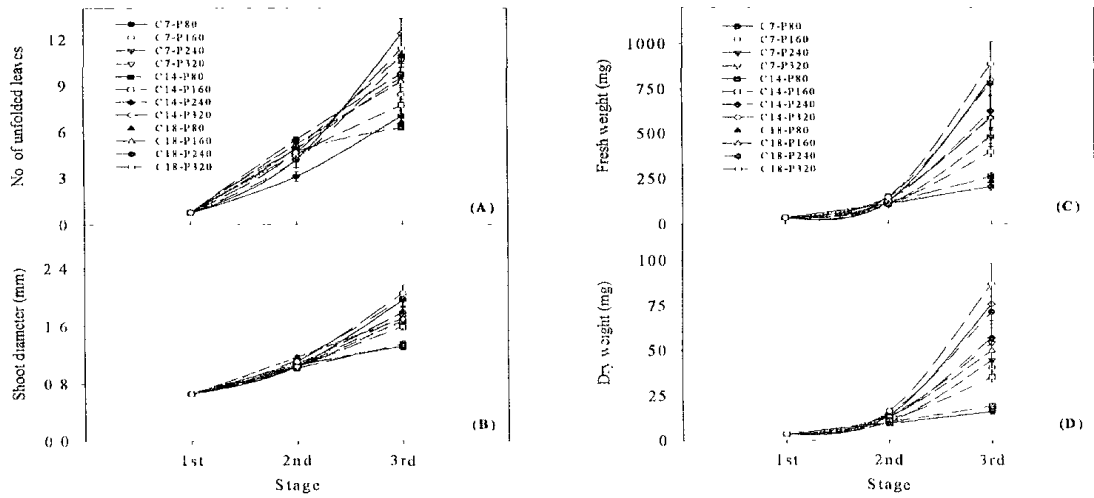


Fig. 2-53. Time courses of number of unfolded leaves (A), shoot diameter (B), fresh weight (C), and dry weight (D) of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Dejima) plantlets in all the treatments. Treatments at stage 1 are $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPFD and ambient CO_2 concentration. Error bars represent mean \pm SE. Treatment code C7, C14 and P80 represent 700 and $1400 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1} \text{CO}_2$, and $80 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ PPFD, respectively.

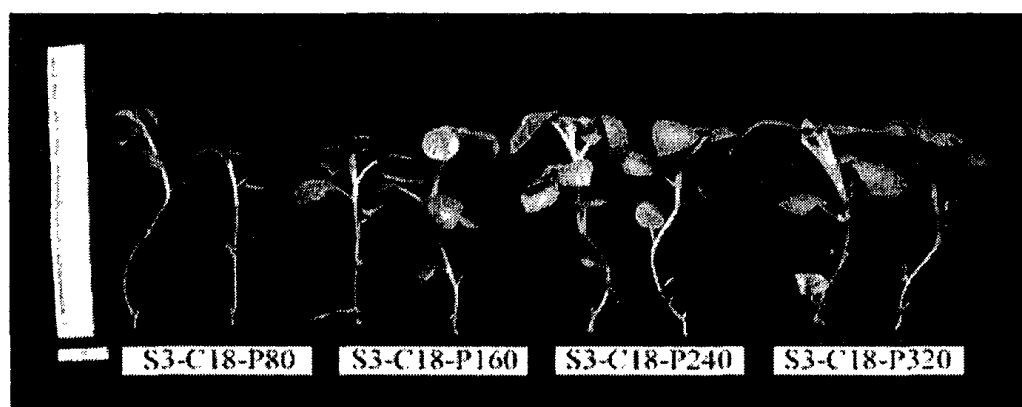
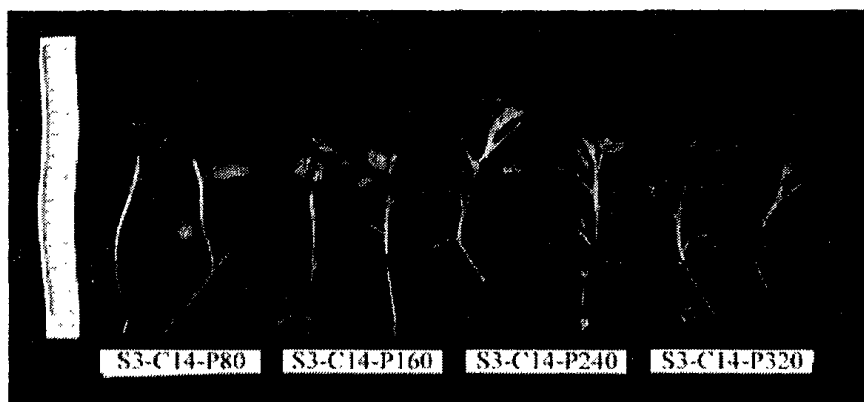
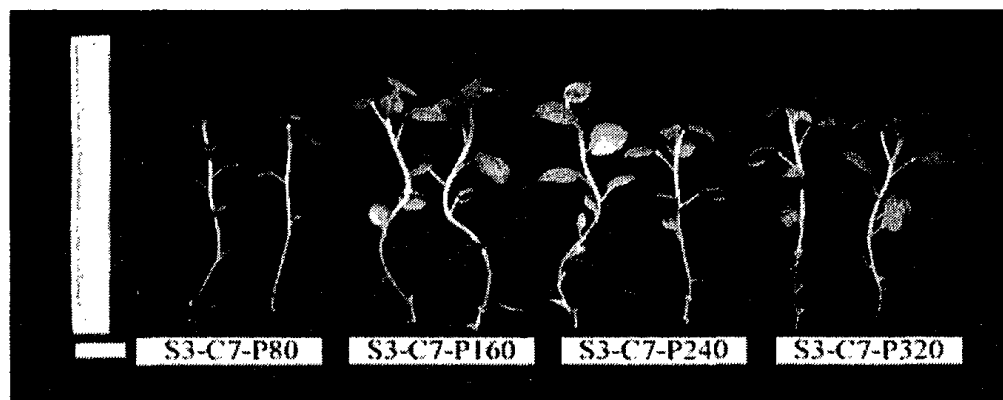


Fig. 2-54. Plantlets cultured during 3rd stage. Treatment code S3, C14, and P80 represent 3rd stage, $1400 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1} \text{CO}_2$, and $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPFD, respectively.

다. 환경 및 생육 정보를 이용한 조직배양묘의 생육 모델링

1) 혼합영양조건 생육 모델링

대지, 수미 두 품종 모두 각 환경요인(당농도, 환기율, PPF)과 생육(초장, 마디 수, 줄기 직경)간 상관관계가 높지 않았다. 이는 우선 표본의 양이 많지 않음에 기인하며, 상기 환경 요인 외에 다른 환경 요인이 작용한다고 분석할 수 있다. 각 환경 요인 별 생육과의 상관관계는 다음과 같다.

Table 2-14. Correlation between environment factors and growth of *Solanum tuberosum* L. cv. Superior.

		Shoot height	Shoot diameter	No. of nodes
Sucrose	R	-0.2104	0.1420	-0.0258
	Correlation coefficient	0.1232	0.3007	0.8520
Ventilation	R	-0.1782	0.5688	0.0086
	Correlation coefficient	0.1929	0.0001	0.9505
PPFD	R	-0.3338	-0.0308	-0.0020
	Correlation coefficient	0.0127	0.8236	0.9885

Table 2-15. Correlation between environment factors and growth of *Solanum tuberosum* L. cv. Dejima.

		Shoot height	Shoot diameter	No. of nodes
Sucrose	R	0.0533	-0.0841	-0.1559
	Correlation coefficient	0.6965	0.5379	0.2513
Ventilation	R	0.1132	0.0783	0.0880
	Correlation coefficient	0.4098	0.5663	0.5191
PPFD	R	0.0967	0.2003	0.1660
	Correlation coefficient	0.4785	0.1387	0.2215

이상의 데이터에서 관찰할 수 있듯이, 적정수준 이상의 상관계수와 결정계수 모두를 만족시키는 결과는 나타나지 않았다. 표본의 양을 증대시키고 세부 환경 요인을 추가하여 세부적인 실험이 필요하다. 정량화 데이터에 근거한 모델링 결과는 다음과 같다.

Table 2-16. Models expressed with sucrose concentration, ventilation rate, and PPFD (*Solanum tuberosum* L. cv. Superior).

Growth characteristics	Equation
Shoot height	$Y_1 = -0.774446X_1 - 0.828735X_2 - 0.020881X_3 + 12.837$
No. of nodes	$Y_2 = -0.040962X_1 + 0.023477X_2 - 0.000098421X_3 + 8.639796$
Shoot diameter	$Y_3 = 0.036527X_1 + 0.284055X_2 - 0.000232X_3 + 0.933407$
X_1 : Sucrose(%), X_2 : Ventilation(ventilated - 1, closed - 0), X_3 : PPFD($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) Y_1 : Shoot height, Y_2 : Number of nodes, Y_3 : Shoot diameter	

Table 2-17. Models expressed with sucrose concentration, ventilation rate, and PPFD (*Solanum tuberosum* L. cv. Dejima).

Growth characteristics	Equation
Shoot height	$Y_1 = 0.136834X_1 + 0.435140X_2 + 0.004194X_3 + 5.863739$
No. of nodes	$Y_2 = -0.251094X_1 + 0.179644X_2 + 0.004766X_3 + 7.980081$
Shoot diameter	$Y_3 = -0.119732X_1 + 0.135408X_2 + 0.004719X_3 + 0.859412$
X_1 : Sucrose(%), X_2 : Ventilation(ventilated - 1, closed - 0), X_3 : PPFD($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) Y_1 : Shoot height, Y_2 : Number of nodes, Y_3 : Shoot diameter	

2) 자가영양조건 생육 모델링

가) 생육단계 II

두번째 단계에서의 환경 처리에 의한 건물중 변화에 대하여 시뮬레이션을 시도하였다(Fig. 2-55). 기본 함수로는 negative exponential 형태의 함수를 이용하였으며, 본 함수는 rectangular hyperbola 형태의 함수보다 낮은 수준의 환경 조건에서 보다 적합하다고 알려져 있다. PPF_D 보상점(I_c)은 문헌을 근거로 작성하였다(Nobel, 1991; Nobel et al., 1993; Niu et al., 1997). 정량화 데이터를 근거로 하여 각 환경 조건 별 모델을 구축하였다(Table 2-18). 낮은 CO₂ 농도에서는 구축된 모델의 상관계수가 비교적 낮은 편이었으며, 이는 생육 데이터의 오차에 기인하였다고 판단된다. 구축된 모델을 근거로 판단하였을 때, CO₂ 및 PPF_D의 향상이 건물중 향상에 영향에 큰 영향을 미치며 광량의 경우 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 가량에서 포화됨을, CO₂의 경우 700과 1400 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 처리간에는 건물중 차이가 거의 없는 반면 1800 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 의 CO₂ 처리에서는 광 포화점이 다소 상향되며 건물중 또한 보다 향상됨을 관찰할 수 있었다. 그러나, 1800 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 의 CO₂ 처리는 필요이상의 환경 조건이며 다소의 생육향상은 존재하나 다음 단계에서의 환경 조건에 따라 충분히 회복 가능하다. 더욱이, 두 번째 단계에서 적정한 광조건으로 판단되는 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 경우 모든 CO₂ 조건에서 건물중의 차이가 거의 없었다. 그러므로, 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 PPF_D와 700 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 의 CO₂ 처리가 적합할 것으로 생각되었다.

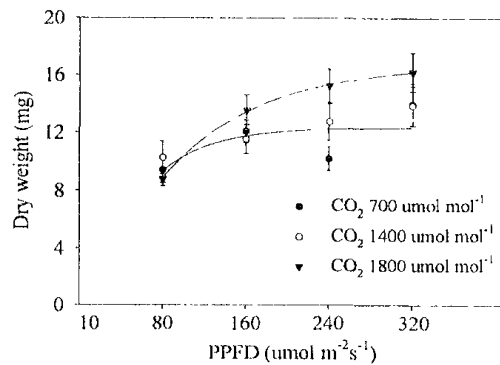


Fig. 2-55. Simulated and measured dry weight of the potato plantlet at 2nd stage. Error bars represent mean \pm standard error.

Table 2-18. Estimated values of parameters of the P_d model for in vitro potato plantlets on 13th day.

Parameter	Unit	Value		
		700	1400	1800
P_{\max}^2	mg	12.352	13.107	16.793
b	$\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{m}^2 \text{s}^{-1} \text{mg}$	0.250	0.261	0.180
I_c	$\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$		10^y	
R^2		0.445	0.778	0.999

² Coefficients in the following equation: $P_d = P_{\max} (1 - e^{-\frac{b}{P_{\max}}(x - I_c)})$.

^y Obtained from the literature (Nobel, 1991; Nobel et al., 1993; Niu et al., 1997)

나) 생육단계 III

본 단계에서도 보다 명확한 구분 기준을 마련하기 위해 건물중 변화 시뮬레이션을 시도하였다(Fig. 2-56A,B). 기본 함수로는 두 번째 단계와 마찬가지로 negative exponential 형태의 함수를 이용하였다. 또한 정량화 데이터를 근거로 한 모델 구축 결과는 Table 2-19, 2-20과 같다. 본 모델을 근거로 판단하였을 때, CO₂ 수준이 향상됨에 따라 광량 증가에 의한 건물중 향상폭이 더욱 커지고 있음을 알 수 있다(Fig. 2-56A). 광포화점은 700 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 보다 1400 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 의 CO₂ 처리에서 보다 높았으며 이는 기내의 낮은 CO₂ 농도가 광합성을 억제함에 기인된다고 할 수 있다. 반대로 광량이 높아야지만 CO₂ 처리에 의한 건물중 향상을 기대할 수 있다(Fig. 2-56B). 따라서, 광 및 CO₂ 수준의 균형있는 향상이 기내 소식물체의 생육 촉진에 유리함을 알 수 있다. 또한, 본 단계에서는 무엇보다 생육을 극대화하는 것이 중요하다. 감자 소식물체는 CO₂ 농도가 높다고 가정하였을 때 높은 PPFD 조건 일수록 생육을 향상시킬 수 있는 잠재력이 많다고 할 수 있다. 그러나, 인공광하에서 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 이상의 PPFD를 구현하는 것은 어려우며 비용 또한 광량이 증가할수록 기하급수적으로 증가한다. 본 연구에서는 대략 320 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광조건이 적합하다고 생각되었다. 광량이 증가할수록 CO₂ 향상에 의한 건물중 증가가 현저하였으며, 광에 대한 모델과 종합적으로 판단하였을 때, 광량에 의한 건물중 향상을 기대하려면 CO₂ 조건 또한 높아야 한다. 240 혹은 320 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 PPFD에서는 2000-2200 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 의 CO₂ 처

리에서 포화되는 경향을 보여주었다. 본 결과를 종합적으로 판단하였을 때, $320 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 PPFD와 $1800 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 의 CO_2 처리가 적합하다고 생각되었다.

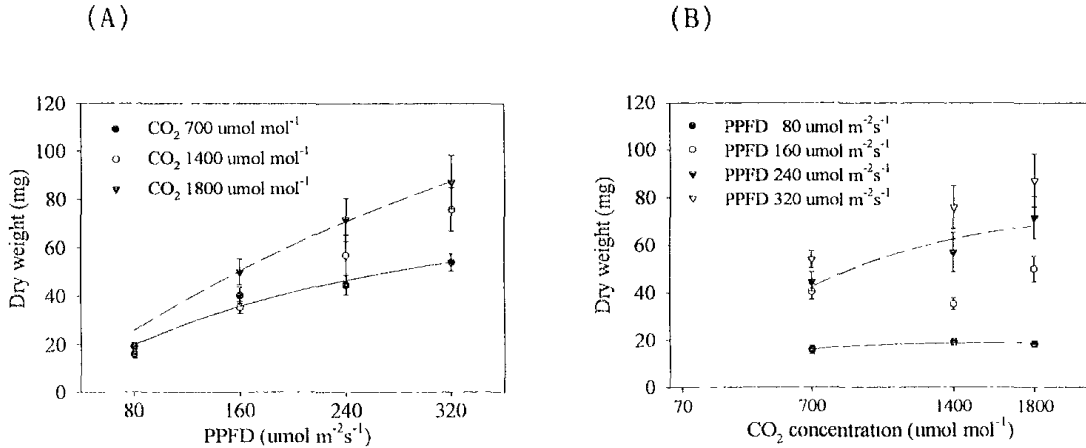


Fig. 2-56. Simulated and measured dry weight of the potato plantlets affected by PPFD (A) and CO_2 concentration (B) at 3rd stage. Error bars represent mean \pm SE.

Table 2-19. Estimated values of parameters of the P_d model affected by PPFD for in vitro potato plantlets on 20th day.

Parameter	Unit	Value		
		700	1400	1800
P_{\max}^z	mg	69.319	- ^y	165.604
b	$\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{m}^z \cdot \text{s} \text{ mg}$	0.333	-	0.397
I_c	$\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-z} \cdot \text{s}^{-1}$		10^x	
R^z		0.949	-	0.995

^z Coefficients in the following equation: $P_d = P_{\max} \left(1 - e^{-\frac{b}{P_{\max}}(x - I_c)}\right)$.

^y Regression analysis were not done.

^x Obtained from the literature (Nobel, 1991; Nobel et al., 1993; Niu et al., 1997)

Table 2-20. Estimated values of parameters of the P_d model affected by CO_2 concentration for in vitro potato plantlets on 20th day.

Parameter	Unit	Value			
		80	160	240	320
P_{max}^z	mg	19.088	- ^y	76.110	96.495
b	$\mu mol^{-1} \cdot mol \text{ mg}$	0.057	-	0.099	0.125
C_c	$\mu mol \cdot mol^{-1}$			70 ^x	
R^z		0.895	-	0.867	0.981

^z Coefficients in the following equation: $P_d = P_{max} (1 - e^{-\frac{b}{P_{max}}(x - C_c)})$.

^y Regression analysis was not done.

^x Obtained from the literature (Nobel, 1991; Nobel et al., 1993; Niu et al., 1997)

제 5 절 조직배양묘의 기내 최적 환경 구명 및 환경제어시스템의 적용성

1. 서언

감자 무균묘의 대량 생산은 건전 종서의 생산에 있어 반드시 요구된다. 본 연구는 무균묘의 대량 생산에 있어 요구되는 환경 조절 기법 및 체계를 개발함에 그 목적을 두고 있으며, 따라서 선행 연구를 통하여 얻은 단계별 적정 환경 조건에 대한 정량화 결과를 실증하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

본 실험에서는 단계 별 최적 조건이 에너지 절약에 효과가 있는지에 대한 에너지 효율 측면과 각 단계 별 환경 처리에 있어 큰 차이가 없는 경우, 최적의 환경 처리가 우수한 건전묘의 생산에 적합할 것인지에 대한 생리적인 측면 등 2가지 측면에 중점을 두었다. 따라서 각 단계별 적정 환경을 제공한 처리와 이에 동일한 적산량을 지니는 일정한 환경처리, 최대 환경을 제공한 처리 등을 비교하고자 하였다. 또한, 관행의 광혼합영양 미세증식 체계를 대조구로 설정하였으며, 기내 생육 뿐 아니라 기외 생육에 대한 영향 또한 관찰하고자 하였다. 각 처리 별 반복수는 32개체이며, 이중 16개체는 기내 생육 측정에, 나머지 16개체는 기외로 이식하여 생육량을 관찰하고자 하였다. 측정항목은 기내 생육의 경우 미세증식 20일 후 마디수, 전개엽수, 신초장, 신초직경, 생체중, 건물중, Fv/Fm 등을 측정하였으며, 기외 생육의 경우 기외 이식 후 15일째 및 22일째 마디수, 전개엽수, 신초장, 신초직경 등과 22일째의 경우 건물중을 추가로 측정하였다. 본 실험의 기내 처리 조건은 선행 연구의 단계별 정량화 데이터에 근거하여 다음과 같이 결정하였다(Table 2-21).

Table 2-21. Description of treatments for growth evaluation.

Treatment Environmrnt factors			
		stage	
POG ^z	PPFD($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	1st	80
		2nd	160
		3rd	320
	CO ₂ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$)	1st	350
		2nd	700
		3rd	1800
PCA	PPFD($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	191	
	CO ₂ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$)	1020	
PCM	PPFD($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	320	
	CO ₂ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$)	1800	
PMC	PPFD($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	80	
	CO ₂ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$)	350	

^zPOG : Photoautotrophically optimal condition with growth stages

PCA : Photoautotrophically constant condition equal to Accumulated optimal condition

PCM : PHotoautotrophically constant condition equal to Maximum condition

PMC : Photomixotrophically conventional condition(with 3% sucrose)

POG 처리는 정량화 데이터에 근거한 단계별 적정조건으로 구성되며, PCA처리는 POG 처리와 CO₂ 및 PPFD의 적산량이 동일하되 일정한 조건으로 유지된다. PCM 처리는 POG 처리의 최대 환경 조건으로 구성되며, PMC처리의 경우 관행의 광혼합영양 조건이다. PMC 처리의 배양 조건은 관행과 동일하게 배지에 3%의 sucrose를 첨가해주었으며, 지지물로는 phytigel을 이용하였다. 또한, 환기를 최소화하여 관행과 동일한 밀폐 상태를 구현하고자 하였다. 기외 이식 실험은 서울대학교 부속 농장내에 위치한 유리 온실에 순화과정 없이 곧바로 이식하여 수행되었다. 본 온실의 환경 조건은 적산일사량의 경우 하루 평균 2.6mol 이었으며, 온도의 경우 21.5±4℃로 유지되었다. 점적 관수 형태로 배양액을 공급하였으며 양액조성은 일본 작물시험장 처방을 이용하여, 절반 농도로 제조하였다. 배양액의 pH는 5.5에서 6.5정도로 유지하였으며, EC는 1.2 mS · cm⁻¹로 유지하였다. 배양액은 하루에 4회로 70mL씩 공급하였다. 기내증식시 이용한

지지물이 폴리우레탄이므로 통채로 이식이 가능하였으며, 이로써 뿌리의 손상을 최소화하고자 하였다. 그러나 PMC 처리의 경우 지지물이 phytigel이므로, 뿌리를 증류수로 세척한 후 이식하였다. 배지는 peat moss를 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

1) 기내 생육

환경 조절 기법이 생육에 미치는 효과는 Table 2-22에 제시하였다. 마디수, 전개엽수, 신초장, 신초직경 모두 동일한 적산량으로 처리한 PCA보다 단계별 환경제어 처리구인 POG 처리에서 유의적으로 향상된 결과를 보여주었다. 이는 기내 소식물체가 요구하는 환경 조건이 생육 단계 별 차이가 있음을 의미한다. 그러나, 최대 환경 조건으로 제어한 PCM 처리보다는 유의적인 차이는 없었으나, 다소 낮은 생육을 보여주었으며, 이는 생육 단계 별 적정 환경 조건 외에 CO₂ 및 PPF_D의 총 적산량도 영향을 받기 때문이다. 그러나, 각 환경 조절 처리별 소요된 전기에너지 및 CO₂양을 근거로 건물중 생산량을 분석하였을 때, 단계별 적정 환경 조절 처리구인 POG 처리에서 가장 낮은 수치를 보여주어 매우 효율적인 환경 제어 방법임을 알 수 있었다(Table 2-23). 또한 엽록소 형광 반응을 분석한 결과, 모든 처리에서 0.83 정도의 양호한 Fv/Fm 비율을 보여주었으며 다만 광혼합영양조건하에서 배양한 PMC 처리에서 가장 낮은 값을 나타내었다(Fig 2-57).

Table 2-22. Growth characteristics of potato plantlets under PMC, PCA, POG, and PCM treatments on 20th day.

Treatment	No. of nodes	No. of unfolded leaves	Shoot height (mm)	Shoot diameter (mm)	Fresh weight (mg/plantlet)	Dry weight (mg/plantlet)
PMC ^z	5.11 c ^y	3.83 c	41.77 c	1.10 d	114.41 c	12.51 c
PCA	6.58 b	7.84 b	60.60 b	1.60 c	332.37 b	28.16 b
POG	8.44 a	11.89 a	75.36 a	1.88 b	608.64 a	59.16 a
PCM	8.00 a	12.57 a	72.97 a	2.10 a	686.11 a	67.47 a

^zPMC : Photomixotrophically conventional condition(with 3% sucrose)

PCA : Photoautotrophically constant condition equal to Accumulated optimal condition

POG : Photoautotrophically optimal condition with Growth stages

PCM : Photoautotrophically constant condition equal to Maximum condition

^yMean separation within columns by LSD test at 5% level.

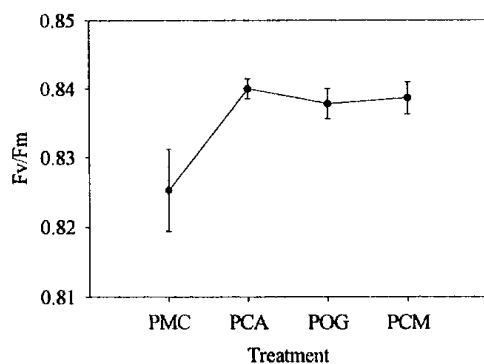


Fig. 2-57. Effects of PMC, PCA, POG, and PCM treatments on F_v/F_m ratio.

Table 2-23. Consumed electric energy for lighting and supplied CO₂ per dry weight under PMC, PCA, POG, and PCM treatments.

Treatment	The electric energy per dry weight CO ₂ usage per dry weight	
	(Wh · dwmg ⁻¹)	(mmol · dwmg ⁻¹)
PMC	47.318	0
PCA	40.997	48.440
POG	19.893	25.682
PCM	25.445	49.687

2) 기외 생육

Fig. 2-58은 기내 환경 조절 처리간 기외 이식 후 생육의 변화를 나타낸다. 전반적으로 본 처리에 의해 발생한 기내 생육의 차이가 기외 이식 후에도 유지되는 경향을 보여 주었으며, 관행의 광혼합영양 조건인 PMC처리의 경우 마디수, 전개엽수, 신초장, 신초직경 모두 가장 낮은 수치를 보였다. 또한, PMC 처리가 기외 이식 후 생육 속도가 가장 낮은 경향을 보였으며, 특히 전개엽수 및 신초장의 변화는 다른 광혼합 영양 조건과 비교하였을 때 가장 더딘 발달을 보여주었다. 단계별 적정 환경 조절 처리구인 POG처리는 마디수의 경우 최대 환경 처리구인 PCM처리와 거의 동일한 수준으로 발달하였으며, 그외 전개엽수, 신초장, 신초직경은 PCM 처리보다는 다소 낮으나 POG와 CO₂ 및 PPF의 적산량이 동일한 PCA 처리에 비해 높은 발달을 보였다.

생육 초기의 광합성 수준이 수확시기의 괴경 품질 및 수량에 다소 영향을 미친다는 기존의 논문을 근거로 판단하였을 때, 기내에서의 환경 조절이 기외에서의 괴경 생산에 큰 영향을 미친다는 것을 알 수 있다. Table 2-24는 기외 이식 후 22일째 생육 특성을 보여주고 있다. 여전히 POG 처리가 동일 적산량을 지니는 PCA 처리에 비해 마디수, 전개엽수, 초장, 마디 직경 등이 다소 높은 경향을 나타내었으나, 기내 생육과는 달리 유의적인 차이는 없었다. 그러나, 최대 환경 조건 처리구인 PCM 처리의 경우 모든 생육 특성이 유의적인 차이로 가장 우수한 생육을 보였다. 환경 조절 처리별 건물중의 최소, 최대값 간 차이를 관찰하였을 때, 기내 생육의 경우 5.4배, 22일째 기외 생육의 경우 6.1배 정도로 거의 동일하였으며, 이는 전반적으로 기내 환경 처리가 기외 생육에도 상당히 큰 영향을 미치고 있음을 의미한다. 그러나, PCM 처리의 경우 인

공광에 의해 기내 소식물체의 장해율이 상당히 높았으며, 에너지 소모량 또한 매우 높다는 점을 간과할 수 없다. 따라서 기내 생육 단계별 환경 조절이 기외 이식 후 신속히 적응하여 왕성한 생육을 유지하고 고품질의 괴경을 생산하는데 적합한 체계임을 알 수 있었다.

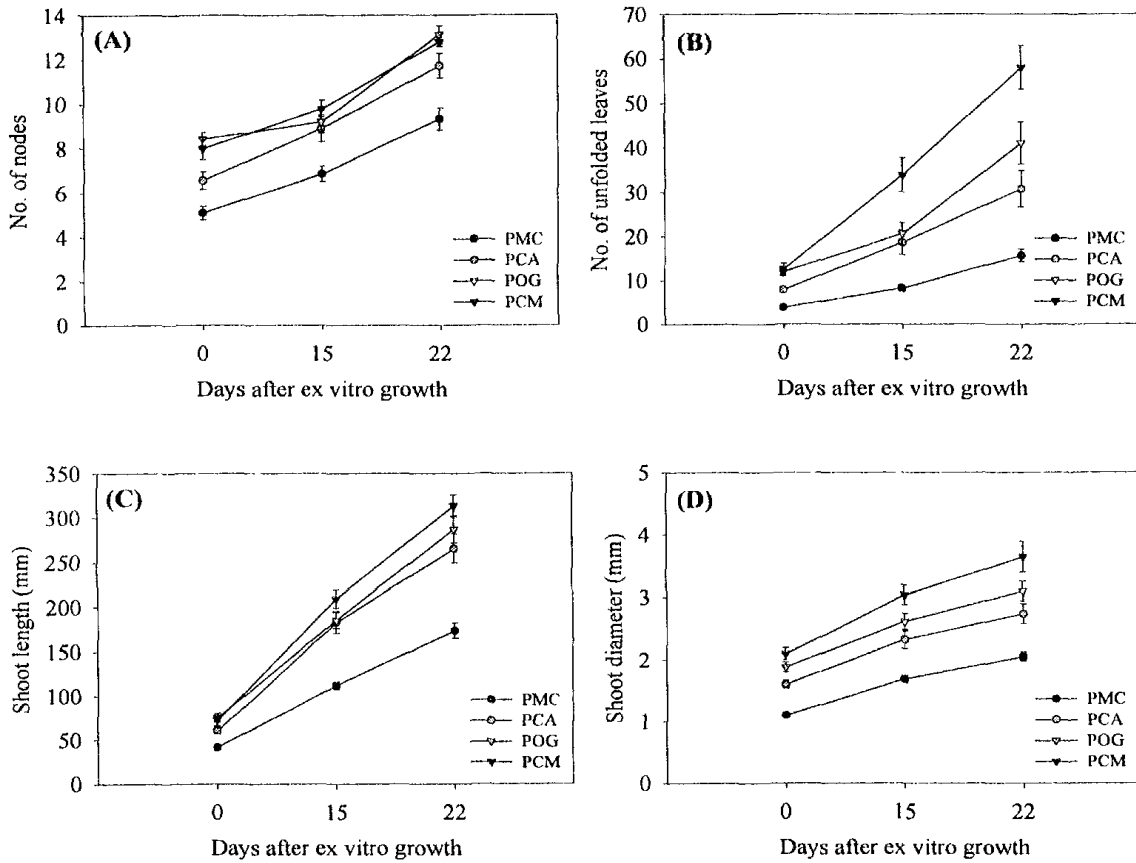


Fig. 2-58. Time courses of number of nodes(A), number of unfolded leaves(B), shoot length(C), and shoot diameter(D) of the potato plants after ex vitro growth.

Table 2-24. Growth characteristics of potato plants on 22th day after ex vitro growth.

Treatment	No. of nodes	No. of unfolded leaves	Shoot height (cm)	Shoot diameter (mm)	Dry weight (mg/plantlet)
PMC ^z	9.33 b ^y	15.67 c	17.35 c	2.05 c	59.53 c
PCA	11.73 a	30.73 b	26.54 b	2.73 b	160.91 b
POG	13.13 a	41.00 b	28.70 ab	3.10 b	229.13 b
PCM	12.80 a	58.00 a	31.36 a	3.65 a	364.40 a

^zPMC : Photomixotrophically conventional condition(with 3% sucrose)

PCA : Photoautotrophically constant condition equal to accumulated optimal condition

POG : Photoautotrophically optimal condition with growth stages

PCM : Photoautotrophically constant condition equal to maximum condition

^yMean separation within columns by LSD test at 5% level.



Fig. 2-59. Potato plantlets cultured in the greenhouse at 22th day after ex vitro growth.

제 3 장 미나리 체세포배의 최적 생산환경 구명 및 대량생산체계 확립

제 1 절 서론

미나리는 종자번식이 용이하지 않은 반면, 다른 작물에 비하여 체세포배를 이용할 수 있는 가능성이 매우 높다. 이를 위해서는 체세포배 대량생산 체계를 확립할 필요가 있다. 그러나 체세포배는 환경조건에 민감하게 영향을 받을 뿐만 아니라, 우량 체세포배의 대량생산을 위해서는 최적 환경조건 구명은 필수적이다. 따라서 미나리 체세포배를 생산하는데 있어 요구되는 환경요인과 각 요인들이 체세포배 발생에 어떠한 영향을 주는지에 대한 구체적인 정보에 근거하여 상관관계를 밝히고 대량생산에 직접 응용하기 위해 먼저 이전의 문헌을 토대로 기초 자료를 조사하는 것이 필요하다.

체세포배를 대량으로 증식하기 위해서 액체배지를 이용한다. 액체배지에서 세포는 고체배지에서와 달리 배지내의 양분을 쉽게 흡수할 수 있어 증식이 빠르지만 장기간 배양하면 세포의 활력을 잃게 된다. 세포를 액체배지에서 증식시키려면 배지내의 양분 흡수율을 고려하여 배지 성분의 농도를 조절하여야 한다. 또한 배지 교환이 적절히 되어야 빠른 증식에 따른 양분과 산소의 보충이 원활해진다. 따라서 액체배지를 적절하게 공급하기 위해서는 이에 관한 기초 연구가 선행되어야 하고, 이를 체계화하여 세포를 대량생산하는데 응용할 필요가 있다.

또한, 증식시키고 있는 세포를 이용하여 체세포배를 생산하는 기술을 좀더 체계화하기 위해서는 체세포배 발생 동안에 일어나는 여러 가지 변화와 배발생에 소요되는 시간 및 이 기간동안에 필요한 기내 환경에 관한 세밀한 연구가 필요하다. 체세포배 발생이 동조화되면 체세포배를 이용하여 미나리 묘를 생산하는 일련의 공정을 계획적으로 수행하여 이를 실용화할 수 있다.

본 연구에서는 미나리 체세포배의 최적환경구명 및 대량생산체계 확립을 위하여 다양한 각도에서 정량화 가능한 환경요인 분석을 실시하고, 액체배지에서 세포의 증식조건을 구명하며, 체세포배 대량생산 체계 확립하는 것을 목적으로 하였다.

제 2 절 정량화 환경요인 분석

1. 서언

미나리 체세포배를 생산하는데 있어 요구되는 환경요인과 각 요인들이 체세포배 발생에 어떠한 영향을 주는지에 대한 구체적인 정보를 얻어 상관관계를 밝히고 대량생산에 직접 응용하기 위해 먼저 이전의 문헌을 토대로 기초 자료를 조사하는 것이 필요하다.

2. 재료 및 방법

가. 문헌에 의한 환경 요인 분석

체세포배를 이용하여 미나리 유묘를 생산한 기존의 문헌을 조사하여 embryogenic callus의 유기, 증식과 배발생에 관여하는 요인을 조사하였다. 각각에 미치는 광, 일장, 온도, 배지 조성, 계대 간격, 접종 밀도 및 세부적인 기술 등을 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 문헌에 의한 환경 요인 분석

Table 3-1. Condition of somatic embryos production in *O. stolonifera* DC.

	Callus induction and growth	Somatic embryogenesis
Medium	MS + sucrose 3% + 2,4-D 1.0 mg · L ⁻¹	• 1/2MS + sucrose 3% + BA 0.1mg · L ⁻¹ + PEG 10.0% + ABA 0.05mg · L ⁻¹ (2weeks)
Light intensity	-	850lux
Temperature	25°C	25°C
Photo period	-	16h
Vessel	peri-dish	Flask
Inoculum density	-	30mg · 15mL ⁻¹

제3절 액체 배지에서의 세포의 증식 조건

1. 서언

세포를 대량으로 증식하기 위해서 액체배지를 이용한다. 액체배지에서 세포는 고체 배지에서와 달리 배지내의 양분을 쉽게 흡수할 수 있어 증식이 빠르지만 장기간 배양하면 세포의 활력을 잃게 된다. 세포를 액체배지에서 증식시키려면 배지내의 양분 흡수율을 고려하여 배지 성분의 농도를 조절하여야 한다. 또한 배지 교환이 적절히 되어야 빠른 증식에 따른 양분과 산소의 보충이 원활해진다. 이러한 기초 자료를 먼저 알아내고 이를 체계화하여 세포를 대량생산하는데 응용할 수 있다.

2. 재료 및 방법

가. 액체배지에서의 embryogenic 세포 증식에 미치는 2,4-D의 효과

고체 배지에서 유기된 embryogenic callus를 50mL의 액체배지가 들어 있는 250mL 삼각플라스크에 접종한 후 100rpm으로 진탕시키면서 현탁배양하였다. 배지는 MS + sucrose 3% + agar 0.8%로 하고 2,4-D를 각각 0.5, 1.0 및 2.0mg · L⁻¹씩 첨가하였다. 1주에 한번씩 계대하고 배양조건은 25℃, 암상태로 하였고 세포 증식량을 조사하였다.

나. 미나리 세포의 증식

300mL 및 500mL 삼각플라스크를 사용하여 세포의 증식을 경시적으로 관찰하였다. MS에 2,4-D 0.5ppm을 넣은 액체배지를 300mL 및 500mL 삼각플라스크에 각각 30mL, 50mL씩 넣고 미나리 callus를 60mesh에 통과시켜 각각 6mg, 10mg씩 넣었다. 100rpm으로 교반시키고 49일간 배양하였다. 삼각플라스크의 마개는 foil로 한 것(close)과 filter를 달아 aeration이 되도록 한 것(filter)의 2방법을 사용하였다. 각 처리별로 3반복으로 하였고 PCV는 2일 마다 측정하였다. 배양 조건은 25℃, 암배양으로 하였다.

다. 미나리 배발생 세포 증식에 유리한 배지 공급 방식과 환기 조건

Embryogenic cell을 생산하는 체계를 확립하기 위해 수행한 실험으로 300mL 및 500mL 삼각플라스크를 사용하여 세포의 증식을 경시적으로 관찰하였다. MS에 2,4-D 0.5ppm을 넣은 액체배지를 300mL 및 500mL 삼각플라스크에 각각 30mL, 50mL씩 넣고 미나리 callus를 60mesh에 통과시켜 각각 6mg, 10mg씩 넣었다. 100rpm으로 교반시키고 60일간 배양하였다. 삼각플라스크의 마개는 Sigma SUN cap을 사용하여 환기가 가능한 것과 일반 알루미늄 foil을 사용한 것의 두방법을 사용하였다. 각 처리별로 3반복으로 하였고 PCV는 2일 마다 측정하였다. 또한 PCV의 증가에 따라 배지를 공급해주었는데 기존의 배지를 그냥 두고 새 배지를 더 공급한 것과 기존 배지를 버리고 새 배지로 교환하면서 공급한 것의 두 가지로 나누어 실험하였다. 배양이 끝난 후에 기존 배지에 새배지를 첨가하면서 배양했던 세포를 각 처리별로 추출하여 배발생을 관찰하였다.

라. 생물반응기를 이용한 세포의 증식

2주 이상 현탁배양에 적응된 세포를 1L bubble column bioreactor에 접종하고 세포의 양이 늘어남에 따라 3L bubble column bioreactor로 옮기고 다시 20L balloon type bioreactor로 옮겨 배양하였다. 배양조건은 25℃, 암상태로 하고 공기 주입량은 0.5vvm(volume per volume min)으로 하였다. 배지는 배양 동안 PCV가 35%이상 되었을 때 수시로 보충해 주어 PCV가 20%가 되도록 유지하였다. 사용된 생물반응기나 공기 주입 및 배지 보충 방법은 임목육종연구소에서 자체 개발한 것을 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 액체배지에서의 embryogenic 세포 증식에 미치는 2,4-D의 효과

액체배지에서의 세포 증식에 영향을 미치는 2,4-D의 효과를 알아본 결과(Table 3-2), 고체 배지에서 embryogenic callus를 유기, 증식하는 데는 2,4-D $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 이 효과적이라고 알려져 있으나 현탁 배양을 할 경우 $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 에서도 비슷한 증식률을 보였다. 2,4-D $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 을 첨가한 배지에서 자란 세포는 약 7일 정도 후면 갈변이 되기 시작하였으나 $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 을 첨가한 배지에서는 7일이 지난 후에도 증식이 지속되며 노란색을 유지하고 있었다. 이후의 액체 배양에 2,4-D $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 을 적용하였다.

나. 미나리 세포의 증식

미나리 세포는 처음 8일까지는 생장을 하지 않다가 이후 급속히 생장을 시작하여 35일 정도까지 성장하고 다시 생장이 거의 멈추었다(Fig. 3-1). 밀폐시킨 삼각플라스크에서 자라는 세포는 상태도 좋지 않고 전반적인 증식량도 적었다. 세포는 환기가 되는 삼각플라스크에서 훨씬 잘 자라며 약 35일 정도까지만 성장하고 그 이후에는 생장이 점차 감소한 것으로 보아 약 35일의 성장 주기를 가지는 것으로 판단된다.

다. 미나리 배발생 세포 증식에 유리한 배지 공급 방식과 환기 조건

밀폐시킨 삼각플라스크에서 자라는 세포는 상태도 좋지 않고 전반적인 증식량도 적었으나 배지를 교환하면서 배양한 경우는 환기의 영향을 많이 받지 않았다. 또한 배지를 교환하면서 배양한 경우는 배양 초기 적응기간이 길어 초기에는 세포가 잘 자라지 않았다. 후기에 급속한 증식을 하였으나 배지의 소모량이나 소요 시간이 많이 걸려 바람직하지 않은 방법인 것으로 생각된다. 배양이 끝난 후 배발생을 측정한 결과 환기를 시켜서 배양한 세포의 배발생능이 더 좋은 것으로 나타났다(Fig. 3-2, Fig. 3-3).

라. 생물반응기를 이용한 세포의 증식

삼각플라스크와 생물반응기에서 세포를 각각 증식시켜 그 효율을 비교하였는데 (Table 3-3), 처음 접종 후 약 2주만에 증식된 세포의 량을 비교해 보면 생물반응기에서 증식시킬 때 삼각플라스크를 이용하는 것보다 2배 이상 더 증식된 것을 알 수 있었다. 이 결과는 현탁배양 때와는 달이 계대를 하지 않고 배지만을 보충해 주었다는 것을 감안할 때, 생물반응기를 이용하여 효율적으로 세포를 증식시킬 수 있음을 의미한다.

Table 3-2. Effect of 2,4-D concentration on cell growth of *O. stolonifera* DC.

Treatment	2,4-D ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	
	0.5	1.0
Growth (mL^2)	24(10^y)	23.5(10)

^z PCV(Packed cell volume)

^y Initial inoculum

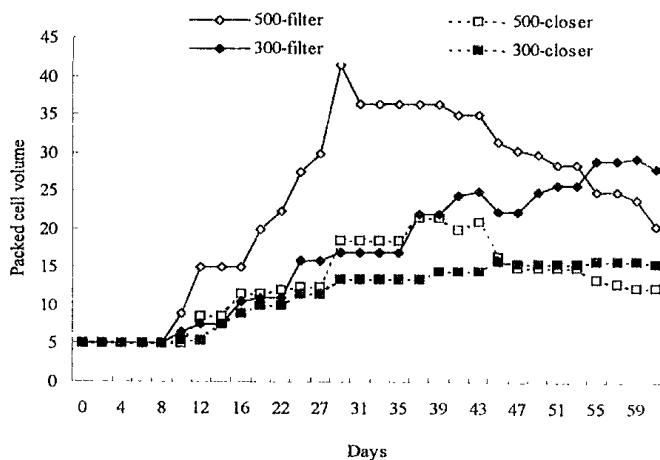


Fig. 3-1. The growth curve of cell.

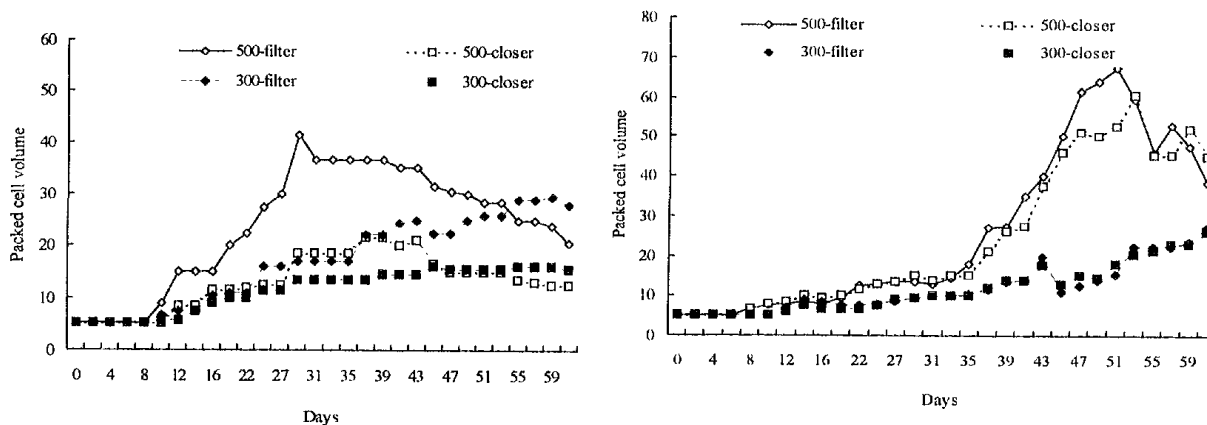


Fig. 3-2. Growth curves of cell.

(left: medium supplying method, right: medium exchanging method)

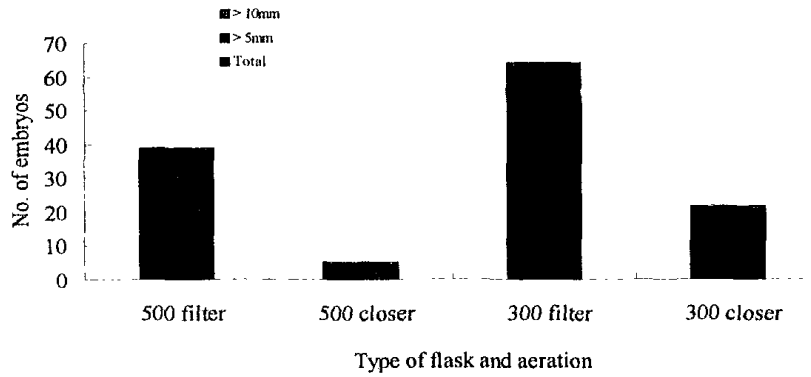


Fig. 3-3. Effect of ventilation on embryogenesis of *O. stolonifera* DC.

Table 3-3. Effect of vessel type on cell growth of *O. stolonifera* DC.

Vessel	Flask	Column		Balloon
	250mL	1 L	3 L	20 L
Growth (mL) ^z	25(10) ^y	350(80)	800(200)	1500(960)

^z PCV(Packed cell volume)

^y Initial inoculum

제 4 절 체세포배 대량 생산 체계 확립

1. 서언

증식시키고 있는 세포를 이용하여 체세포배를 생산하는 기술을 좀더 체계화하기 위해서는 체세포배 발생 동안에 일어나는 여러 가지 변화와 배발생에 소요되는 시간 및 이 기간동안에 필요한 기내 환경에 관한 자료가 필요하다. 또한 체세포배 발생이 동조화되면 체세포배를 이용하여 미나리 묘를 생산하는 일련의 공정을 계획적으로 수행하여 이를 실용화할 수 있다.

2. 재료 및 방법

가. 체세포 발생

1) 액체배지에서 증식된 세포의 배발생 능력

액체 배지에서 증식되고 있는 세포의 배발생 능력의 증식 기간 동안 어떻게 변화하는지를 알아보기 위해 수행하였다. 고체 배지에서 액체배지로 옮긴 세포를 배양하면서 배양 3일째부터 3일 간격으로 1mL씩 추출하여 50mesh에 통과시키고 100mL 삼각플라스크에 배지 15mL과 세포를 넣고 100rpm으로 교반하면서 배발생을 시켰다. 배지는 1/2MS + PEG 10.0% + ABA 0.05mg · L⁻¹ + BA 0.1mg · L⁻¹ + sucrose 3%에서 2주간 배양한 후 1/2MS + sucrose 3%로 계대하여 1주마다 계대하면서 2주간 더 배양하였다. 배양이 끝난 후 발생된 배를 꺼내어 수를 세었는데, 실험은 3반복으로 하고 배양조건은 25℃, 16시간 일장으로 하였다.

2) 체세포배 생산의 경시적 관찰

세포를 40과 60mesh에 차례로 통과시키고 100mL 삼각플라스크에 배지 15mL과 세포 30mg을 넣고 100rpm으로 교반하였다. 배지는 1/2MS + PEG 10.0% + ABA 0.05mg · L⁻¹ + BA 0.1mg · L⁻¹ + sucrose 3%에서 2주간 배양한 후 1/2MS + sucrose 3%로 계대하여 1주마다 계대하면서 3주간 더 배양하였다. 배양 3주째부터 발생된 배를 꺼내어 수를 세고 이후 3일 간격으로 배의 수를 세었다. 삼각플라스크는 10반복으로 하고, 배양 조건은 배양 조건은 25℃, 16시간 일장으로 하였다.

3) 체세포배의 동조화

2단계 mesh법 대신 homogenizer를 이용하여 11,000rpm에서 10초, 30초 및 60초간, 13000rpm에서 10초간 및 16000 rpm에서 10초간 마쇄하여 접종하였다. 3주 배양 후에 체세포배 발생량을 조사하였다.

4) Embryogenesis 동안 일어나는 pH 변화

당근의 체세포배가 형성되는 동안 pH가 특이적인 변화를 보이며 pH를 조절하여 체세포배 발생을 동조화시킨 보고가 있었다. 이에 따라 미나리 체세포배 형성 동안의 pH 변화를 조사하였다.

나. 체세포배 대량 생산

1) 체세포배 대량 생산 방법

Embryogenic 세포로부터 체세포배를 대량으로 얻기 위해 직경 10cm, 길이 20cm와 50cm의 두 가지 rolling bottle을 사용하였다. 증식하고 있는 세포를 꺼내어 40mesh와 60mesh에 차례로 통과시키고 50cm rolling bottle에는 배지 200mL에 세포 400mg을, 20cm rolling bottle에는 배지 200mL에 세포 200mg를 접종하였다. 배지는 1/2MS + PEG 10.0% + ABA 0.05mg · L⁻¹ + BA 0.1mg · L⁻¹ + sucrose 3%에서 2주간 배양한 후 1/2MS + sucrose 3%로 계대하여 1주마다 계대하면서 2주간 더 배양하였다.

2) 세포 접종 밀도에 따른 embryogenesis

접종밀도의 효과를 보기 위해 50cm rolling bottle를 이용하여 세포를 각각 400, 600 및 800 mg · 200 mL⁻¹로 접종하여 3주 배양한 후에 체세포배 발생량을 조사하였다.

3) Aeration에 따른 embryogenesis

병마개의 종류에 따른 공기 순환의 효과를 보기 위해 air-filter를 달고 air pump를 이용하여 2일 마다 공기를 강제로 순환시킨 것과 플라스틱 마개로 밀봉한 것 및 poly-urethane sponge와 sili-stopper로 환기를 시킨 것을 마개로 하였다. 3주 배양

후에 체세포배 발생량을 조사하였다. 체세포배는 전체 개수를 센 후 유근이 출현한 것을 따로 세어 성숙한 체세포배로 분류하였다.

다. 체세포배 생산에 영향을 주는 기내 미세 환경

1) 체세포배 생산에 미치는 광도의 영향

Petri-dish에 1/2MS + ABA $0.05\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + BA $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + sucrose 3% + agar 0.8%를 넣고 여기에 40mesh와 60mesh에 차례로 통과시킨 세포를 액체 배지에 섞어 2mL씩 분주한다. 60, 90, 120 및 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 광에 petri-dish를 두고 배양하여 30일 후에 배의 수를 세었다. 각 처리별로 4반복을 두었고, 배양 조건은 25°C , 16시간 일장으로 하였다.

2) Sealing 재질의 환기율

500 mL 삼각플라스크에 aluminium foil, aluminium foil에 직경 10 mm $0.02 \mu\text{mol}$ filter disc 장착한 Sigma Sun cap, aluminium foil에 직경 10 mm Milliwarp을 장착한 Milliwarp 및 Ortho polypropylene(OPP)을 재질로 한 마개를 덮고 환기 횟수를 측정하였다.

3) 체세포배 발생에 미치는 환기의 영향

100 mL 삼각플라스크에 미나리 embryogenic 세포를 넣고 초기 2주는 aluminium foil을 장착하여 밀폐상태로 배양하고 1/2MS + sucrose 3% 배지로 옮긴 후 여러 가지 재질로 sealing하였다. Sealing 재료는 Sigma Sun cap, OPP film에 직경 10 mm Milliwarp을 장착한 것(OPP + Milliwarp), 플라스크 입구와 같은 크기의 Milliwarp 및 air filter장착하여 $20, 40, 80 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 로 강제 환기시키면서 배양하여 2주간 배양한 다음 발생된 배의 수를 세었다.

4) 체세포배의 기외 발아에 미치는 환기의 영향

생산된 체세포배 유래 소식물체를 미나리 양액에 옮겨 발아율을 조사하였다. Urethane sponge에 소식물체 파종한 뒤 플라스틱 용기($24 \times 17 \times 12.5 \text{ cm}$)에 넣고

미나리 양액을 공급하였는데 용기는 PE film으로 밀봉하고 직경 10mm의 구멍을 4군데 두었다. 또한 투명한 유리병(7.5×7.5×13 cm)에 소식물체와 양액을 담고 PE film으로 밀봉한 뒤, air bubbler로 양액 내에 공기를 공급하였다. 배양 조건은 25℃, 16시간 일장을 유지하였고, 15일 배양 수 체세포배 유래 식물체의 생육상태를 각각 조사하였다.

라. 생물반응기를 이용한 대량 생산

위에서 나온 결과를 바탕으로 생물반응기를 이용하여 체세포배를 생산하였다. 초기 2주간 배양은 삼각플라스크를 이용하였고, 다음 2주 동안 체세포배 발생을 보았다. 배지는 연동식 펌프를 사용하여 스프레이 방식으로 30분에 1회 30초씩 간헐적으로 공급하였다. 배양 동안 배지는 새로 교환하지 않았고 배양 조건은 25℃, 16시간 일장을 유지하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 체세포배 발생

1) 액체배지에서 증식된 세포의 배발생 능력

액체배지에서 세포를 오랜기간 증식시킬 때는 고체배지에서 증식시킬 때보다 세포의 활력이 빨리 떨어진다. 또한 고체배지에서 액체배지로 바로 옮겨지게 되면 세포가 배지에 적응하는 기간이 필요하다. 본 실험에서는 액체배지에 세포를 옮겨 배양을 시작한지 10일이 지난 세포의 배발생능이 가장 좋았다. 그러나 27일 이후가 되면서 배발생 능력이 떨어지기 시작하여 이후의 세포에서 발생한 배는 쉽게 갈변하였다(Fig. 3-4) 또한 배양 10일 이전에 발생한 배와 27일 이후에 발생한 배의 경우 기형율이 높았다(Fig. 3-5). 세포의 증식은 35일을 전후로 멈추고 약 25-27일 전후로 최대가 된다는 것을 고려할 때 액체배지에서 세포를 증식시키면서 25-27일째에 꺼내어 배발생을 시키는 것이 바람직하다.

2) 체세포배 생산의 경시적 관찰

배의 수를 세기 시작한 지 16일 째에 가장 많은 배가 발생하였다(Fig. 3-6). 배양

의 시작부터 보면 37일째이다. 따라서 세포를 배발생 배지에 접종한 뒤 40일째에 배를 수확하면 미나리 체세포배를 가장 많이 얻을 수 있다.

3) 체세포배의 동조화

체세포배 발달을 동조화하기 위해 40과 60mesh를 통과시켰던 기존의 방법을 대신하여 homogenizer로 마쇄하는 방법을 적용할 수 있는지를 보았다(Table. 3-4). 11,000rpm에서 60초간 간 것과 16,000rpm에서 10초간 간 것이 배발생률이 높았다. 이 결과는 체세포배 발달을 효과적으로 동조화시키지만 오염의 위험이 높았던 mesh법을 homogenizer로 대체할 수 있다는 것을 보여주었다.

4) Embryogenesis 동안 일어나는 pH 변화

체세포배 발생 배지로 세포를 옮긴 후 처음 10정도에는 pH가 떨어지고 다시 올라가서 체세포배가 발생하기 시작하는 12일 이후는 pH가 다시 올라간다는 기존연구와 유사한 결과를 보였지만 완전히 일치하지는 않았다(Fig.3-7). 좀더 실험하여 결과를 정확히 분석하고 체세포배 발생과 pH와의 관계를 밝혀 동조화 및 배발생 촉진에 이용할 필요가 있다.

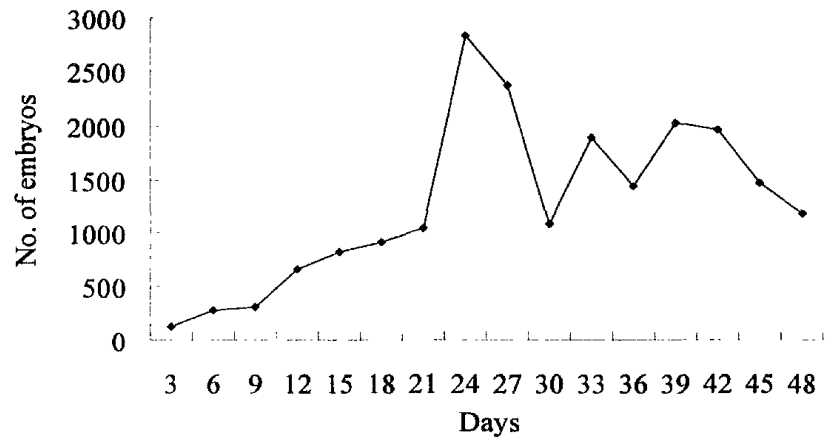


Fig. 3-4. Effect of the duration of culture on embryogenesis of *O. stolonifera* DC.



Fig. 3-5. Effect of the duration of culture on embryogenesis of *O. stolonifera* DC. (left: 3 days, middle: 15 days, right: 45 days)

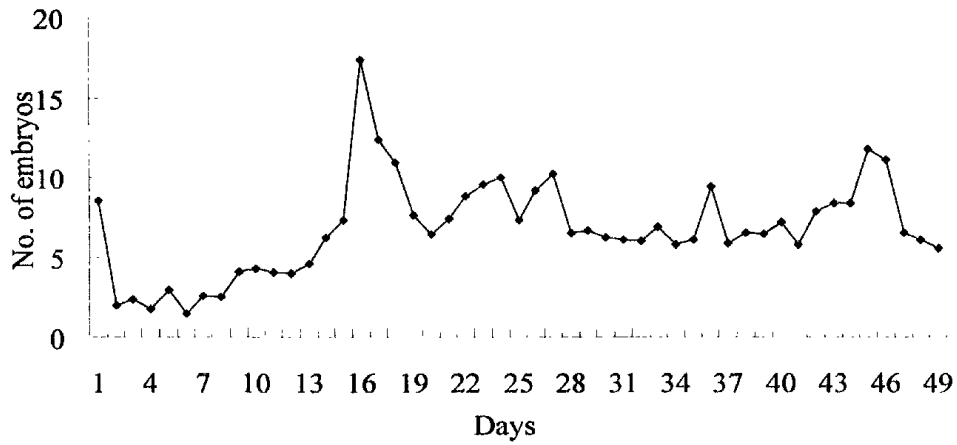


Fig. 3-6. Time course of embryogenesis.

Table 3-4. Effects of homogenizing speed and duration on somatic embryo formation of *O. stolonifera* DC.

Treatments	Total number of embryos	Number of mature embryos
11,000 rpm for 10 sec	443c ²	183d
30 sec	1157a	550bc
60 sec	1383a	870a
13,000 rpm for 10 sec	883b	447c
16,000 rpm for 10 sec	1380a	710ab

² Mean separation within a column by Duncan's multiple range test at 5% level.

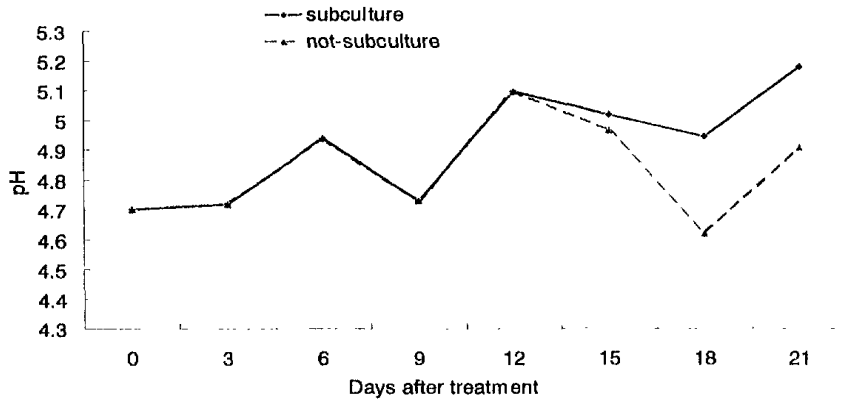


Fig. 3-7. Changes in pH during embryogenesis of *O. stolonifera* DC.

나. 체세포배 대량 생산

1) 체세포배 대량 생산 방법

Fig. 3-8은 rolling bottle와 rolling apparatus의 모습이다.

2) 세포 접종 밀도에 따른 embryogenesis

세포를 embryogenesis 배지에 접종할 때의 밀도가 체세포배 생산에 미치는 효과를 나타낸 결과(Table. 3-5), 문헌상의 접종 밀도인 $30 \text{ mg} \cdot 15 \text{ mL}^{-1}$ 보다 조금 높은 밀도인 $600 \text{ mg} \cdot 200 \text{ mL}^{-1}$ 에서 체세포배 생산량이 많았다. 배양 용기가 커지게 되면 접종 밀도가 비례적으로 높아지는 것이 아니라 배양 용기에 따라 체세포배 발생에 효율적이 접종밀도가 다를 것이다. 배양 용기와 접종밀도 간의 상관관계를 이해하기 위해서는 용기의 공기 환경에 대한 구체적인 연구가 더 필요할 것이다.

3) Aeration에 따른 embryogenesis

병마개에 따라 달라지는 aeration 량이 체세포배 생산에 미치는 영향은, 배양 3주

까지는 플라스틱 뚜껑으로 밀폐시킨 bottle에서 가장 많은 체세포배를 얻었다(Table. 3-6). Air filter를 달아 2일 마다 신선한 공기를 넣어 주었을 때는 배의 발달이 많이 늦어져 배양 3주째에 다른 처리보다 배의 수가 훨씬 적은 것을 볼 수 있다. 그러나 배양 4주째 이후에는 모든 처리에서 체세포배가 비슷하게 생산되었고, 특히 poly-urethane sponge 뚜껑으로 마개를 한 병에서 배의 생장이 가장 왕성하였는데, 체세포배가 발달하는 동안에는 산소를 많이 요구하지 않으나 성숙하는 동안에는 산소를 많이 요구하는 것으로 생각된다.

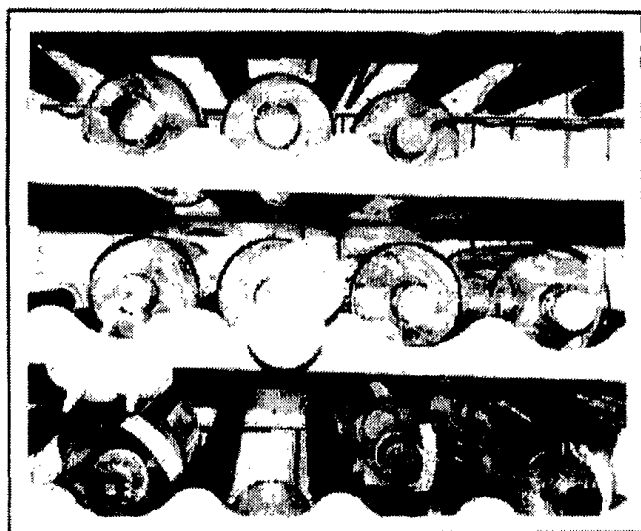


Fig. 3-8. Feature of different stoppers in rolling bottles.

Table 3-5 . Effect of cell inoculum density on somatic embryo formation of *O. stolonifera* DC.

Density (mg · 200 mL ⁻¹)	Total number of embryos	Number of mature embryos
400	620b ^z	200b
600	940a	347a
800	740ab	247ab

^z Mean separation within a column by Duncan's multiple range test at 5% level.

Table 3-6. Effect of various stopper on somatic embryo formation of *O. stolonifera* DC.

Stopper	Total number of embryos	Number of mature embryos
Plastic	1273a ^z	280a
Sponge	720b	153b
sili	1027ab	200ab
Filter	380b	127b

^z Mean separation within a column by Duncan's multiple range test at 5% level.

다. 체세포배 생산에 영향을 주는 기내 미세 환경

1) 체세포배 생산에 미치는 광도의 영향

광도가 달라짐에 따라 체세포배 발생 수에 큰 유의차를 보이지는 않았으나 발생한 배의 상태로 보아 60 이나 $90 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 저광이 유리하다고 생각된다.(Fig. 3-9). 이는 기존의 연구결과와도 일치하는 것으로 배가 정상배의 모습을 하고 있었고 녹색이 선명했으며, 배양 초기에 일찍 배가 발생하였다. 배의 발생이 좀 더 빠른 것은 $90 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 일 때였다.

2) Sealing 재질의 환기율

조직배양에서 일반적으로 많이 이용하는 sealing 재료들의 환기량을 알아본 결과 milliwrap의 환기량이 가장 높았다(Fig. 3-10). 다른 배양에서 배양의 효율을 높인 것으로 많이 보고되었던 Sun-cap의 경우도 매우 높은 환기량을 보였으며 일반적으로 가장 많이 사용하는 aluminium foil은 환기가 거의 되지 않는 것을 알 수 있었다.

3) 체세포배 발생에 미치는 환기의 영향

이들을 조합하여 몇 가지 sealing 처리와 강제 환기실험을 수행하였다. Aluminium foil의 경우 체세포배 생산량은 가장 많았지만(Table 3-7), 배가 길어지는 등 기형이 많았고 sun cap이나 OPP+milliwrap으로 sealing할 경우 배의 수는 다소 적었으나 발생된 배가 매우 균일하고 성숙한 배가 많았다. 강제 환기를 시킨 경우는 배가 매우 불균일하게 발생하였고 수도 적었다(Fig. 3-11, Fig. 3-12). 기존의 연구 결과에서 미나리는 초기 2주 동안에는 밀폐환경이 유리하지만 후기의 어느 시점에는 환기가 잘 되어야 배가 잘 성숙한다고 보고되었다. 본 실험의 결과로 보아 배양 2주째에 환기량을 늘리면 배가 충분히 발생하지 않아 발생단계가 매우 다양하게 보였고, 4주간의 배양 기간 동안 밀폐시킨 경우 발생된 배의 수는 많았지만 배의 성숙이 느렸다. 이후의 실험에서 배발생 및 발아 동안 환기가 많이 필요한 정확한 시기를 구명해야 할 것으로 사료된다.

4) 체포배의 기외 발아에 미치는 환기의 영향

배양이 끝난 체세포배를 기외에서 발아시킨 실험에서는 urethane-sponge에서 생산된 소식물체의 뿌리가 배지에 공기를 주입한 glass bottle에서 생산된 것 보다 길기도 길고 신선중과 건물중도 높았다(Table 3-8, Fig. 3-13). 미나리는 수생 식물로 흔히 알려져 있지만 배가 발아하는 동안 물에 잠겨 있는 것은 발아도 잘 되지 않을 뿐만 아니라 이후의 생육에도 양호하지 못하였다.

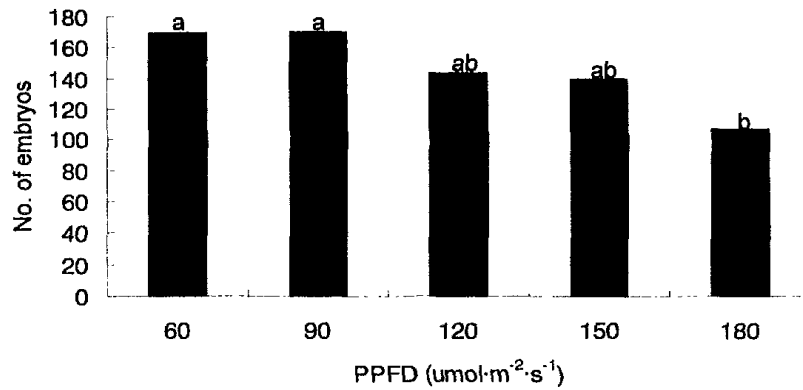


Fig. 3-9. Effect of PPFD ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) on embryogenesis.

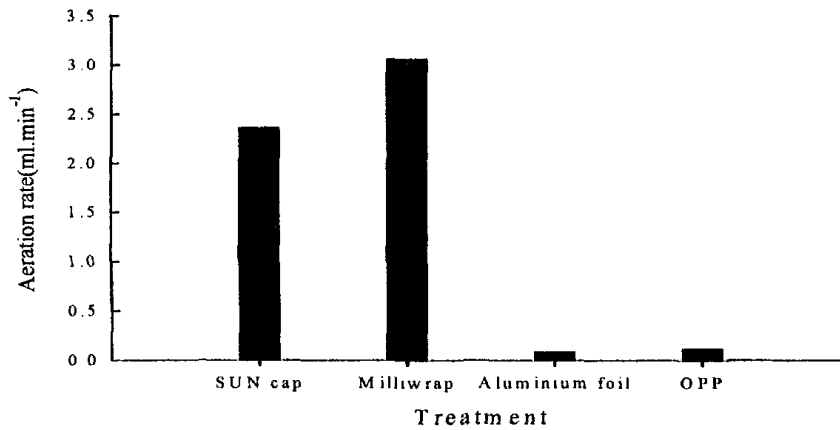


Fig. 3-10. Effect of various filter on aeration rate. Vertical bar represents SE (n=3 or 2).

Table 3-7. Effect of various types of aeration on number of somatic embryos in *O. stolonifera* DC.

	Total number of embryos(ea)	Number of Mature embryos(ea)
Aluminium foil	138.33 a	32.67 a
Sun cap	103.67 ab	35 a
OPP + Milliwarp	94.67 ab	36.33 a
Milliwarp	64 bc	22.67 a
20 mL · min ⁻¹	67.5 bc	29 a
40 mL · min ⁻¹	55 bc	32.67 a
80 mL · min ⁻¹	31.33 c	9.33 a

^z Mean separation within columns by Duncan s multiple range test at 0.05 level.

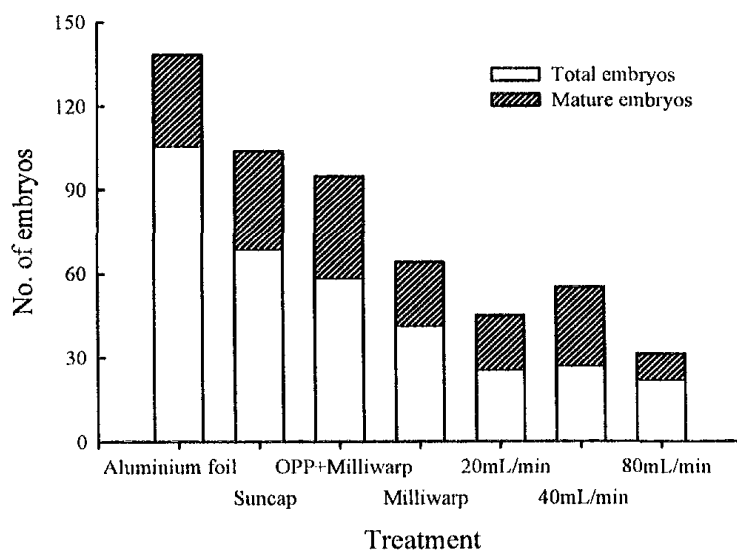


Fig. 3-11. Effect of various types of aeration on somatic embryogenesis in *O. stolonifera* DC.

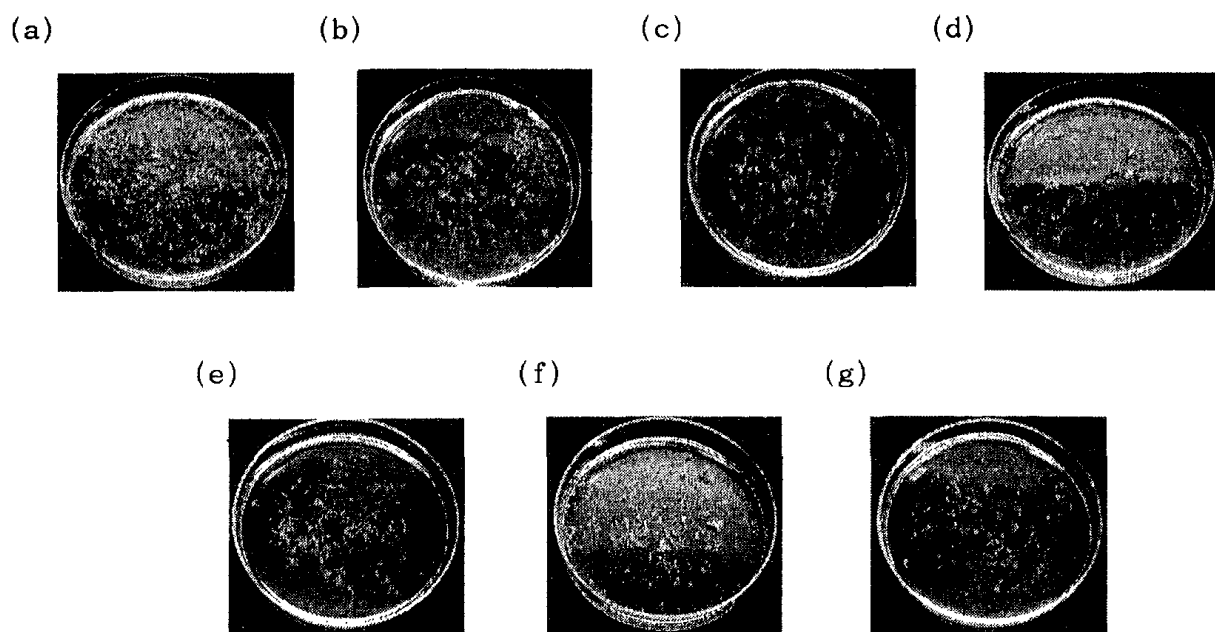


Fig. 3-12. Effect of various types of aeration on somatic embryogenesis in *O. stolonifera* DC. A: aluminium foil, B: sun cap, C: OPP+Milliwarp, D: Milliwarp, E: $20\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, F: $40\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, G: $80\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Table 3-8. Effect of germination method on growth of somatic embryo-derived plantlets of in *O. stolonifera* DC.

	Shoot length(cm)	Root length(cm)	No. of leaves	Fresh weight ($\text{mg} \cdot \text{plantlet}^{-1}$)	Dry weight ($\text{mg} \cdot \text{plantlet}^{-1}$)
Urethane sponge	2.83 a ^z	2.87 a	6.0 a	98.67 a	17.67 a
Glass bottle	1.47 b	2.20 a	8.0 a	53.00 b	5.67 b

^z Mean separation within columns by Duncan s multiple range test at 0.5% level.

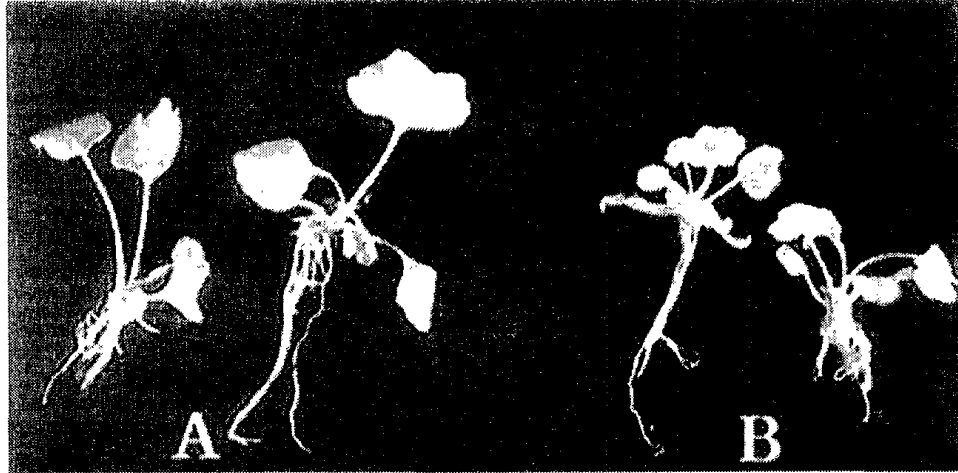
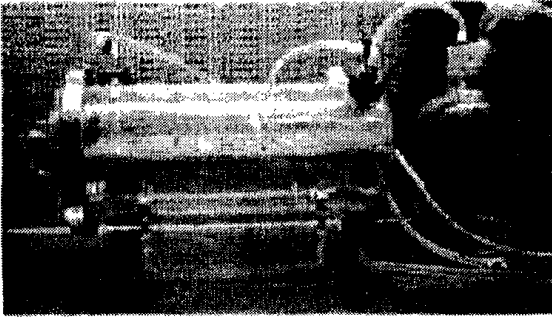


Fig. 3-13. Effect of germination method on growth and development of somatic embryo-derived plantlets of *O. stolonifera* DC in urethane sponge (A) and glass bottle (B).

라. 생물반응기를 이용한 대량 생산

위 실험을 바탕으로 제작한 생물반응기를 이용하여 체세포배를 발생시켜 보았다(Fig. 3-14). Urethane sponge 위에 파종한 체세포배는 발아하였지만 삼각플라스크나 rolling bottle에서의 배발생과 달리 배발생 비율이 적었다. 삼각플라스크에서 2주간 배양한 체세포배를 바로 기외로 꺼내어 발아시키는 시도를 해보았으나 기외 조건에서 3일 정도가 경과한 후 오염이 되었다. 본 실험에서 생물반응기 내의 배발생 및 발아가 미비하기는 했으나 배발생 단계 중 생물반응기에 넣는 시기를 좀더 구체적으로 구명한다면 체세포배를 대량으로 생산하여 urethane sponge와 함께 수경 재배 베드에 옮겨심기 쉬운 형태로 수확할 수 있는 가능성을 보였다고 사료된다.

(a)



(b)



Fig. 3-14. Somatic embryogenesis in bioreactor.

(a) bioreactor before inoculum and (b) somatic embryos on the urethane sponge in bioreactor

제 4 장 결론

1. 감자의 생육 환경요인 분석

저광도에서 초장은 길고 상대적으로 마디의 수는 적었고 고광도에서는 반대의 현상을 보였다. 특히, $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 강광과 $1500 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 의 CO_2 의 경우 배지의 당농도 1.5%에서 마디수가 가장 많았다. 강광이 주어지면 1.5%이상의 당이 첨가된 배지에서의 shoot 증식은 거의 유의차가 없었다. 감자의 shoot 증식에는 고농도의 CO_2 를 요구하지는 않았고, aeration이나 CO_2 농도보다는 광에 영향을 더 많이 받는 것으로 나타났다. 초장은 광도나 환기 여부와 관계없이 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 환기가 되는 경우 광도가 증가함에 따라 마디수가 크게 증가하였고, 줄기의 굵기도 증가한 것으로 나타났다. 무환기 상태 플라스크의 경우 초장이 전반적으로 길었고 마디수나 마디 굵기는 현저히 작아 감자 shoot의 증식에는 $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 광에 CO_2 $1500\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 을 사용하는 것이 유리하다. 초장은 당농도 1%에서 가장 좋았으나 마디수에는 차이가 없었다. 마디 굵기는 당농도에 따라 증가하였고, 또한 지하부가 매우 발달하였다. 수미는 1.5% 당에서 마디수와 마디 굵기가 다른 처리구보다 뚜렷하게 우수하였다.

초장이나 마디수는 두 처리 모두 25일 전후에 가장 많이 증가하였다. 계대를 하지 않고 계속해서 증식시킬 경우, 속도가 늦어지고 특히 생장이 왕성했던 1.5% 당을 사용한 배지의 경우 갈변 현상을 보였다. Shoot는 약 25일-30일 정도 증식시킨 후에 괴경 형성의 재료로 쓰거나 shoot 증식용 배지에 계대하는 것이 경제적이다. 광조건 $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 와 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 인 chamber에서 자란 감자 줄기가 가장 생장이 잘 되고 상태가 좋았다. 같은 광조건이라도 환기와 당농도에 따라 달랐는데 기존에 많이 사용하던 당농도 3%에서 보다는 1.5%에서 더 잘 자랐고, 특히 당농도 1.5%의 경우 환기의 효과가 컸다.

2. 기내 환경제어 조직배양시스템 구축

조직배양용 환경제어시스템은 총 4개의 챔버가 설치되어 있지만, 그 이상의 챔버 설치 확장이 가능하다. 각 챔버의 광원을 독립시켰기 때문에 서로 다른 광주기를 적용할 수 있고, 챔버 내부의 실제 배양 부위 광도는 최대 $320 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 를 구현할

수 있다. 본 시스템은 컴퓨터에 의하여 제어되며, CO₂, 광주기, 온도 등의 제어가 가능하다. CO₂ 제어는 비례제어를 사용하여 각 배양 챔버 별로 독립적으로 실시된다. 광주기는 시스템의 제어 계측기기로 제어하고 있으며 현재 16/8hr(명기/암기)로 설정하였다. 온도는 계측 환경 요인으로서 최적의 생육을 보이는 온도를 상수로 정해 컨테이너의 히트펌프로 유지하도록 하였고, 광주기에 따른 온도 변화를 관찰할 수 있도록 하였다. 설정온도는 24℃이며, 오전 6시부터 명기, 오후 10시 이후는 암기로 하였다.

온도 분포는 명기일 때, 가로 방향의 분포를 보았을 때 중앙 부분이 높은 특성을 보이고 있으며, 세로 방향의 분포도 마찬가지로 중앙 부분이 높은 특성을 보였다. 약광($60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)과 강광($120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 조건, 고체 배지와 액체 배지 조건, 알루미늄 호일과 필터 처리된 알루미늄 호일 등의 조건에 따라 용기내의 배지온도와 기상 온도를 측정하였다. 광강도가 높아짐에 따라 배양 용기 내의 온도는 배지보다 온도의 진폭이 크고, 신속하게 외부의 변화에 반응을 하였다. 배지 종류간 비교에서 고체 배지의 온도 변화가 외부 온도의 변화에 민감하여 반응의 진폭과 시간이 짧았다. 액체배지의 경우, 명기에서 암기로의 전환시에 챔버, 용기내 미기상 기온의 변화에 빠르게 반응하지 못하였다.

용기 덮개를 알루미늄 호일과 필터 처리된 호일을 사용하였을 때의 내부 온도 변화는, 환기횟수가 높아지더라도 온도의 변화는 크게 차이가 없는 것으로 나타났다. 필터별 환기 특성의 경우 Millwrap, SUN cap, CPP, OPP, aluminium foil 순으로 환기 효율이 우수함을 알 수 있다. 유량이 증가할수록 내부 풍속이 증가하는 경향을 나타냈고, 유량이 $4\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 에서는 약 $0.2\text{--}1.0\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, $8\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 에서는 $0.5\text{--}2.5\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, $15\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 에서는 $1.0\text{--}4.0\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 분포를 나타내었다.

3. 조직배양 시스템 내의 환경 요인 분석 및 생육 정량화 연구

광조건에 따른 온도차이는 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 PPFD 외에는 거의 유사한 값을 보여주었다. 암기와 명기 모두 습도 80-90%를 유지되었으며, 광량 별 큰 차이는 발생하지 않고, 전체적으로 일정하게 유지되었다. 700, 1000, 1400, 1800 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 의 CO₂ 수준으로 제어하였을 때 CO₂ 반응 특성은, 모든 CO₂ 설정치에서, 초기에는 신속히 상승하며 목표치 부근에서는 완만하게 증가하는 특성을 보여주었다. 본 시스템의 시정수는 27분 정도로 신속한 반응은 아니지만 대부분의 배양기간이 목표치 수준에서 CO₂

농도를 유지하고 있음을 감안하였을 때 충분한 반응시간이라고 할 수 있다. 최대 $120 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ 가량의 오차를 보여주었으며, 매우 안정된 수준으로 유지되었다. PPF D 분포는 최대 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPF D 가량의 오차로 균일한 제어가 가능하였다. 따라서 광량에 따른 온도 및 습도는 매우 안정적이었으며, 광 및 CO_2 가 일정하게 유지되었다.

자가영양조건의 생육 정량화를 위하여 생육단계를 약 7일간격으로 3단계로 구분하였다. 제1단계에서는 다양한 광 및 이산화탄소 농도를 상승시켰을 경우에도, 생육상태에 유의적인 차이가 없었다. 단, 장해엽 발생율의 경우 광량이 증가함에 따라 현저히 증가하였으며, $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서는 장해엽이 발생하지 않았다. 따라서 스트레스를 야기하지 않았던 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 PPF D와 $350 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 의 CO_2 처리가 본 단계에서 적합하다. 제2단계에서는 형태마디수, 초장 및 신초직경이 광량에 따라 유의적인 차이가 없었으나, 생체중과 건물중은 다소 향상되는 경향을 나타내었다. 그러나, 에너지 효율을 고려할 때, $160 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPF D 처리 이상의 광조건은 불필요하다고 판단된다. 제3단계에서는 CO_2 와 PPF D 처리에 따라 유의적인 차이로 생육이 향상되었다. 특히 CO_2 보다는 광량에 의해 생육이 보다 향상되었다. $240 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 혹은 그 이상의 PPF D 및 $1800 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 의 CO_2 가 적정 조건이라고 판단되었다. 이는 소질이 우수한 소식물체를 생육 초기에는 낮은 환경 조건, 생육 후기에는 집약적인 환경 조건으로 단계별 환경 조절을 통하여 낮은 에너지 투입으로 효과적으로 획득할 수 있다.

4. 조직배양묘의 기내 최적 환경 구명 및 대량 생산 체계 확립

자가영양조건 생육 모델링을 위하여 제2단계 및 제3단계에 대해서 환경조건에 대한 건물중 변화를 시뮬레이션하였다. 기본 함수로는 negative exponential 형태의 함수를 이용하였으며, 정량화 데이터를 근거로하여 각 환경 조건별 모델을 구축하였다. 구축된 모델을 근거로 판단하였을 때, CO_2 및 PPF D의 향상이 건물중 향상에 영향에 큰 영향을 미치며 광량의 경우 $160 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 가량에서 포화됨을, CO_2 의 경우 700과 $1400 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 처리 간에는 건물중 차이가 거의 없는 반면 $1800 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 의 CO_2 처리에서는 광 포화점이 다소 상향되며 건물중 또한 보다 향상됨을 관찰할 수 있었다. 이 결과로 부터 $160 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 PPF D와 $700 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 의 CO_2 처리가 적합할 것으로 생각되었다. 제3단계에서는 CO_2 수준이 향상됨에 따라 광량 증가에 의한 건물

중 향상폭이 매우 크게 나타났다. 감자 소식물체는 CO₂ 농도가 높다고 가정하였을 때 높은 PPFD 조건 일수록 생육을 향상시킬 수 있는 잠재력이 많다고 할 수 있다. 그러나, 인공광하에서 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 이상의 PPFD를 구현하는 것은 어려우며 비용 또한 광량이 증가할수록 기하급수적으로 증가한다. 본 단계에서는 320 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 PPFD와 1800 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 의 CO₂ 처리가 적합하다.

환경 조절 기법이 생육에 미치는 효과로는 마디수, 전개엽수, 신초장, 신초직경 모두 동일한 적산량 조건보다 단계별 환경제어 처리구에서 유의적으로 향상된 결과를 보여주었다. 각 환경 조절 처리별 소요된 전기에너지 및 CO₂양을 근거로 건물중 생산량을 분석하였을 때, 단계별 적정 환경 조절 처리구에서 가장 낮은 수치를 보여주었으며 매우 효율적인 환경제어 방법이라는 것을 확인하였다. 기외 이식후 생육상태는 기내 환경조절에 영향을 받는 것으로 나타났다. 단계별 적정 환경 조절 처리구는 마디수의 경우, CO₂ 및 PPFD의 적산량이 동일한 항온 처리에 비해 높은 발달을 보여주었다. 환경조절 처리별 건물중은 기내 생육의 경우 약 5.4배, 22일 째 기외생육의 경우 6.1배 정도로, 기내 환경 처리가 기외 생육에도 상당히 큰 영향을 미치고 있음을 의미한다. 따라서, 기내 생육 단계별 환경 조절이 기외 이식 후 신속히 적응하여 왕성한 생육을 유지하고 고품질의 괴경을 생산하는데 적합한 체계라고 생각된다.

5. 미나리 배발생 세포의 증식 조건

고체 배지에서 embryogenic callus를 유기, 증식하는 데는 2,4-D 1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 이 효과적이라고 알려져 있으나, 현탁 배양을 할 경우 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 에서도 비슷한 증식율을 보였다. 2,4-D 1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 을 첨가한 배지에서 자란 세포는 약 7일 정도 후면 갈변이 되기 시작하였으나, 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 을 첨가한 배지에서는 7일이 지난 후에도 증식이 지속되며 노란색을 유지하였다. 미나리 세포의 증식은 처음 8일까지는 중지되어 있다가, 이후 35일까지 급속히 성장을 시작하며, 이후 다시 생장이 거의 멈추었다. 밀폐시킨 삼각플라스크에서 자라는 세포는 상태도 좋지 않고 전반적인 증식량도 적었다. 반면에 환기가 되는 삼각플라스크의 세포가 훨씬 잘 자랐다. 또한 배양이 끝난 후 배발생을 측정한 결과 환기를 시켜서 배양한 세포의 배발생능이 더 좋은 것으로 나타났다.

배지를 교환하면서 배양한 경우는 환기의 영향을 많이 받지 않았으나 배양 초기 적응기간이 길어 초기에는 세포가 잘 자라지 않았다. 후기에 급속한 증식을 하였으나

배지의 소모량이나 소요 시간이 많이 걸려 바람직하지 않은 방법으로 생각된다. 환기가 되는 용기를 이용하여 세포가 자람에 따라 배지를 보충하는 방법이 바람직하다. 삼각플라스크와 생물반응기에서 세포를 각각 증식시켜 그 효율을 비교하였는데, 처음 접종 후 약 2주만에 증식된 세포량을 비교해 보면 생물반응기에서 증식시킬 때 삼각플라스크를 이용하는 것보다 2배 이상 더 증식된 것을 알 수 있다. 이 결과는 생물반응기를 이용하면 효율적으로 세포를 증식시킬 수 있음을 의미한다.

6. 체세포배 대량 생산체계

액체배양을 시작한지 10일이 지난 이후의 세포가 배발생능이 좋았다. 그러나 27일 이후가 되면서 배발생 능력이 감소되어 이후의 세포에서 발생한 배는 쉽게 갈변하였다. 또한 배양 10일 이전의 배나 27일 이후의 배의 경우 기형율이 높았다. 세포를 체세포배 배지에 옮긴 후 37일째에 발생한 배의 수가 가장 많았다. 따라서 체세포배를 효율적으로 생산하기 위해서는 배발생 배지에 세포를 접종하고 40일이 경과한 후에 배를 수확하는 것이 바람직하다.

체세포배 발달을 동조화하기 위해 40과 60mesh를 통과시켰던 기존의 방법을 대신하여 homogenizer로 마쇄하는 방법을 적용한 결과, 11,000rpm에서 60초간 마쇄한 것과 16,000rpm에서 10초간 마쇄한 것이 배발생율이 높았다. 이 결과는 체세포배 발달을 효과적으로 동조화시키지만 오염의 위험이 높았던 mesh법을 homogenizer로 대체할 수 있다는 것을 보여준 것이다.

체세포배 발생 배지로 세포를 옮긴 후 처음 10일 정도에는 pH가 떨어지고 다시 올라가서 체세포배가 발생하기 시작하는 12일 이후는 pH가 다시 올라간다는 기존 연구와 약간 유사한 결과를 보였지만 완전히 일치하지는 않았다. 세포를 배발생 배지에 접종할 때의 밀도는 문헌에 나온 접종 밀도인 $30 \text{ mg} \cdot 15 \text{ mL}^{-1}$ 보다 조금 높은 밀도인 $600 \text{ mg} \cdot 200 \text{ mL}^{-1}$ 에서 체세포배 생산량이 많았다. 배양 용기가 바뀌게 되면 세포의 접종밀도가 달라져야 한다는 것을 의미한다.

배양 3주까지는 플라스틱 뚜껑으로 밀폐시킨 bottle에서 가장 많은 체세포배를 얻었다. Air filter를 달아 2일 마다 신선한 공기를 넣어 주었을 때는 배의 발달이 많이 늦어져 배양 3주째에 다른 처리보다 배의 수가 훨씬 적었다. 그러나 배양 4주째 이후에는 모든 처리에서 체세포배가 비슷하게 생산되었고, 특히 poly-urethane sponge 뚜껑으로 마개를 한 병에서 배의 생장이 가장 왕성하였는데, 체세포배가 발달

하는 동안에는 산소를 많이 요구하지 않으나 성숙하는 동안에는 산소를 많이 요구하는 것으로 판단되었다.

미나리 체세포배 발생에는 60 이나 $90 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 저광조건이 유리한 것으로 나타났다. 배의 수뿐만 아니라 배의 상태도 좋았으며 배양 초기부터 배가 발생하였다. 배의 발생이 좀 더 빠른 것은 $90 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 일 경우이었다.

체세포배 발생과정 중, 4주간 aluminium foil로 밀폐시킨 경우 체세포배 생산량은 가장 많았지만 배가 길어지는 기형이 많았고, 반면 배발생 배지에 접종한 후 2주째에 sun cap이나 OPP+milliwrap으로 sealing하여 환기량을 늘려 줄 경우 배의 수는 다소 적었으나 발생된 배가 매우 균일하고 성숙한 배가 많았다. 그러나 air pump를 이용하여 강제 환기를 시켜주는 경우는 오히려 배 발생수도 적었고, 발생한 배의 단계가 일정하지 않았다.

배양이 끝난 체세포배를 기외에서 발아시킨 실험에서는 urethane-spong에서 생산된 소식물체의 뿌리가 배지에 공기를 주입한 glass bottle에서 생산된 것 보다 길어도 길고 신선증과 건물증도 높았다.

위 실험을 바탕으로 제작한 생물반응기를 이용하여 체세포배를 발생시켜 보았다. Urethane sponge 위에 파종한 체세포배는 삼각플라스크나 rolling bottle에서와 달리 배발생 비율이 적었다. 삼각플라스크에서 2주간 배양한 체세포배를 바로 기외로 꺼내어 발아시키는 시도를 해보았으나 기외 조건에서 3일 정도가 경과한 후 오염이 되었다. 본 실험에서 생물반응기 내의 배발생 및 발아가 미비하기는 했으나 기외 생육이 우수하였다. 배발생 단계 중 생물반응기에 넣는 시기를 좀더 구체적으로 구명한다면 체세포배를 대량으로 생산하여 urethane sponge와 함께 수경 재배 베드에 옮겨심기 쉬운 형태로 수확할 수 있는 가능성을 보였다.

조직배양을 이용한 원예작물의 대량, 자동 생산 시스템의 연구들은 원예작물에 대한 단편적인 정성적 자료의 수집에 편중되어 있고, 조직배양묘의 생육환경과 생육상태에 관한 정량적인 자료가 부재하여 대량 생산체제를 갖추기에는 미흡한 점이 많다. 본 연구 결과는, 학술적으로 환경 및 생육 정보를 이용한 조직배양묘의 생산체계, 환경요인의 계측과 제어가 가능한 조직배양시스템의 구축 및 조직배양 환경조건 구명을 통한 환경조절 연구에 중요한 기초자료로 제공될 수 있다. 또한 정량화에 의한 조직배양묘의 체계적인 생산 가능, 조직배양묘의 대량생산 체계에 적용 가능, 기존의 조직배양의 대량증식 순환시스템에 이용 등에 활용될 수 있을 것이다.

참고문헌

- Adelberg, J., K. Fujiwara, C. Kirdmanee, and T. Kozai. 1999. Photoautotrophic shoot and root development for triploid melon. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 57:95-104.
- Akita, M. and Y. Ohta. 1998. A simple method for mass propagation of potato(*Solanum tuberosum* L.) using a bioreactor without forced aeration. *Plant Cell Reports* 18:284-287.
- Akita, Motomu and Shinasku Takyama. 1988. Mass propagation of potato tubers using jar fermentor techniques. *Acta Hort.* 230:56-61.
- Akita, Motomu and Shinsaku Takyama. 1994. Induction and development of potato tubers in a jar fermentor. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 36:177-182.
- Akita, Motomu and Shinsaku Takyama. 1994. Stimulation of potato(*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control. *Plant Cell Reports* 13:184-187.
- Bean, H.H. 1972. Fluid meters : their theory and applications. The American Society of Mechanical Engineers, N.Y. pp. 179-196.
- Bienik, M.E. and D.J. Cantliffe. 1995. Enhancement of somatic embryogenesis of *Ipomoea batatas* for application to a bioreactor production system. *Acta Hort.* 393:173-180.
- Chu, I. 1995. Economic analysis of automated micropropagation. *Automation and environmental control in plant tissue culture*, pp517-539. Kluwer Academic Publishers.
- Chung, Y.M., B.G. Son, J.H. Lee, J.H. Suh, C.H. Chung, and O.C. Kwon. 2000. Histological observation of embryogenic and non-embryogenic callus in long-term subculture of wild viola (*Viola patrinii* DC.). *Kor. J. Plant Tiss. Cult.* 27:233-238.
- Desjadins, Y. et al. 1995. Carbon nutrition in vitro. *Regulation and*

- manipulation of carbon assimilation in micropropagated system. Automation and environmental control in plant tissue culture, pp441-472. Kluwer Academic Publishers.
- Eun, J.S. 1998. acclimatization of in vitro plantlets of *Wasabia japonica* (Miq) Matsum. derived from the apical meristem culture. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 25:257-261.
- Eun, J.S., Y.S. Kim, and S. Higashi. 1999. Growth acceleration and acclimatization of in vitro plantlets derived from the apical meristem of sweet potato. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 26:115-119.
- Fujiwara, K., T. Kozai and I. Watanabe. 1988. Development of a photoautotrophic tissue culture system for shoot and/or plantlets at rooting and acclimatization stages. Acta Hort. 230:153-158.
- Fujiwara, K. et al. 1995. Physical microenvironment and its effects. Automation and environmental control in plant tissue culture, pp319-370. Kluwer Academic Publishers.
- Fujiwara, K., S. Kira and T. Kozai. 1995. Contribution of photosynthesis to dry weight increase of in vitro potato cultures under different CO₂ concentrations. Acta Hort., 393:119-126.
- Garner, N. and J. Blake. 1989. The induction and development of potato microtubers *in vitro* on media free of growth regulating substances. Annals of Botany 63:663-674.
- Genhus, Niu, T. Kozai and C. Kubota. 1998. A system for measuring the in situ CO₂ exchange rates of in vitro plantlets. HortScience. 33(6): 1076-1078.
- Hao, Z., F. Ouyang., Y. Geng., X. Deng., Z. Hu and Z. Chen. 1998. Propagation of potato tubers in a nutrient mist bioreactor. Biotechnology Techniques 12:641-644.
- Hahn, E.J., J.H. Bea, and Y.B. Lee. 1998. Growth and leaf-surface characteristics of chrysanthemum plantlets between micropropagation and microponic system. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 39:838-842.
- Hashimoto, H. and S. Azachi. 1988. Bioreactor for the large-scales culture of

- plant cells. In : Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 4 Medicinal and Aromatic plants I (ed. by Y. P. S. BajBaj). Springer-Verlag Heidelberg. pp. 104-122.
- Heo, J. and T. Kozai. 1998. Effects of forced ventilation on the growth of sweetpotato plug plantlets in the large culture vessel. Abstr. Ann. Meeting Environ. Control. Biol. and J. Agric. Meteorol. 222-223.
- Hendriks, Theo., D. Vreugdenhil and W. J. Stienkema. 1991. Patatin and four serine proteinase genes are differentially express during tuber development. Plant Molecular Biology 17:385-394.
- Hussey, G. and N. J. Stacey. 1984. Factors affecting the formation of in vitro tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). Annals of Botany 53:565-578
- Im. H.H, Y.M. Chung, Y.S. Cho, C.H. Chung, J.H. Suh, and O.C. Kwon. 2000. The various suspension culture methods on the growth of culture cells of wild viola (*Viola patrinii* DC.) Kor. J. Plant Tiss. Cult. 27:155-161.
- Jay, V., S. Genestier and J-C. Courduroux. 1994. Bioreactor studies on the effect of medium pH on carrot(*Daucus carota* L.) somatic embryogenesis. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 36:540-546.
- Jeon JH, Joung H, Park SW , Kim HS, and Byun SM. 1992. Regulation of in vitro tuberization of potato(*Solanum tuberosum* L.) by plant growth regulators. Korean J. Plant Tissue Culture 19:67-73.
- Jeon JH, Joung H, Park SW, Kim HS, and Byun SM. 1991. Effect of physiological status of potato (*Solanum tuberosum* L.) stems on in vitro tuberization. Korean J. Plant Tissue Culture 18:233-238.
- Kessel, R.H.J. and A.H. Carr. 1972. The effect of dissolved oxygen concentration on growth and differentiation of carrot(*Daucus carota*) tissue. J. Expt. Bot. 23: 996-1007.
- Khuri, S. and J. Moordy. 1996. Nodal segments or microtubers as explants for *in vitro* microtuber production of potato. Tiss. and Org. Cult. 45:215-222.
- Kim HS, Joung JH, Park SW, and Joung H. 1992. Effect of salt strength and sucrose concentration in the medium on in vitro tuberization of potato

- (*Solanum tuberosum* L.) 19:343-349.
- Kim YH, T. Kozai, C. Kubota and Y. Kitaya. 1996. Design of a wind tunnel for plug seedlings production under artificial lightings. *Acta. Hort.* 440:153-158.
- Kim, H.S. and B.Y. Lee. 1995. In vitro production system of somatic embryos in *Oenanthe stolonifera* DC. *J. K. Soc. Hort. Sci.* 36:38-45.
- Kitaya, Y., O. Fukuda, T. Kozai and C. Kirdmanee. 1995. Effects of light intensity and lighting direction on the photoautotrophic growth morphology of potato plantlets in vitro. *Scientia Horticulturae* 62:15-24.
- Kitaya, Y., K. Sakami and T. Kozai. 1995. Development of photoautotrophic plant tissue culture system using CO₂ from Shiitake mushroom. *Acta Hort.* 393:195-202.
- Kirdmanee, C., Y. Kitaya and T. Kozai. 1995. Effects of CO₂ enrichment and supporting material on growth, photosynthesis and water potential of *Eucalyptus* shoots/plantlets cultured photoauto-trophically. *Environ. Control Biol.* 33(2):133-141.
- Komamine, A. 1988. High frequency and synchronous somatic embryogenesis, a useful system for crop improvement. *Foot and Fert. Technol. Ctr. Tech. Bul.* 113:1-4.
- Kozai, T. 1991. Environmental control and automation in micropropagation. In *Towards Tomorrow's Crops and Trees*. 9th Biennial Conference of the New Zealand Branch of the Intl. Assn. for Plant Tissue Cult. 21-23 Feb 1991. Rotorua, New Zealand.
- Kozai, T. et al. 1995. Environmental control in plant tissue culture. General introduction and overview. *Automation and environmental control in plant tissue culture*, pp 301-318. Kluwer Academic Publishers.
- Kozai, T. et al. 1995. Environmental measurement and control systems. *Automation and environmental control in plant tissue culture*, pp517-539. Kluwer Academic Publishers.
- Kubota, C. et al. 1996. Recent advances in environmental control in

- micropropagation. Plant production in closed ecosystems, pp 153-165. Kluwer Academic Publishers.
- Lee, J.W. and B.Y. Lee. 1993. Development of mass production system by somatic embryogenesis in *Oenanthe stolonifera* DC. I. The induction and morphological characteristics of somatic embryogenesis. J. K. Soc. Hort. Sci. 34 : 108-114.
- Matthys, D. et al. 1995. Ethylene. Automation and environmental control in plant tissue culture, pp473-493. Kluwer Academic Publishers.
- Na, H.Y. and B.Y. Lee. 2000 Preliminary studies on the establishment of seedling production system by somatic embryogenesis in *Oenanthe stolonifera* DC.. J. K. Soc. Hort. Sci. 41:374-378.
- Nangung, Y. and B.Y. Lee. 2000 In vitro mass production of somatic embryos and anatomical study in *Oenanthe stolonifera* DC.. J. K. Soc. Hort. Sci. 41:569-575.
- Park SW, Jeon JH, Kim HS, and Joung H. 1992. Effects of paclobutrazol Levels on shoot growth and microtuberization in tissue cultures of potato. Korean J. Plant Tissue Culture 19:311-315
- Quynh, T. N., T. Kozai, G. Niu, U. V. Nguyen. 1999. Photosynthetic characteristics of coffee(*Coffea arabusta*) plantlets in vitro in response to different CO₂ concentration and light intensities. Tiss. and Org. Cult. 55:133-139.
- Reynolds, J.F. and T. Murashige. 1979. Plant cell liness. In : W.B. Jakoby and I.H.Pastan(eda.), Methods in enzymology, Vol. 58. Academic Press, New York, pp. 478-486.
- Sarkar, Debabrata., R. Chandra and P. S. Naik. 1997. Effect of inoculation density on potato micropropagation. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 48:63-66
- Seon, J.H., Y.Y. Cui, T. Kozai, and K.Y. Paek. 2000. Influence of in vitro growth conditions on photosynthetic competence and survival rate of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 61:135-200.

- Serret, M. D., M. I. Trillas, J. Matas and J. L. Araus. 1996. Development of photoautotrophy and photoinhibition of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 45:1-16.
- Smith, M. A. L. et al. 1995. Vessels, gels, liquid media and support systems. *Automation and environmental control in plant tissue culture*, pp371-404. Kluwer Academic Publishers.
- Soh, W.Y., E.K. Lee, S.S. Hong, and D.L. Cho. 2000. Germination arrest of carrot somatic embryos cultured in liquid medium. *Kor. J. Plant Tiss. Cult.* 27:175-180.
- Sylvain, L. D. and W. Vidaver. 1992. Photosynthetic competence of plantlets grown in vitro. An automated system for measurement of photosynthesis in vitro. *Physiologia Plantarum*. 84: 409-416.
- Takayama, S. and M. Akita. 1994. The types of bioreactors used for shoots and embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult* 39:147-156.
- Tanaka, H., F. Nishijima, M. Suwa, and T. Iwamoto. 1983. Rotating drum fermentor for plant cell suspension culture. *Biotechnol. Bioeng.* 25:2359-2370.
- Teng, W. L, Y. J. Liu, Y. C. Tsai, and T. S. Soong. 1994. Somatic embryogenesis of carrot in bioreactor culture systems. *HortsScience* 29(11):1349-1352.
- Wheat, D., R.P. Bondryk, and J. Nystrom. 1986. Spin filter bioreactor technology as applied to industrial plant propagation. *HortScience* 21:819.
- Williams, R.R. 1995. The chemical microenvironment. *Automation and environmental control in plant tissue culture*, pp405-440. Kluwer Academic Publishers.
- Xu, Xin., A. A.M. van Lammeren., E. Vermeer., and D. Vreugdenhil. 1998. The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation in vitro. *Plant Physiol* 117:575-584.
- Yu, W. C., P. J. Joyce, D. C. Cameron and B. H. McCown. 2000. Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactor. *Plant Cell Reports*. 19: 407-413.

Ziv, M. 1995. In vitro acclimatization. Automation and environmental control in plant tissue culture, pp473-492. Kluwer Academic Publishers.

Ziv, M. 1995. The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. Acta Hort. 393:25-38.