

최 종  
연구보고서

생물반응기를 이용한 고품질 국화묘의  
대량생산 기술개발

Mass Production of High-Quality Chrysanthemum  
Transplants by Applying Bioreactor System

연구기관  
충북대학교 첨단원예기술 개발연구센터

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “생물반응기를 이용한 고품질 국화묘의 대량생산 기술개발” 과제 의 최종보고서로 제출합니다.

2002 년 11 월 18 일

주관연구기관명 : 충북대학교

총괄연구책임자 : 한 은 주

세부연구책임자: 한 은 주

연 구 원: 백 기 엽

연 구 원: 이 경 수

연 구 원: 정 재 훈

연 구 원: 도 중 선

연 구 원: 김 윤 수

연 구 원: 김 선 자

연 구 원: 전 민 화

협동연구기관명: 충북농업기술원

협동연구책임자 : 김 주 형

# 요 약 문

## I. 제 목

생물반응기를 이용한 고품질 국화묘의 대량생산 기술개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

국화의 재배에 있어서는 묘 소질이 균일한 우량묘의 공급이 최우선 과제이며 묘의 생육이 불안정하고 균일하지 못할 때는 생육 전반에 걸쳐 불량하게 되어 상품성 있는 국화 생산이 불가능하게 된다. 국화는 주로 삼목을 통한 영양번식을 하게 되는데 이와 같은 번식법은 증식율이 낮고 삽수를 매년 반복채취하기 때문에 바이러스 및 각종 토양병에 의한 감염율이 높아 묘질이 저하되고 있다. 기존 국화의 주된 번식 방법은 삼목으로서 일시에 다량의 묘를 얻는데는 많은 노동력의 소요와 일장 및 온도를 주어야 하는 번거로움이 있으며 연중 증식 시 모주의 저온처리 및 관리 등의 어려움이 있는 실정이다. 또한, 국화의 모주 관리 시 비배관리 및 환기가 불량하게 되면 삽수의 발근불량, 삽수 냉장 시 부패 등이 우려되며 잎이 황화 하는 현상이 발생할 수 있다. 삽수 채취 모주의 계속된 사용은 묘의 품질이 떨어질 뿐만 아니라 퇴화 및 바이러스 이병 등의 문제점이 있어 모주의 대체가 시급한 실정으로 안전한 모주 생산이 요구되어지고 있다. 그러나 기존의 재배방식은 동지아 번식 및 생산 묘포장이 별도로 설치되어 있어야 하고 겨울철 월동 관리 등이 필요한 실정으로 관리에 어려움이 있으며 10℃ 이하의 한파에는 가온 등이 요구되어 농가 경영비 증가의 원인으로 문제가 되고 있다. 이와 같이 국화 재배에 있어서 묘의 품질이 저하되면 여러 가지 생리장애의 발생이 일어날 수 있으며 생육 전반에 걸쳐 관리가 일정할 수가 없고 절화 품질이 크게 떨어져 우량묘를 이용한 현지 포장으로의 적용이 시급한 실정이다.

이런 문제점을 해결하기 위해서는 생장점 배양을 통한 무병주묘의 기내 대량증식 체계의 확립을 통한 고품질의 국화 생산이 필요하다. 기내 미세 번식은 기존의 영양 번식법에 비해 많은 장점을 가지고 있으며 많은 원예작물 및 농작물에 널리 적용되어 왔으나 생산비가 많이 들고 과정이 복잡하고 까다로워 산업화에는 아직 한계가 있다. 이를 해결하기 위해서는 배양배지, 시설, 인건비 등에 드는 높은 생산비로서 시간과 비용을 절감하면서 품질이 일정한 기내묘의 대량생산에 대한 연구가 절실하다. 즉, 생

물반응기와 같은 대형 자동 배양장치를 기내 식물체 생산에 적용하고 배양시스템을 최적화할 수 있는 적정 배양환경이 규명되어야 하고 여기에서 대량생산된 묘를 기외에서 균일하게 키우기 위한 transplant production 시스템이 확립되어야 한다. 즉, 무병묘의 기내 생산과 기외생장 시스템을 확립함으로써 노동력과 생산기간이 단축될 수 있고 고품질의 묘를 필요한 시기에 맞추어 공급할 수 있는 원예작물 무병묘의 대량생산 체계 확립이 반드시 필요하다. 따라서 생산비용을 절감하고 고품질의 무병묘를 일시에 대량생산하기 위해서는 배양용기의 대형화와 이에 따른 적정 환경조절이 필요하다. 이 같은 점에서 생물반응기 배양 시스템을 이용한 국화 무병묘의 대량생산 체계의 확립을 이용한 묘 증식효율의 극대화는 기존의 문제점을 해결할 수 있는 최적의 방법이라 할 수 있겠다. 본 연구에서는 생물반응기를 이용한 국화의 기내줄기의 대량생산에 관여하는 물리 화학적 기내 환경조건에 대한 실험과 새로운 기외 순화 시스템과 절화재배의 확립을 위해 다양한 실험을 수행하였다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 국화 shoot의 기내 급속증식을 위한 배양조건 확립

현재 국내외에서의 수요 요구도가 높은 국화를 중심으로 품종 선발을 한 후 기내 증식을 시켰다. 기내 shoot의 급속 증식 조건을 확립하기 위해 액체 배양과 고체배양의 비교, 배지 내  $\text{NH}_4^+$ :  $\text{NO}_3^-$ 의 조성 비율(0:60, 10:50, 20:40, 30:30, 40:20, 50:10, 60:0mM), 당의 첨가 유무, 광도(50, 100, 200, 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), 광질(Red, Blue, Red+Blue(RB, 0.7:1), Red+Far red(RFr, 1:1.1), Blue+Far-red(BFr, 1:1.6), fluorescent), 기간의 경과에 따른 양분 요구도 등에 대한 실험을 통해 shoot 생산 효율을 최대화하고 성장 기간을 단축할 수 있는 배양 환경 조건을 규명하였다.

#### 2. Bioreactor 배양시스템의 확립

10-liter 규모의 생물 반응기를 대상으로 shoot의 증식에 영향을 미치는 환기횟수(0, 0.05(10cc/min), 0.1(20cc/min), 0.3(60cc/min), 0.5(100cc/min) vvm),  $\text{CO}_2$  농도의 일 변화 및 배양기간별 당 및 양분 소모량을 알기 위하여 10일 간격으로 sampling 하여 배양기간 별 당 함량, 음이온과 양이온 변화를 분석하였다. 배지 공급 방식(Ebb & flood, liquid, raft culture), 생물반응기 내 접종밀도(20, 40, 60,80 node/reactor), 배양 과정 중의 배지 첨가(sucrose 첨가배지, sucrose 무첨가 배지를 배양 6주 후 첨가하

나 무침가 한 처리구의 비교), 온도 등을 달리하여 이에 따른 shoot 증식 및 생육 특성(광합성, CO<sub>2</sub> 농도의 일변화 등 포함)을 조사한 후 국화 shoot의 증식을 위한 생물 반응기 배양의 최적 조건을 확립하였다.

생물반응기에서 생산된 묘를 대상으로 계절(봄, 가을), 품종(신마, 백선)에 따른 rosette 발생을 방지하기 위해 추국과 하국 품종을 대상으로 저온 처리 방법(기내 및 기외)과 처리기간을 각각 달리하여 실험을 실시하였는데, 4-5°C의 범위로 40일간 기내 배양묘의 무처리(Control), 기내묘의 저온처리(배양병 상태로 저온처리), 식물체의 저온처리, 삽수(shoot)의 저온처리(기내 배양묘 순화 완료후 온실에서 1달 재배 후 삽수 채취하여 저온 저장) 등으로 나누어 실험을 실시하였다.

### 3. 양액재배 시스템(microponics)을 적용한 국화 transplant 생산

Bioreactor에서 생산된 국화묘를 삽수로 이용하여 기외순화 및 성장시켰을 때 삽목용토로 모래와 피트모스 단용, 피트모스와 펠라이트의 50:50 혼용, 피트모스와 버미큘라이트의 50:50 혼용하여 지상부, 지하부 생체중, 초장 및 엽수와 뿌리길이, 성장기간 등을 비교하였다. 이후 고품 배지경과 DFT를 비교하였는데 국화 배양액을 삽목 1주부터 이틀에 한번 관수하면서 삽목 40일 후에 지상부, 지하부 생체중 및 건물중을 조사했으며 초장, 엽면적 및 엽수를 조사하였다.

이전의 실험에서 묘 생장이 가장 좋았던 DFT 시스템을 이용하여 배양액의 EC와 PPF가 묘의 성장에 미치는 영향을 구명하기 위해 PPF를 50, 100, 250  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 로 달리하고 각각의 PPF level에서 배양액의 EC를 0.8, 1.6, 30  $\text{dS} \cdot \text{m}^{-1}$ 로 다시 나누어 실험을 실시하여 배양 5주 후 묘의 생체중, 건물중, 초장, 근장, 광합성을 측정하였고 엽록소 형광 parameter도 측정하였다. 또한, 묘 성장에 큰 영향을 미치는 요인인 PPF와 CO<sub>2</sub>의 처리를 달리하여 각각의 요인이 묘 성장에 미치는 영향을 구명하고 두 요인 간의 상관관계를 조사하였는데, PPF를 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 과 150  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 로 달리 한 후 CO<sub>2</sub> 농도를 350  $\text{mmol}^{-1}$ (control)과 1000  $\text{mmol}^{-1}$ 로 각각 다르게 처리하여 5주간 배양한 후 묘의 생체중, 건물중, 초장, 근장, 엽수, 엽록소 함량, 광합성, chlorophyll fluorescence 등을 조사하였다.

### 4. 생물반응기 생산 transplant 묘를 이용한 절화재배

생물 반응기와 Microponic culture system을 이용해 생산된 묘와 기존 관행배양 방법과의 비교를 위해 양액재배시 성장조절제 처리(GA<sub>3</sub> 50, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 과 에데폰 50, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )에 따른 국화 transplants의 성장 및 절화품질에 미치는 영향에 대해 조

사하였고 이후 하추국 양액 재배시 성장조절제 처리가 재절화 품질에 미치는 영향을 알기 위해 생물반응기에와 microponic system에서 생산된 국화 transplants를 이용하여 1차 절화 후 재절화 재배를 위해 성장조절제 처리를 하였다. 성장조절제 처리 역시 1차 재배 때와 마찬가지로 GA<sub>3</sub> 100, 200 및 400mg · L<sup>-1</sup>과 에데폰 50, 100 및 150mg · L<sup>-1</sup>을 절화 후 처리하여 식물체의 성장과 절화 품질을 비교하였다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

생물반응기 배양 시스템을 이용한 국화 무병묘의 대량생산 체계를 확립하고자 다양한 배양환경에 대한 실험을 수행하였다. 묘의 생장이 가장 좋았던 환경 조건으로는 배지 내 질소원(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>:NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)의 비율이 1: 2이었고 온도는 25℃, 광도(PPF)는 100μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>이었을 때 초장, 생체중 및 엽수의 증가가 가장 현저하여 우량한 국화 줄기를 생산하는데 적합하였다. 광도가 높을수록 초장이 짧아져서 마디로서의 기능을 전혀 하지 못했다. LED (Light-emitting Diodes)를 이용한 광질 실험에서는 적색과 청색의 혼합광 처리구에서 배양 소식물체당 순광합성 속도가 가장 높았으나 형광등 처리구와의 유의차는 없었다. 초장과 절간길이는 적색 및 적색과 근적색 혼합광에서 가장 길었고 청색과 근적색의 혼합광하에서는 생육이 억제되었다. 생물반응기 내 공기 주입량에 따른 국화의 생육을 알아본 결과, 배지량의 10%의 공기 즉, 0.1vvm의 공기를 주입하는 것이 가장 적당하였고 배양 방법으로는 지지대로서 플라스틱 망을 설치하여 그 위에 국화 배양체를 집중하여 성장시키는 raft culture system에서 가장 효과적이었다. 공기 용적이 10L인 생물반응기 배양시 삼수의 적절한 집중밀도를 알기 위하여 20, 40, 60, 80마디를 집중한 결과, 40, 60마디 배양시 생육차는 거의 없었으며 80마디를 집중했을 때는 밀도가 높아서 줄기가 약한 경향을 보였다. 생물반응기 내에서 마디를 대량생산하기 위하여 줄기 신장을 하게 되는데 이때 일정 배양기간이 경과하면 영양분 부족으로 성장 형태가 바뀌게 된다. 따라서 배양기간 중 배지를 공급하게 되는데 초기에 당 3%의 MS 배지를 이용하며 배지 공급시 당이 첨가되지 않은 배지를 첨가하였는데 그 생육이 당을 포함한 배지를 첨가한 처리구보다 양호하였다.

생물반응기 배양에서 대량 생산된 국화 삼수를 이용하여 transplant를 생산하기 위해 우선, 기외 순화과정에 미치는 여러 요인 실험을 수행하였다. 삼수의 부위 즉, 상부와 중부, 하부에 따른 국화의 생육을 비교한 결과, 상부와 중부는 생육차가 없었으며 하부로 갈수록 생존율이 떨어지는 것을 알 수 있었다. 그러나 기외순화율은 부위에 관계없이 100%의 생존률을 보였고 공정묘 생산까지의 기간을 기존 방법에 비해

현저히 단축시킬 수 있었다. 배지의 경우에는 피트모스와 펄라이트의 혼합 용토에서 생체중과 초장의 증가가 가장 컸다. 고품질 묘의 대량생산과 생산기간의 단축을 위한 재배법으로 양액재배의 도입 가능성을 검토하고자 기존의 재배형태인 토경법과 수경법 중 DFT 방식(microponic system)을 채용하여 실험한 결과, DFT 육묘방식이 토경법 비하여 현저한 증가를 보였고 고품배지경과 비교해서도 생산기간을 단축하고 묘의 품질을 크게 높일 수 있었다. 이렇게 생산된 국화묘를 이용하여 양액재배를 하였을 때 기존의 삽수 생산 시스템에 비해 공정묘의 생산까지 걸리는 시간을 단축하였을 뿐 아니라 절화 재배시 식물체의 성장속도와 절화품질도 기존의 방법과 비교하여 문제점이 전혀 없었을 뿐 아니라 절화 품질의 경우에는 더 효과적임을 알 수 있었다.

현재 조직배양의 국제적 추세는 고체 배양에서 액체 배양 시스템으로 바뀌고 있다. 이런 점에서 생물반응기 시스템을 이용한 원예작물 공정묘의 대량생산은 반드시 필요한 실정이다. 그러나 아직 국내에서는 생물반응기를 이용한 조직배양의 scale up 및 묘의 고품질화에 대한 연구가 거의 전무한 실정이다. 본 연구 결과를 기존의 국화 삽수 생산 방법(기외 이식 후 한 식물체에서 지속적으로 삽수를 생산)을 대체하는 새로운 묘 생산에 적용한다면 생산기간, 노동력을 줄이고 항상 일정한 소질의 고품질 묘(transplant)를 생산자에게 필요한 시기 공급할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 생물반응기 시스템은 국화묘의 생산 뿐 아니라 single shoot 또는 multiple shoot를 증식에 이용하는 다양한 원예식물(거베라, 칼라, 팔레놉시스, 감자, 사과, 포도 등)의 증식에 다양하게 활용할 수 있기 때문에 현재 가장 문제시되고 있는 공정묘 생산체계를 새롭게 확립 할 수 있다고 확신한다.

## SUMMARY

This study was carried out to establish bioreactor culture system for large scale production of chrysanthemum transplants. To do this, we have determined optimal environments during bioreactor and microponic (micropropagation+hydroponics) cultures. Then the transplants were finally transferred to hydrponic culture system to determine growth and flower quality compared with those of conventionally produced chrysanthemum plants. The results are as follows:

### **1. Determination of optimal environmental conditions for shoot proliferation**

Liquid culture enhanced plantlet growth. Fresh and dry weight, plant height, number of leaves and chlorophyll contents increased almost double those in solid culture, indicating that liquid culture was more effective for rapid propagation of chrysanthemum shoots. In the experiment on nitrogen source in the medium, shoot fresh and dry weight were greatest at a  $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$  ratio of 1:2, while plantlet growth was completely inhibited in 100%  $\text{NH}_4^+-\text{N}$ . Plant height, number of leaves, chlorophyll content were also significantly greater in  $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$  ratio of 1:2 than those in other  $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$  ratios.

The plantlets grown under the air temperature of  $25^\circ\text{C}$  showed much better results in fresh weight, plant height, leaf area, number of leaves and chlorophyll contents. The plantlets were also grown under different light qualities and the results showed that plantlet growth was enhanced by blue+red mixture light or fluorescent light. Net photosynthetic rate also increased by blue+red light and fluorescent. Red or red+far red light was effective for shoot elongation. On the other hand, blue and blue+far red light inhibited plantlet growth and photosynthesis. A PPF of  $100\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  and 0.1vvm of air volume significantly increased fresh and dry weight, plant height, and leaf area.



## **2. Establishment of bioreactor culture**

Nodal cuttings of chrysanthemum were grown by three different culture methods in bioreactors: Ebb and Flood culture, liquid culture, and raft culture. Plantlet growth was greatest in raft culture, showing highest shoot fresh weight, plant height, leaf area, and stem diameter. No difference in plantlet growth was observed between Ebb and Flood culture and liquid culture. Node inoculation density also affected plantlet growth. In a 10-liter bioreactor, plantlet growth was highest when 60 nodes were inoculated, while 80-node inoculation resulted in highest shoot length but the shoots were fragile.

During bioreactor culture, medium supplement after 6 weeks of culture was highly effective for shoot elongation. In addition, supplement of sugar-free medium induced higher plantlet growth as compared to supplement of sugar-containing medium.

## **3. Growth and acclimatization of chrysanthemum plantlets in the microponic system**

Chrysanthemum shoots produced in bioreactors were cut by single node cuttings, which were divided into three nodal parts: upper (1st-6th node), middle (7th-12th node) and lower parts (below 12th node). Growth difference was little between upper and middle parts of node, while the growth of lower part of nodes was rather lower. Acclimatization rate (plantlet survival) reached 100% when the plantlets were grown from upper and middle parts of node. However, lower part of nodes resulted in around 70% of plant survival.

Experiments were carried to investigate the effect of sand, peatmoss, peatmoss mixed perlite, peatmoss mixed vermiculite, and DFT system on root formation and plant growth after transplantation. Little difference in root formation and plant growth was observed among growth media except sand. On the other hand, plant growth was affected by growing system. Shoot length, leaf area, shoot and root

fresh weight, and number of leaves was remarkably increased in DFT system due to higher rate of nutrient absorption compared to substrate culture.

During transplant production, PPF, CO<sub>2</sub> concentration and EC level were varied to investigate growth responses of the plants. Results indicated that high PPF level (100-150  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) was the most important factor for the production of high quality transplants. Unlike other horticultural plants propagated by nodal cuttings, chrysanthemum nodal cuttings successfully grew to complete plants under high EC levels (1.5-2.5  $\text{dSm}^{-1}$ ).

#### **4. Hydroponic cultures using chrysanthemum transplants produced in bioreactors**

Chrysanthemum transplants were grown hydroponically with growth regulator treatments to increase growth and cut flower quality. Plant height and length of flower stalk increased more when the transplants were produced in bioreactors and microponic culture system. GA<sub>3</sub> treatment significantly increased fresh and dry weight, number of leaves and internode length, while ethephon treatment reduced internode length. Spike length was shortened by ethephon treatment, while spike diameter and flower diameter increased by GA<sub>3</sub>. Ethephon treatment delayed days to flowering and GA<sub>3</sub> shortened days to flowering but no difference was observed between transplant origins. Higher rate of physiological disorders occurred in the plants grown from conventional rooted cuttings and treated with ethephon. Transplants produced in bioreactors induced high quality cut flowers with GA<sub>3</sub> treatment, which increased marketable yield.

In the experiment on secondary flowering in hydroponic culture, GA<sub>3</sub> treatment was the key factor in quality improvement. GA<sub>3</sub> treatment increased plant height, flower stalk length and stem diameter. In addition, days to flowering were shortened and occurrence of physiological injury significantly decreased by GA<sub>3</sub> treatment. Amount of cut flowers and marketable yield also increased by GA<sub>3</sub> treatment.

## CONTENTS

<b>Chapter I . Outline of the research project</b> . . . . .	13
1. Necessity of the research . . . . .	13
2. Research goals and scope . . . . .	17
<b>Chapter II . The present state of domestic and foreign research</b> .	20
1. Improvement of culture conditions through microenvironmental control .	20
2. Large scale production of ornamental plants by applying bioreactor system . . . . .	21
3. Production of chrysanthemum transplants in microponic culture system .	23
4. Production of high-quality cut flowers using chrysanthemum transplants .	24
<b>Chapter III . Research details and results</b> . . . . .	25
1. Effect of microenvironments on chrysanthemum shoot proliferation .	25
2. Rapid propagation of chrysanthemum shoots in bioreactors . . . . .	47
3. Transplant production using bioreactor-produced chrysanthemum shoots .	62
4. Cut flower cultivation using chrysanthemum transplants . . . . .	92
<b>Chapter IV . Accomplishment of research and contribution to the                     related fields</b> . . . . .	109
1. Establishment of bioreactor culture system for shoot proliferation .	109
2. High-quality transplant production . . . . .	110
<b>Chapter V . Future application of the research results</b> . . . . .	113
<b>Chapter VI . Foreign research results related to bioreactor culture</b> .	115
1. Application of bioreactor system for scale-up production of horticultural transplants . . . . .	115
2. Requirement of further research . . . . .	117
<b>Chapter VII . References</b> . . . . .	119

# 목 차

<b>제 1 장</b>	<b>연구개발과제의 개요</b>	13
1.	연구개발의 필요성	13
2.	연구개발의 목표 및 연구 범위	17
<b>제 2 장</b>	<b>국내외 기술개발 현황</b>	20
1.	기내환경조절을 통한 배양환경개선	20
2.	생물반응기를 이용한 화훼류의 대량생산	21
3.	Microponic System을 이용한 기내생산 국화묘의 순화 및 transplant 생산	23
4.	생물반응기 배양을 통해 생산된 국화묘를 이용한 절화재배	24
<b>제 3 장</b>	<b>연구개발수행 내용 및 결과</b>	25
1.	국화 shoot의 기내증식에 미치는 배양환경의 영향	25
2.	생물반응기를 이용한 국화묘의 대량 증식	47
3.	생물반응기 생산 묘의 기외순화 및 성장	62
4.	생물반응기 생산묘를 이용한 국화재배	92
<b>제 4 장</b>	<b>목표달성도 및 관련분야에의 기여도</b>	109
1.	국화 무병묘의 대량생산을 위한 생물반응기 시스템의 확립	109
2.	고품질의 국화 transplant 생산	110
<b>제 5 장</b>	<b>연구개발결과의 활용계획</b>	113
<b>제 6 장</b>	<b>연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술 정보</b>	115

1. 기내배양환경의 특성 및 조절	115
2. 생물반응기 배양	117
<b>제 7장 참고문헌</b>	<b>119</b>

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1. 연구개발의 필요성

국화는 내한성 숙근초로 생육습성이 강하여 재배가 쉽고 다양한 화형과 우수한 색상을 가지고 있으며 절화수명이 길다. 따라서 세계시장뿐만 아니라 국내시장에서도 가장 중요한 절화작물 및 분화식물로 타 화훼류에 비해 소비처가 다양하여 우리나라 절화 총 생산량의 40% 이상을 차지하고 있으며 소비가 계속 증가하고 있다(Trigiano 등, 1992; Rout 등, 1997). 이처럼 절화류 중에서 각광을 받는 또 다른 이유는 어느 지역에서나 재배가 가능하고 관상가치 및 이용성이 높아 수요가 많다는 점 때문으로 특히, 일본에서 고품질 국화에 대한 소비량이 많아 유망 수출작목으로 떠오르고 있다.

국화의 재배에 있어서는 묘 소질이 균일한 우량묘의 공급이 최우선 과제이며 묘의 생육이 불안정하고 균일하지 못할 때는 생육 전반에 걸쳐 불량하게 되어 상품성 있는 국화 생산이 불가능하게 된다. 국화는 주로 삽목을 통한 영양번식을 하게 되는데 이와 같은 번식법은 증식율이 낮고 삽수를 매년 반복채취하기 때문에 바이러스 및 각종 토양병에 의한 감염율이 높아 묘질이 저하되고 있다. 기존 국화의 주된 번식 방법은 삽목으로서 일시에 다량의 묘를 얻는데는 많은 노동력의 소요와 일장 및 온도를 주어야 하는 번거로움이 있으며 연중 증식 시 모주의 저온처리 및 관리 등의 어려움이 있는 실정이다. 또한, 국화의 모주 관리 시 비배관리 및 환기가 불량하게 되면 삽수의 발근불량, 삽수 냉장 시 부패 등이 우려되며 잎이 황화 하는 현상이 발생할 수 있다. 삽수 채취 모주의 계속된 사용은 묘의 품질이 떨어질 뿐만 아니라 퇴화 및 바이러스 이병 등의 문제점이 있어 모주의 대체가 시급한 실정으로 안전한 모주 생산이 요구되어지고 있다. 그러나 기존의 재배방식은 동지아 번식 및 생산 묘포장이 별도로 설치되어 있어야 하고 겨울철 월동 관리 등이 필요한 실정으로 관리에 어려움이 있으며 10℃ 이하의 한파에는 가온 등이 요구되어 농가 경영비 증가의 원인으로 문제가 되고 있다. 이와 같이 국화 재배에 있어서 묘의 품질이 저하되면 여러 가지 생리장해의 발생이 일어날 수 있으며 생육 전반에 걸쳐 관리가 일정할 수가 없고 절화 품질이 크게 떨어져 우량묘를 이용한 현지 포장으로의 적용이 시급한 실정이다. 이런 문제점을 해결하기 위해서는 성장점 배양을 통한 무병주묘의 기내 대량증식 체계의 확립을 통한 고품질의 국화 생산이 필요하다. 기내 미세 번식은 기존의 영양번식법에 비해 많은 장점을 가지고 있으며 많은 원예작물 및 농작물에 널리 적용되어 왔으나 산업화에는

아직 한계가 있다.

일반적인 조직배양은 낮은  $\text{CO}_2$  농도, 낮은 광합성 유효 광양자속(photosynthetic photon flux, PPF), 높은 상대습도, 배지 내의 높은 당함량, 낮은 공기의 유동 등에 의하여 식물체가 정상적인 광합성률을 유지하기 어려운 환경조건이기 때문에 기외순화율이 낮다(Riek, 1995; Murali와 Duncan, 1995; Van Huylenbroeck 등, 2000). 이러한 불리한 환경 조건에서 성장한 조직배양 식물체의 잎은 대개 잎의 두께가 얇고, 엽록소 a/b의 비율이 낮으며 유리 단백질 함량이 낮은 음지성 식물의 잎이 가지고 있는 특징을 나타내는데, 이는 배양기간 동안 낮은 광도 때문인 것으로 생각된다(Chaves, 1994; Riek, 1995). 따라서 기외 순화과정에서의 환경의 변화, 특히 높은 광도 하에서는 광역제작용(photoinhibition)으로 정상적인 성장을 기대할 수 없게 된다(Van Huylenbroeck, 1994; Van Huylenbroeck 등, 2000). 또한 명기 동안 식물체의 광합성에 의한 배양병 내  $\text{CO}_2$  농도 감소나 낮은 PPF와 환기 불량으로 인해 기내에서의 성장률이 낮으며 투명화 등 생리적 장애 현상이 많이 발생하여 순화과정에서 많은 양의 식물체가 고사하며 성장 속도도 느려 기외 흡수 이용과 비교하여 생산 효율성이 극히 낮은 단점을 가지고 있다(Hahn et al., 1999; Kozai, 1990). 특히, 대량증식 체계를 가장 어렵게 만드는 것은 배양배지, 시설, 인건비 등에 드는 높은 생산비로서 시간과 비용을 절감하면서 품질이 일정한 기내묘의 대량생산에 대한 연구가 절실하다(Jeong 등, 1996; Kozai 등, 1997; Nguyen 등, 1999).

품질이 우수한 기내 무병묘를 대량생산하기 위해서는 식물 성장과 발달을 촉진하고 식물체의 형태적, 생리학적 변이 발생률을 낮추어 증식 효율을 증가시키는 것이 가장 중요하다. 1990년 이후로 기내 배양환경의 개선을 통해 기내묘의 증식효율을 높일 수 있다는 다양한 연구결과가 보고되고 있다(Kozai 등, 1990b; Kozai와 Sekimoto, 1988; Shim 등, 2001a). 즉, 기내 식물체의 성장 및 광합성에 영향을 미치는 중요한 환경요인인 광도(PPF),  $\text{CO}_2$  농도, 온도, 상대습도, 당 농도, 무기이온 성분의 조절, 이온농도 등의 환경요인에 대한 연구가 주로 이루어져 왔다. 그러나 대부분의 실험은 1 liter 이하의 소형배양용기를 대상으로 이루어졌고 액체 배양보다는 고체배양 실험이 주를 이루고 있으며 무엇보다 이를 통해 생산된 기내 식물체의 기외 순화와 성장에 대한 구체적 실험(생리적, 생화학적)이 이루어지지 않아 아직도 실험실 규모를 벗어나지 못하고 있다. 이와 같은 문제를 해결하기 위해서는 생물반응기와 같은 대형 자동 배양장치를 기내 식물체 생산에 적용하고 배양시스템을 최적화할 수 있는 적정 배양 환경이 규명되어야 하고 여기에서 대량생산된 묘를 기외에서 균일하게 키우기 위한

transplant production 시스템이 확립되어야한다. 즉, 무병묘의 기내 생산과 기외생장 시스템을 확립함으로써 노동력과 생산기간이 단축될 수 있고 고품질의 묘를 필요한 시기에 맞추어 공급할 수 있는 원예작물 무병묘의 대량생산 체계 확립이 반드시 필요하다.

다른 원예작물에서와 같이, 국화 무병묘 생산은 기존의 배양 시스템을 이용하여 소규모로 이루어지고 있으며 생산단가가 비싸 무병묘의 대량생산에는 주로 기외 삽목이 주를 이루고 있다(Kim, 2001). 따라서 생산비용을 절감하고 고품질의 무병묘를 일시에 대량생산하기 위해서는 배양용기의 대형화와 이에 따른 적정 환경조절이 필요하다. 이 같은 점에서 생물반응기 배양 시스템을 이용한 국화 무병묘의 대량생산 체계의 확립을 이용한 묘 증식효율의 극대화는 기존의 문제점을 해결할 수 있는 최적의 방법이라 할 수 있겠다.

식물생산에 생물반응기를 적용한 예는 1981년 베고니아의 대량 증식에서 처음으로 보고되었으며(Takayama 등, 1981) 이 기술은 신초, 인경, 소피경, 구경 등을 포함하는 많은 식물에 적용되어왔다(Preil 등, 1991; Akita 등, 1994). 식물의 세포, 조직 및 기관 배양에 있어서 생물반응기를 이용한 배양법은 액체배양배지를 사용한다는 점에서 기존의 조직배양법과 차이를 보이며 플라스크 수준의 현탁배양과 다른 점은 기내 환경을 다양하게 변화시킬 수 있다는 것과 산업화 수준의 대규모 배양이 가능하다는 점이다. 또한 기존의 조직배양 시스템은 많은 노동력과 넓은 시설공간을 필요로 하였고 식물생산 단계가 복잡하여 효율성이 크게 떨어진다는 단점을 가지고 있었다(Bi 등, 1997). 이에 비해 생물반응기는 초기에는 설비가 많이 들지만 장기적으로는 각 식물에 따른 기내 환경의 최적화로 생산 효율성의 증가, 고품질 생산 및 생산비 절감 등의 효과를 얻을 수 있다. 생물반응기는 초기에는 미생물을 통한 발효분야에 주로 이용되었으며 최근에는 인삼을 비롯한 약용식물의 세포 및 뿌리 배양을 통한 유용 물질 대량생산의 산업화에도 성공적으로 이용되고 있다 (Yu et al., 2000, 2001). 그러나 원예 식물 생산에 있어서는 생물반응기 시스템의 적용이 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다. 최근 충북대 첨단원예기술 개발연구센터를 중심으로 백합의 무병종구 생산, 감자 경정배양, 팔레뉴시스, 사과, 포도의 무병묘 증식 등에 다양하게 적용되어 활발한 연구가 이루어지고 있다 (Paek et al., 2001). 또한, 생물반응기를 이용한 배양법은 국화, 아스파라거스, 거베라, 알로에 등 여러 작물의 기내 증식에 이용되어 배양기간을 단축시키고 증식효율을 높이는데 이용되었다(Liang 등, 1997). 그러나 기존의 조직배양 시스템과는 달리 생물반응기 배양에서는 배양 식물 각각의 물리 화학적 환경조건



이 최적화 되어야 증식효율을 최대화 할 수 있을 것이다. 또한 기내 생산된 묘를 이용한 공정묘 생산에서 순화율과 성장속도를 높일 수 있는 새로운 시스템의 개발과 이를 이용한 절화 재배에 대한 실증 실험도 반드시 필요하다. 따라서 본 연구에서는 생물반응기를 이용한 국화의 기내줄기의 대량 생산에 관여하는 물리 화학적 기내 환경 조건에 대한 실험과 새로운 기외 순화 시스템과 절화재배의 확립을 위해 다양한 실험을 수행하였다.

## 2. 연구개발의 목표 및 연구 범위

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (1999년)	- 품종선발 및 기내 증식	현재 국내외에서의 수요 요구도가 높은 국화를 중심으로 품종 선발을 한 후 기내 증식시킨다.
	- 기내 shoot배양의 최적 조건 설정	기내 shoot의 급속 증식 조건 설정: 배지 조성, 당의 첨가 유무, 및 배양기간의 경과에 따른 양분 요구도 등에 대한 실험을 통해 shoot 생산 효율을 최대화 하고 생장 기간을 단축한다.
	- 소규모 생물반응기 제작	생물 반응기에서 기내 shoot의 증식에 가장 적합한 생물 반응기 배양을 위해 생물 반응기의 형태와 배양시스템을 달리 하여 shoot 증식의 차이를 규명한 후 가장 적합한 생물 반응기 system을 결정한다.
	- 기내 미세환경의 조절	생물 반응기에서의 shoot 증식에 영향을 미치는 기내 환경 조건(환기횟수, 광도, CO <sub>2</sub> 농도, 온도 등)을 달리하여 이에 따른 shoot 증식 및 생육 특성을 조사한 후 최적 환경 조건을 확립한다.
	- Light Emitting Diodes (LED)를 이용한 기내 shoot의 증식	Red, Blue, Red+Blue, Green 등 광원을 달리했을 때의 shoot의 증식과 생육 특성을 알고 가장 적합한 광원을 선별한다.

구분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2000년)	- 생물 반응기에서의 shoot 증식 조건 확립	배지의 공급 및 순환 방식(Ebb & flow, submerged culture, spray type)과 온도 등에 따른 shoot 성장을 비교하여 1년차 실험에서 구명된 조건들과 함께 생물 반응기에서의 shoot 증식 시스템을 확립한다.
	- Microponic system에서 지하부 환경조건의 최적화	기내에서 생산된 국화 shoot를 마디별로 잘라 성장과 순화를 동시에 진행시키면서 지하부 환경조건의 최적화를 위해 식물체 성장 및 발근에 가장 적합한 배양액 조건 (pH, EC) 및 배양 방식을 규명한다.
	- Microponic system에서 지상부 환경조건의 최적화	기내에서 대량 생산된 국화 shoot의 성장과 순화를 동시에 진행시키면서 묘 성장과 발근에 관여하는 광도(PPF), CO <sub>2</sub> , 온도 등의 최적 조건을 확립한다.

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 (2001년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Microponic system을 이용한 고품질 국화묘의 대량생산 체계확립</li> </ul>	<p>2차년도 실험에서 규명된 microponic system의 지상부, 지하부 최적환경을 기본으로 묘 생산 소요일수를 단축하고 고품질 묘의 대량생산 체계를 확립한다</p>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 국화양액재배시 일장과 생장조절제 처리에 의한 국화생육과 절화품질 향상</li> </ul>	<p>생물반응기와 microponic culture system에서 생산된 묘와 기존의 삼목묘를 양액재배 했을 때 식물체 생육과 절화품질을 비교하고 지베렐린 에세폰 등의 식물생장조절제를 처리하여 절화 및 재절화 재배 실험을 통한 절화 품질을 향상시킨다</p>

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1. 기내환경조절을 통한 배양환경개선

기내 급속 증식 시스템에 의한 식물체의 생산은 다양한 원예작물에 성공적으로 적용되어 왔지만 높은 생산가와 노동 집약형 체계에 따른 낮은 생산효율이 대량생산을 통한 산업화의 걸림돌이 되고 있다. 즉, 배지조성과 배양용기에 드는 비용, 성장조절제 첨가에 따른 변이체 발생, 기내배양과정 중의 오염으로 인한 손실과 낮은 기외 순화율 등으로 생산효율이 극히 낮아 특정 작물에 한해 제한적으로 이용되어왔던 것이 사실이다. 따라서 기내 급속 증식법을 다양한 원예작물의 번식에 이용하기 위해서는 증식효율을 높이는 것이 무엇보다 중요하다. 배양과정 중의 생리 장애를 줄이고 건전한 식물체를 생산하기 위해 가장 쉽게 개선 할 수 있는 방법이 기내 배양 환경의 개선이다 (Kozai, 1990). 기내 배양환경의 특징으로는 배양용기내의 높은 습도, 온도의 심한 일교차, CO<sub>2</sub> 농도의 급격한 변화, 당의 함유로 인한 오염발생 등을 들 수 있다. 이에 따라 낮은 광합성 속도, 식물체 잎의 기공의 malfunction, 엽 표면 왁스층의 감소, 형태적 변이, 유리화 등의 생리 장애를 보이는 식물체 수가 전체 생산량의 상당수를 차지하게 된다. 따라서 기외 이식 후 정상적인 성장까지의 과정이 복잡하며 기외 순화율을 높이기 위해서는 상당한 노력이 필요하다. 기내 식물체의 이 같은 특성은 상당수 기외와는 다른 기내 환경의 특성 때문으로 간주되었다.

기내 식물체의 성장 및 광합성에 영향을 미치는 중요한 지상부 환경요인으로 광, CO<sub>2</sub> 농도, 온도, 상대습도 및 산소등을 들 수 있으며 지하부 환경요인인 배양배지로서는 당 농도, 이온성분 농도 및 삼투포텐셜과 pH등이 중요한 요인으로 작용한다 (Nguyen 등, 1998). Cournac 등(1992)은 광도(Photosynthetic photon flux: PPF)가 식물체 특히, 신초 생장의 광합성에 미치는 중요한 요인중의 하나라고 하였으며 감자의 광 독립영양배양 시 CO<sub>2</sub> 가 시비되는 조건에서의 높은 PPF는 식물체의 성장 및 광합성 능력을 촉진시킨다고 하였다. Kozai 등(1997)은 온도가 감자의 줄기와 초장에 미치는 영향에 대하여 연구하였으며 온도 조절은 식물체의 초장을 결정하는 중요한 요인

이며 미세 번식의 중요한 기술이라고 하였다. 일반적으로 배양용기 내 환기가 불량한 환경에서 자란 식물체는 잎의 표피 왁스층이 감소하거나, 기공의 형태와 개폐 기능이 불량하다(Blancke와 Belcher, 1989; Donnelly 등, 1987; Han 등, 1992; Shim 등, 2001b; Short 등, 1987). 그러나 Kozai (1990)는 배지에 탄소원(설탕)을 첨가하지 않고 광도와 환기 횟수를 높이면 기존의 배양 방법에 비해 기내 식물체의 성장 및 광합성이 촉진되며 기내 식물체의 생리적, 형태적 이상과 투명화현상이 감소되어 생장이 균일한 건전묘를 생산할 수 있다고 보고하였다. 이후 이러한 광독립영양 배양 방법으로 기내 식물체의 성장을 촉진하고 순화율을 높여 생산단가를 낮출 수 있다는 연구결과가 다양한 원예작물을 대상으로 보고된 바 있다 (kozai et al., 1996; Kubota et al., 1997). Laforge 등(1991)은 딸기와 아스파라거스를 대상으로 기내 및 기외 순화시 생장에 미치는 영향에 대한 실험에서 높은 PPF와 고농도의 CO<sub>2</sub> 조건에서 식물체 생장이 높았고 건전한 기공이 관찰되었으며 엽 외피의 구조도 정상에 가까웠다고 보고하였다. 또한 기외 순화시 생존율이 크게 증가하였고 순화 기간도 약 2주 단축할 수 있다고 하였다.

기내 배양 환경의 개선에 대한 실험은 1995년 이후 국내에서도 다양하게 이루어졌는데 Jeong 등(1995)은 배양실 내 CO<sub>2</sub> 시용, 배지 내 당의 제거, 광도(PPF) 및 배양병의 환기횟수의 증가를 통해 기내 배양 식물체의 성장 및 광합성 속도를 증가시키는 동시에, 배양 식물체 생산에 필요한 생산비를 절감할 수 있다고 하였다. 그 외에도 기내 배양환경의 개선을 통해 식물체 성장과 광합성 속도의 증가 및 형태적 관찰에 대한 보고가 딸기, 거베라, 칼라, 팔레뇨시스 등의 원예작물을 대상으로 이루어졌다 (Chang, 2001; Eun, 1998; Park et al., 2000). 그러나 특정 작물을 대상으로 기내증식 시 배양환경 전반에 걸친 실험이 이루어지지 않아 작물별 배양 최적 조건이 확립되어 있지는 못하고 있다.

## 2. 생물반응기를 이용한 화훼류의 대량생산

생물반응기는 미생물을 이용한 발효분야에 주로 이용되어 왔으나 최근 배양 시스템의 대량화와 자동화에 의한 생산비 절감의 일환으로 식물의 세포나 조직을 대량으로 배양할 수 있는 생물반응기의 개발이 요구되고 있다(Aitken-Christie, 1991). 생물반

응기를 이용한 식물의 조직배양은 재래적 조직배양에 비해 대규모화할 수 있고, 기존 배양시스템의 기술적 한계를 극복할 수 있다. 배양 시스템의 대량화를 위해서는 액체 배지의 이용이 필수적이며 물리환경의 개선과 자동화를 통해 식물체의 생리적 장애를 방지할 수 있어 필요한 양의 배양체를 단기간에 대량 생산할 수 있고 자동화가 가능하여 생산비를 최소화할 수 있다. 또한 각 배양체에 따른 최적 환경조건을 충족시킬 수 있어 고품질의 배양체 생산이 가능하다. 현재 인삼의 경우, 생물반응기를 이용한 부정근 생산에 대한 지속적인 연구를 통해 Biomass의 증가와 이차 대사산물의 대량생산이 가능하게 되었다(Paek 등, 2001). 그러나 아직까지 식물배양용 생물반응기에 대한 연구는 초기단계에 있고 대규모 식물체 배양에의 실제적인 적용의 예는 거의 없는 실정이다. 이는 기존의 문제점 해결을 위한 연구가 필요하고 특히 개발될 경우 부가가치가 높으나 연구개발비와 초기 투자비가 많기 때문인 것으로 생각된다(Paek 등, 2001).

식물생산에 생물반응기를 적용한 예는 1981년 베고니아의 대량 증식에서 처음으로 보고되었으며(Takayama 등, 1981) 이후 생물반응기의 적용 예를 보면, 식물세포(Aitken-Christie 등 1995), 체세포배(Gupta 등, 1993; Preil와 Beck, 1991; Stuart 등, 1987) 및 신초(Akita와 Ohta, 1998), 괴경(Akita와 Takayama, 1988), 자구(Takahashi 등, 1992) 등 식물조직을 배양한 연구 사례가 있고, 대규모화하여 생산비용을 절감하려는 시도도 일부 보고된 바 있다(Son 등, 1999; Vasil, 1991). 생물반응기를 이용한 체세포배의 대규모 생산은 알팔파, 자작나무, 당근, 커피, 가문비나무, 고구마 등에서 이루어졌고(Leather 등, 1995) 기관배양은 감자(Akita와 Takayama, 1993), *Stevia rebaudiana*(Akita 등, 1994) 및 난(Park 등 2000) 등을 대상으로 결과가 보고되었다.

식물의 세포, 조직 및 기관배양에 있어서 생물반응기를 이용한 배양법은 액체배양 배지를 사용한다는 점에서 기존의 조직배양법과 차이를 보이며 플라스틱 수준의 현탁 배양과 다른점은 기내 환경을 다양하게 변화시킬 수 있다는 것과 산업화 수준의 대규모 배양이 가능하다는 점이다. 그러나 국내에서는 원예식물의 대량생산에 생물반응기를 이용한 예가 본 연구센터 이외에는 없어 이에 대한 연구가 반드시 필요한 실정이다. 이에 따라 본 연구에서는 single node cutting을 이용한 식물체 증식의 대표적인 예인 국화 무병묘의 대량생산 시스템의 확립을 위해 생물반응기 배양을 적용하였다. 즉, 기내에서의 묘 생산에 걸리는 시간과 노동력을 감소시키고 물리적 환경의 개선을 통해 노동력의 감소와 배양과정의 일원화를 통해 생산효율을 증가시키기 위해 본 연구를 실시하였다.

### 3. Microponic System을 이용한 기내생산 국화묘의 순화 및 transplant 생산

기내 생산된 식물체를 기외로 옮기게 되면 배양환경의 차이로 많은 스트레스 현상을 보이게 되고 순화과정에서 상당수의 식물체가 고사하게 된다. 기내 배양환경의 개선으로 순화율이 많이 높아지기는 했으나 여전히 그 과정이 복잡하고 많은 시간이 요구되고 있다. 특히 기존의 순화 방법으로는 대량생산된 기내 식물체를 일시에 순화, 성장시키는데 한계가 있어 묘 소질이 균일한 transplant의 대량생산, 공급이 불가능한 실정이다. 이 같은 문제점을 해결하기 위해서는 순화단계를 간소화하고 순화시기를 단축시킬 수 있는 새로운 시스템의 개발이 필요하다.

조직배양된 식물체를 순화하는 과정에서 식물체의 성장과 생존율에 영향을 미치는 중요한 환경요인 중 지상부 조건으로는 PPF, 상대습도, CO<sub>2</sub> 농도, 지상부 온도 등이 있고, 근권부 조건으로는 지지물, 양액농도(EC), pH 등(Desjardins 등, 1987; Hahn 1998)이 있는데, 양액재배 방법은 근권부 환경조건의 조절이 가능한 첨단생산기법으로 최근 각광을 받고 있는 분야이다. Hahn(1998)은 조직배양기술과 양액재배 시스템을 혼합한 형태인 microponic system을 개발하였는데, 지상부와 지하부 환경조건이 조절된 microponic system에서 순화된 식물체가 재래적 방법으로 순화된 식물체에 비하여 월등히 높은 성장과 생존율을 나타내었고 특히, 순화기간의 단축으로 대량생산의 경우 생산비의 절감효과가 크다고 하였다. 양액재배 방법은 토양을 사용하지 않고 인공배지나 배양액으로 작물을 재배하는 방법으로 채소 및 화훼에 광범위하게 받아들여지고 있다. 특히 재배시스템과 배지의 사용이 합리적이며 정량화된 양액조절을 통한 고품질 원예산물의 생산은 물론 생에너지화 또는 생력화가 가능하다. 작물의 종류, 생육단계, 재배 환경 및 계절에 따라 배양액 농도를 달리 제어하기 때문에 각 작물에 가장 최적의 환경을 제공할 수 있게 된다(Schwarz, 1995; Yamazaki, 1984). 이 같은 점에서 볼 때, 기존의 순화방법과 비교한다면 기내 배양묘의 특성을 고려한 배양액과 환경 제어를 통해 고품질의 transplant를 일시에 대량생산할 수 있다는 것이 microponic system의 가장 큰 장점이라 할 수 있다.



#### 4. 생물반응기 배양을 통해 생산된 국화묘를 이용한 절화재배

연작장해를 피하고 상품성이 높은 고품질의 국화를 생산하기 위해서는 양액재배로의 전환이 필요한 실정이고 또한 실제로 양액재배 면적은 증가 추세에 있으나 재배기술이 확실히 정립되지 않은 상태에 있어 국화 양액 재배 기술 확립이 필요한 실정이다. 또한, 국화 재배시 한여름의 고온과 강광으로 인한 초장 감소, 노심 등의 생리장애 발생 등이 문제점으로 대두되는 실정이어서 우량묘 사용과 성장조절제 처리 등에 의한 국화의 절화재배가 필요하다. 기존의 연구 사례를 보면 절화 국화의 품질향상을 위하여 일장반응과 전등 조명등의 광조절을 이용한 개화시기의 조절, 육묘법 개선 및 성장조절제 처리 등의 보고가 있다. 또한 근래에 와서 ethephone 및 BA 등의 처리에 의한 화아분화억제, 적외 작업의 생력화 및 측지수의 증가 등이 보고되고 있다. 또한, 국화 재배시 상품성 향상 및 단경기 생산을 위하여 양액재배법 연구와 성장조절제 처리로 개화기를 단축하고 지상부의 생육환경 개선을 위한 차광 및 멀칭재료 실험 및 재절화 재배 등의 우수 품질의 절화 생산에 대한 보고가 있다.

그러나 현재의 국화 재배는 대부분 노지 및 하우스토양 재배로 겨울철 노지 월동과정을 거쳐 휴면을 타파한 후 월동한 동지아의 삼수를 채취하여 별도의 삼목상 설치로 재배관리한 후 본 포장에 심는 과정을 거치고 있어 여름철 저온시설을 이용한 삼수 저온 처리 시 냉장 중 부패의 우려와 묘가 연약해지는 결과를 초래 할 수 있고 묘소질이 균일하지 않거나 불량묘를 이용하였을 때 지상부의 생육환경 개선을 위한 처리를 동일하게 적용시킬 수가 없게 된다. 이를 해결하기 위해 적용된 생물반응기와 microponic system을 통해 대량 생산된 공정묘(transplant)를 양액재배 하였을 때 생장과 절화 품질을 기존의 방식과 비교하고 성장조절제 처리에 따른 개화시기의 조절 및 상품성 향상에 대한 연구가 필요하다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

본 연구의 진행은 기내 shoot 증식의 효율을 높이기 위한 기초 실험을 실시한 후 생물반응기 실험으로 규모를 확대하여 실시하였다. 이를 위해 국화 shoot의 기내 증식에 관여하는 다양한 물리 화학적 환경 조건을 구명하였고 이들의 결과를 토대로 생물반응기를 이용한 국화 무병묘의 대량증식 체계를 확립하고자 하였다. 이후 생물반응기에서 대량생산된 국화 줄기의 기외 순화 및 생장에 미치는 묘 소질, 삼목용토, 배양액, 광도, CO<sub>2</sub> 등의 다양한 요인들에 대한 실험을 통해 새로운 순화 시스템을 개발하고자 하였으며 최종적으로 본 연구를 통해 생산된 국화묘에 대한 실증 실험을 실시하였다.

### 1. 국화 shoot의 기내증식에 미치는 배양환경의 영향

기내 성장점 배양을 통한 shoot 증식 후 기외에서 순화시켜 사용하는 경우, 현재까지는 주로 배지조건에 치중하여 왔으며 광조건, 온도, 배양용기의 환기 등에 관해서는 연구가 소홀히 되어져 왔다. 따라서 노지에서 순화율이 저하하는 등 많은 문제점이 발생하고 또한 한정된 크기의 배양용기 때문에 신초의 길이 생장이 억제되고 얻을 수 있는 마디의 수가 현저히 감소된다. 원활한 노지순화를 위해서는 배양환경, 즉 광도, 광주기, 배양용기의 환기방안, 기내광합성 유도 등에 대한 연구와 이를 토대로 생물반응기에서 일시에 많은 수의 shoot를 생산할 수 있어야 한다. 이에 따라 본 실험에서는 배양 환경, 배지 조성 등이 국화의 기내 shoot 증식에 미치는 영향을 조사한 후 최적 배양 조건을 확립하였다.

#### 가. 실험방법

##### (1) 배양재료

국화(*Dendranthema grandiflorum Kitam*)의 정단부를 2-3cm로 잘라 잎을 제거하고 중성세제를 이용하여 수돗물에 충분히 수세하였다. 무균상에서 1%의 NaOCl 용액을 이용, 15분간 표면 살균한 후 소독액의 제거를 위해 멸균수로 3-4회 씻어내었다. 염원기를 2매 부착한 shoot tip을 적출한 후 6-benzylaminopurine (BA) 0.5mg · L<sup>-1</sup>와

당이 3% 첨가된 MS (Murashige and Skoog, 1962) 고체 배지에 5주간 배양하여 신태를 유도하였다. 이를 MS 기본 배지에서 뿌리 및 마디신장을 유도한 후 1-1.5cm의 단일 마디를 절단하여 4주 간격으로 계대배양 하여 증식시킨 유식물체를 배양재료로 이용하였다.

## (2) 통계분석

각 실험은 3반복 처리하였으며 이에대한 통계분석은 SAS(SAS Institute, Cary, NC) program을 이용하여 Duncan의 다중검정에 의해 처리하였거나 평균±표준오차로 표시하였다.

### 실험 1. 고체배양과 액체배양에 따른 국화 shoot의 생장

식물재료는 한 매의 잎을 부착시킨 단일마디를 사용하였고 공기 용적이 900ml인 사각형의 유리 배양병에 각각 200ml의 배지를 분주하였다. 배지는 당이 3% 첨가된 Murashige and Skoog (1962) 기본 배지를 사용하였으며 pH는 고압멸균 전 6.2로 하였다. 고체배양에는 Gelrite (Duchefa Biochemie BV)를 2.4 g/L 첨가하였고, 액체배양에서는 0.1 vvm의 공기를 주입하였으며 200ml 수위에 지지대로서 플라스틱 망을 설치하였다. 배양병 당 10마디를 접종하였으며 처리구 당 3반복의 실험구를 두었다. 배양조건은 온도 25°C, 광도(PPF) 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 광주기는 16시간을 명기로 하여 5주간 배양하였으며 배양 소식물체당 지상부와 지하부의 생체중, 건물중 및 초장, 엽수, 엽록소 함량, 엽면적, 경경 및 수분 포텐셜을 측정하였다. 배양방법에 따른 순화율을 알기 위하여 모래를 배양용토로 하여 128구(2.7×2.7×4cm) 연결포트에 각 처리구당 한 매의 잎을 가진 단일마디를 30마디씩 삽목한 후 4주후의 생존율을 조사하였다. 엽록소 함량은 엽록소 측정기 (SPAD-502, Minolta Co. Ltd., Japan)을 이용하여 정단부로부터 완전히 전개된 5번째의 잎에서 측정하였다. 엽면적 측정은 칼라 엽면적 분석시스템 (SKYE INSTRUMENTS Ltd., UK)을 이용하여 소식물체의 잎을 측정하였다. 엽의 수분 포텐셜은 Tru Psi (Decagon, USA)기기를 이용하여 측정하였으며 시료는 정단부로부터 완전히 전개된 5번째 마디까지의 잎을 채취하여 즙을 낸 후 압력 chamber 에 넣고 30분간 warming up 후 측정하였다.

### 실험 2. $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ 비율이 국화의 생육에 미치는 영향

식물재료는 위와 동일하며 배양용기는 사각형의 유리병을 이용하여 0.1vvm의 공기를 주입하였으며 지지대로 플라스틱 망을 배지량 200ml 수준에 설치하였다. 배지는 당 3%가 첨가된 MS 기본 액체배지를 사용하여 질소비율에 따른 국화의 생육을 알고자 MS 기본배지의 총질소 농도 60mM에 근거하여  $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$  비율을 0:60, 10:50, 20:40, 30:30, 40:20, 50:10, 60:0mM 수준으로 처리하였다.  $\text{NH}_4^+$ 의 질소 급원으로는  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 을 사용했으며  $\text{NO}_3^-$ 의 질소 급원으로는  $\text{KNO}_3$ 를 사용하였다. 배양용기 당 10마디를 접종하여 처리구 당 3반복을 기준으로 하였다. 배양조건은 이전 실험과 동일하며 7주간 배양하여 배양소식물체 당 지상부와 지하부의 생체중 및 건물중을 조사하였다. 또한 질소 비율에 따른 초장 및 엽수, 엽록소 함량을 조사했으며 배양 7주 후 식물체의  $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$  이온 흡수량을 분석하였다.

분석은 배양 초기와 배양 후기에 배지를 각각 sampling하여 분석 후 이온 흡수량을 계산하였으며  $\text{NH}_4^+$  양이온 분석은 HPLC (Waters 600s controller, waters 626 pump, waters Co., Milford, USA)에 IC-Pak Cation M/D column(3.9×150mm, Waters Co., USA)을 장착하여 0.1mM EDTA (free-acid)를 이동상으로  $1\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 의 유속으로 용출하여 검출하였다.  $\text{NO}_3^-$ 의 음이온 분석은 IC-Pak HR column (4.6×75mm, Waters Co., USA)을 장착하여 1.6mM  $\text{NaHCO}_3/1.2\text{mM} \text{Na}_2\text{CO}_3$ 를  $1\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 로 용출하여 검출하였다. pH는 배양 5주 후에 배지를 Sampling 하여 pH meter (Triode™, Orion, Co.)로  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  조건에서 측정하였다. 식물체 분석은 생육조사 후 질소 비율별로 소식물체의 잎을 채취하여  $80^\circ\text{C}$ 의 Dry oven에서 48시간 건조 후 미세 입자로 분쇄하여 분석시료를 준비하였다. 식물체 내 전 질소는 시료 1g에  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 을 10ml씩 넣고 분해촉진제 ( $\text{CuSO}_4:\text{K}_2\text{SO}_4=1:9$ )를 넣은 다음  $270^\circ\text{C}$ 에서 2시간 동안 분해한 후 원자흡광광도계(AA 6701, Shimadzu, Japan)를 이용하여 분석하였다.

### 실험 3. 배양온도가 국화의 생육에 미치는 영향

식물재료 및 배양조건은 실험 1,2와 동일하게 설정하였으며 국화 생육에 적절한 기내 배양온도를 알아보기 위하여 배양온도를  $15^\circ\text{C}$ ,  $20^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ,  $30^\circ\text{C}$ 로 다르게 처리하여 5주간 실험을 진행하였다. 배양 5주 후 지상부 생체중, 초장 및 엽면적과 엽수, 엽록소 함량 등을 측정하였다.

#### 실험 4. 광도가 국화의 생육에 미치는 영향

국화 생장에 미치는 광도의 영향을 알기 위해 PPF를 50, 100, 200, 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  수준으로 설정하였다. 배양조건은 이전의 실험과 동일하게 유지하였고 배양 5주 후 지상부 생체중 및 건물중, 초장, 경경, 엽면적, 엽수와 엽록소 함량을 조사하였다. 광도에 따른 광합성 속도를 알기 위하여 배양기간별 기내  $\text{CO}_2$  농도를 배양 1주, 3주, 5주째에 Gas Chromatography를 이용하여 분석하였다.

#### 실험 5. 광질이 국화의 형태형성에 미치는 영향

배지는 당 3%를 첨가한 MS 기본 고체 배지(Agar 0.8%)를 이용하였으며 500ml 유리 배양용기에 배지 70ml를 분주하였고 배양병당 4마디씩 접종하여 3반복으로 하였다. 배양용기의 Plastic 뚜껑에 직경 1cm의 구멍을 2개 뚫고 Membrane filter를 부착하여 환기횟수가 2.8 $\text{h}^{-1}$ 이 되도록 하였다. 배양은 온도 25 $\pm$ 2 $^{\circ}\text{C}$ , 명기 16시간, 상대습도 60 $\pm$ 10%로 조절된 식물생장상(Dasol, 한국)에서 5주간 배양하였고 배양기간동안 광도는 50 $\pm$ 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 로 유지하였다. 실험구는 광질의 차이에 따라 Red(660nm), Blue(450nm)와 Far red(730nm) 3종의 발광다이오드(Light-Emitting Diodes, Good Feelings Ltd., Korea)를 기본으로 하여, Red(R), Blue(B)의 단색광 및 Red+Blue(RB, 0.7:1), Red+Far red(RFr, 1:1.1) 및 Blue+Far-red(BFr, 1:1.6)의 혼합광 처리를 하였고 대조구로서 형광등(FL)을 광원으로 하는 6개의 실험구를 설정하였다. 본 실험에 이용된 LED 단일광, LED간의 혼합광 및 형광등의 파장 분포는 Fig. 1과 같다.

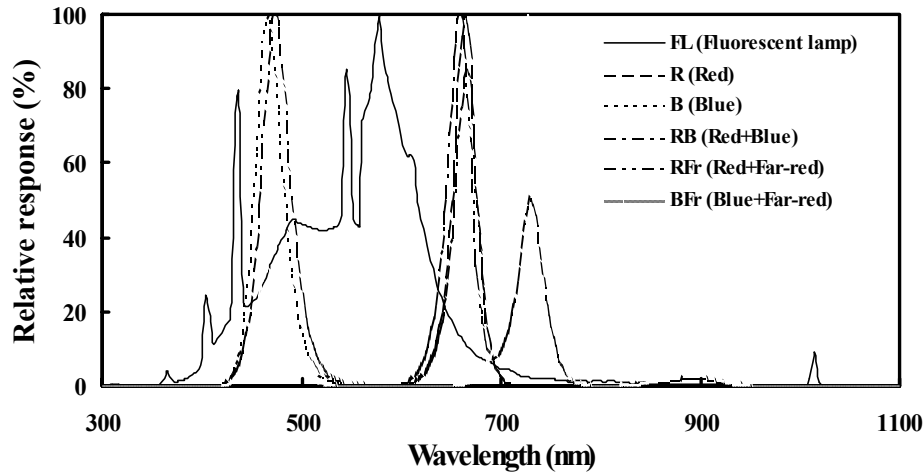


Fig. 1. Spectral distributions of relative energy of the LEDs and fluorescent lamps used as light sources.

배양 5주 후 국화 배양소식물체의 건물중, 초장, 절간길이, 엽록소 함량, 순광합성 속도 및 기공밀도와 크기를 조사하였다. 배양 종료일에 배양기내·외의 CO<sub>2</sub> 농도를 측정하고 Fujiwara 등(1987)의 방법에 따라 소식물체 당 순 광합성속도(Net Photosynthetic Rate: NPR)를 산출하였다.

$$P_n = E \cdot V(C_{in} - C_{ou})K_e/n$$

P<sub>n</sub> : 순광합성속도 (μmol CO<sub>2</sub> plantlet<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)

E: 환기횟수

V: 배양용기 용적

C<sub>in</sub>, C<sub>ou</sub>: 배양용기 내·외의 CO<sub>2</sub> 농도

K<sub>e</sub>: Conversion factor

n: 배양병당 식물체 개수

CO<sub>2</sub> 농도는 gas chromatography (HP 6890 series, Hewlette Packard Co., Wilmington, USA)에 Poraplot Q capillary column(25m×0.53mm, Hewlette Packard Co., Wilmington, USA)을 장착하여 oven 온도 90℃, injector 및 TCD detector의 온도는 200℃로 하고, 운반 가스로 He을 13ml/min의 속도로 용출시켜 검출하였다.

기공을 관찰하기 위하여 정단부로부터 완전히 전개된 5번째의 잎을 3 mm×3 mm

의 크기로 절단한 후에 Formalin-acetic acid-alcohol 용액에 24시간 고정하였다. 고정이 끝난 잎 절편을 증류수로 3회 이상 세척한 다음 0.01% Acridine orange로 15분간 염색하였다. 염색한 잎 절편은 0.01% Rodamin으로 다시 15분간 염색한 후 증류수로 6회 이상 세척하였다. 기공밀도 및 크기는 Krypton-argon mixed gas laser(Bio-rad Microscience Ltd., Hemel Hempstead, Herts, UK)가 장착된 Confocal microscopich system(Bio-Rad MRC 1024ES, U.K)을 이용하여 관찰하였다.

## 나. 결과 및 고찰

### 실험 1. 고체배양과 액체배양에 따른 국화 shoot의 생장

고체배양과 액체배양과의 생육을 비교한 결과는 표 1, 2와 같다. 지상부 생체중 및 건물중은 액체배양이 고체배양보다 2.4배의 증가를 보였으며 지하부는 약 4배로 현저히 증가하였다. 초장과 엽면적도 액체배양이 약 2배가 컸으며 엽수, 엽록소 함량 및 경경 모두 액체배양에서 증가했다. 배양 후 각각 기외 삼목한 결과, 고체와 액체 배양 모두 100%의 생존율을 나타내었다. 그림 3은 배양 6주 후의 액체배양과 고체배양의 생육을 비교한 것으로 전체적인 생육이 액체배양에서 양호하였는데 이는 생장과 분화에 있어 배지성분의 효과는 액체배양과 고체배양에 따라 차이가 있으며 액체배양이 양분 및 식물호르몬의 흡수를 촉진시켜 식물의 생장 발달에 영향을 주었기 때문으로 생각된다(Takayama 등, 1994). Avila 등(1998)도 감자 식물체의 고체배양과 액체배양 비교 실험에서 국화에서의 결과와 유사한 보고를 하였는데, 액체배양에서의 초장과 건물중이 고체배양의 2배였고 엽수는 유의차가 없었으나 액체배양시 절간길이가 길어지는 경향이 있다고 하였다.

일반적으로, 고체배양에 비하여 액체배양에서는 식물의 투명화 현상이 빈번하여 큰 문제점으로 지적되어 왔다. Paek과 Han(1989)은 투명화된 잎은 건전한 잎에 비해 엽록소 함량이 낮고 수분 포텐셜은 높아 생리적 장애의 발생이 많다고 하였으나 본 실험에서는 고체배양과 비교하여 액체배양에서도 잎의 수분포텐셜이 오히려 더 낮았고 투명화 현상도 나타나지 않았다(Table 2). 이는 배양 용기 내 환기 횟수를 일정수준으로 유지하였기 때문에 용기 내 상대습도가 다소 낮아졌기 때문으로 생각되었다(Hahn과 Paek, 2000). 본 실험의 결과에 비추어 국화 묘의 대량생산에는 액체 배양이 고체 배양에 비해 더 효과적임을 알 수 있었다.

**Table 1. Fresh and dry weight of chrysanthemum plantlets after 5 weeks of culture as influenced by solid and liquid cultures.**

		(mg/plantlet)	
		Solid culture	Liquid culture
Fresh weight	Shoot	843.6 ± 21.0 <sup>z</sup>	1985.7 ± 225.6
	Root	85.6 ± 14.1	306.2 ± 35.9
Dry weight	Shoot	65.8 ± 4.1	159.9 ± 14.4
	Root	6.1 ± 0.7	25.5 ± 1.9

<sup>z</sup>Mean ± Standard error.

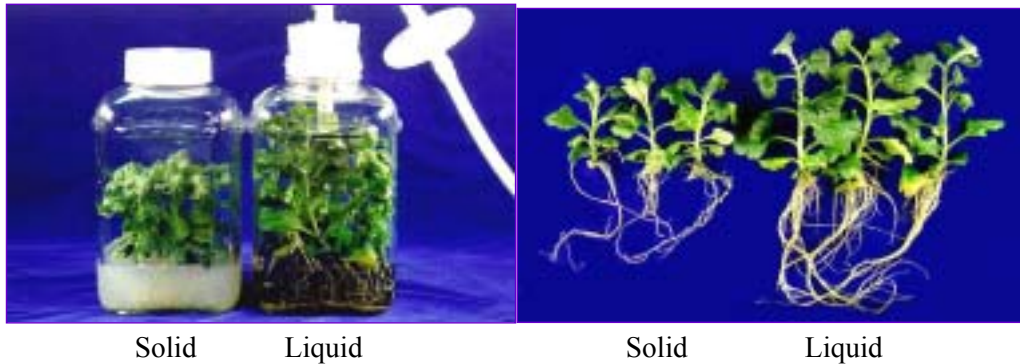
**Table 2. Effect of solid and liquid culture on growth of chrysanthemum plantlets after 5 weeks of culture.**

	Solid culture	Liquid culture
Plant height(cm)	4.8 ± 0.1 <sup>z</sup>	8.3 ± 0.4
No. of leaves (per plantlet)	11.2 ± 0.2	13.4 ± 0.5
Chlorophyll content <sup>y</sup>	40.1 ± 1.4	49.9 ± 1.3
Leaf area (cm <sup>2</sup> /plantlet)	20.4 ± 1.5	42.3 ± 4.5
Stem diameter(cm)	0.21 ± 0.002	0.25 ± 0.002
Water potential(Mpa)	-2.40 ± 0.5	-2.84 ± 0.7
Plantlet survival(%)	100	100

<sup>z</sup>Mean ± Standard error.

<sup>y</sup>SPAD value of leaves.





**Fig. 3. Plantlet growth in solid and liquid culture in 6 weeks.**

## 실험 2. $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ 비율이 국화의 생육에 미치는 영향

질소 비율에 따른 국화의 생체중 및 건물중을 조사한 결과는 표 3과 같다.  $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$  비율이 20:40인 처리구에서 지상부 생체중 및 건물중이 가장 높았으며 100%  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  처리구에서는 생육이 완전히 억제되었다.  $\text{NO}_3^-$  비율이 높을수록 지상부의 생장이 증가했으며,  $\text{NH}_4^+$  비율이 증가함에 따라 식물 생장은 억제되었다(Fig. 5). 이는  $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$  비율이 낮을수록 탄소 및 질소의 이용이 증가되어 생장이 촉진되었던 것으로 생각되었다(Hidder 등 1994; Avila 등, 1998; Hahn 등, 2000). 대부분 식물은 영양생장기간에 질소에 의존하며 식물에 흡수될 수 있는 질소형태는 질산태 질소( $\text{NO}_3^-$ )와 암모늄태 질소( $\text{NH}_4^+$ )로 식물의 종과 발달단계에 따라 흡수 능력과 이용형태도 상당히 다르다(Williams, 1995). 그러나  $\text{NH}_4^+-\text{N}$ 의 비율이 지나치게 높은 경우, 배지 내 다른 양이온의 흡수를 방해하여 전반적인 식물체의 생장을 억제하는 것으로 알려져 있다.  $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$  비율에 따른 초장, 엽수 및 엽록소 함량을 비교한 결과, 그 비율이 10:50, 20:40인 처리구에서 초장과 엽수가 증가했으며 엽록소 함량은 0:60과 50:10, 그리고 60:0을 제외한 나머지 처리간에는 유의차가 나타나지 않았다(Table 4.)

**Table 3. Effects of  $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$  ratio in the medium on fresh and dry weight of chrysanthemum plantlets after 5 weeks of culture.**

$\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ ratio(mM)	Fresh weight		Dry weight	
	Shoot	Root	Shoot	Root
0:60	1027.5 d <sup>z</sup>	189.9 b	89.2 bc	14.5 ab
10:50	1938.2 b	145.2 b	154.9 b	11.4 b
20:40 <sup>y</sup>	2822.8 a	252.9 ab	201.1 a	18.5 ab
30:30	1564.2 bcd	159.6 b	112.9 c	11.6 b
40:20	1652.5 bc	223.2 ab	119.5 bc	15.7 ab
50:10	1117.8 cd	304.5 a	90.5 c	20.1 a
60:0	117.1 e	0.0c	11.2 d	0.0 c

<sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan' s multiple range test,  $p \leq 0.05$ .

<sup>y</sup>Cont. MS basal medium.

**Table 4. Effects of  $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$  ratio on plant height, number of leaves and chlorophyll content of chrysanthemum plantlets after 5 weeks of culture.**

$\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ ratio(mM)	plant height (cm)	No. leaves (per plantlet)	Chlorophyll content <sup>z</sup>
0:60	6.7 c <sup>y</sup>	12.2 c	29.4 b
10:50	9.6 a	17.0 a	43.1 a
20:40 <sup>x</sup>	10.1 a	17.6 a	43.1 a
30:30	8.1 b	14.0 b	41.0 a
40:20	5.4 d	12.4 c	40.7 a
50:10	2.8 e	8.0 d	29.6 b
60:0	0 f	0 e	0 c

<sup>z</sup>SPAD value of leaves.

<sup>y</sup>Mean separation within columns by Duncan' s multiple range test,  $p \leq 0.05$ .

<sup>x</sup>Cont. MS basal medium.

배양 7주 후 식물체의 질소 흡수량을 조사한 결과, 생장이 가장 양호했던 20:40 처리구에서 그 흡수량 또한 가장 높음을 알 수 있었다(Fig. 4). 이는 대체로 질산태 질소가 식물의 생육에 보다 잘 이용되는 형태이며, 암모늄태 질소와 질산태 질소를 각각 단용하는 것보다 두 형태가 조합될 때 흡수율이 높게 나타난다고 한 이전의 연구 결과들과 같은 경향을 보였다(Fonseka 등, 1997; Park 등, 1998). 배양 후 식물체 잎에서의 무기물 함량을 조사한 결과,  $\text{NO}_3^-$  비율이 높았을 때 엽 내 K, Ca, Mg 함량이 비교적 높아 질산태 질소가 식물의 생육에 더 많이 이용된다는 것을 알 수 있었다(Table 5). 배양 후 배지의 pH를 측정한 결과는 표 5와 같았는데, 배양기간 동안의 pH의 변화는  $\text{NO}_3^-$ 와  $\text{NH}_4^+$ 의 공급과 흡수량의 변화와 이에 따른 나머지 이온 흡수의 불균형 때문인 것으로 보고되고 있다(Eymar 등, 2000; Williams 등, 1990).

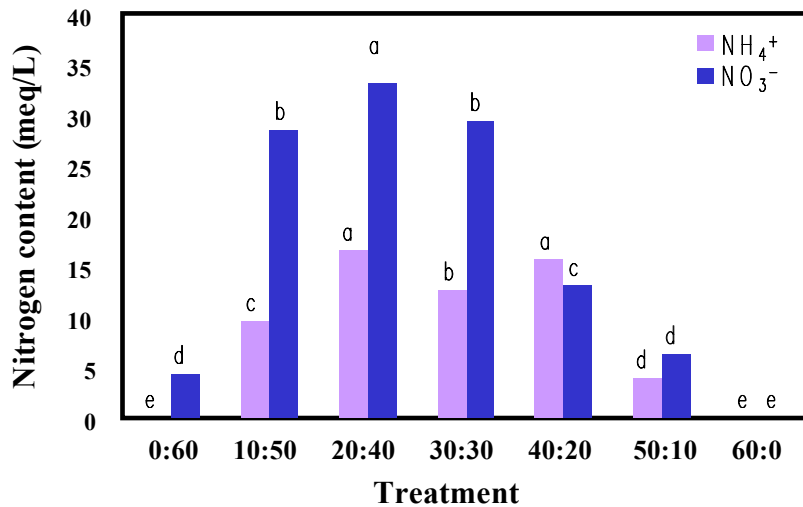


Fig. 4. Consumption of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  after 7 weeks of culture.

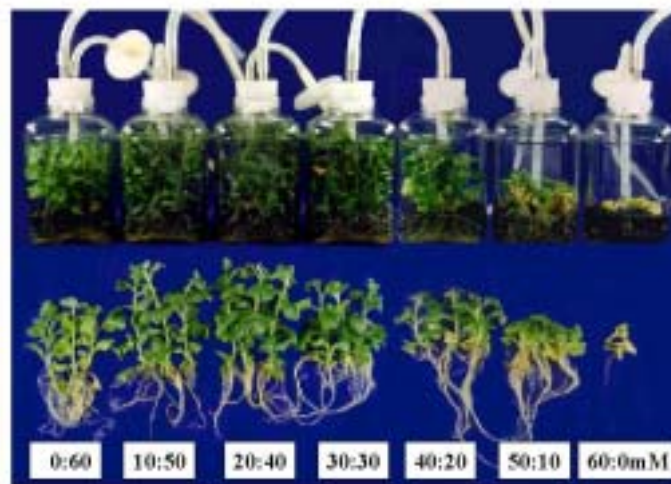
**Table 5. Mineral contents in leaves of chrysanthemum plantlets as affected by  $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$  ratio in the medium.**

$\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ ratio(mM)	pH	Mineral content(%)			
		N	K	Ca	Mg
0:60	7.44	1.63 c <sup>z</sup>	9.85 a	1.27 c	0.23 a
10:50	4.68	1.49 d	8.11 b	0.27 f	0.21 c
20:40 <sup>y</sup>	3.68	1.41 d	7.91 c	3.00 a	0.22 b
30:30	3.63	2.59 b	7.64 d	0.67 e	0.21 d
40:20	3.51	2.69 b	4.91 e	2.87 b	0.18 f
50:10	3.56	2.96 a	3.10 f	0.97 d	0.20 e
60:0	4.33	0 e	0 g	0 g	0 g

<sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test,  $p \leq 0.05$ .

<sup>y</sup>Cont. MS basal medium.

\*culture period: 7weeks.



**Fig. 5. Growth of Chrysanthemum plantlets as influenced by  $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$  ratio.**

### 실험 3. 배양온도가 국화의 생육에 미치는 영향

식물체당 지상부 생체중, 초장, 엽면적, 엽수, 엽록소 함량 모두 25℃에서 가장 높게 나타났고 특히 초장의 경우 15℃에 비해 4배에 가까운 줄기신장을 보였다(Table 6). 국화는 저온성 작물로서 20℃가 생육적온이나 생육단계나 그 밖의 환경조건에 따라 적정 온도의 범위가 달라 질 수 있다 (Schwarz, 1995). 일반적으로 기내 배양식물체의 경우, 증식 속도를 고려하여 25℃로 유지하고 있으며 Hahn 등(1998)도 이와 유사한 결과를 보고하였다. Jacobson 등(1998)은 온도가 국화의 줄기 및 절간길이에 미치는 요인중의 하나로 특히 주야간 온도의 조절에 의한 식물 생장의 차이를 보고하였다. 또한, Nguyen 등(1998)도 온도 조절로 초장을 임의로 조절하는 것이 우량묘를 생산하는 대량번식에 중요한 기술이 될 수 있다고 하였다. 따라서 줄기신장에 따른 건전한 마디를 확보하기 위해서는 배양 온도 뿐 아니라 주야간 온도차(DIF)에 대한 연구도 필요하다.

**Table 6. Effects of air temperature on growth of Chrysanthemum plantlets.**

Air temperature (°C)	Fresh weight (g/plantlet)	Plant height (cm)	Leaf area (cm <sup>2</sup> /plantlet)	No. of leaves (per plantlet)	Chlorophyll content <sup>z</sup>
15	1.0 b <sup>y</sup>	2.7 c	14.8 d	12.0 c	34.8 b
20	1.5 a	6.1 b	35.5 b	13.3 b	35.3 b
25	2.0 a	9.5 a	42.7 a	15.3 a	44.2 a
30	1.3 b	5.9 b	21.4 c	13.7 b	39.0 b

<sup>z</sup>SPAD value of leaves.

<sup>y</sup>Mean separation within columns by Duncan' s multiple range test, p≤0.05.



**Fig. 6. Growth of chrysanthemum plantlets as influenced by air temperatures.**

#### 실험 4. 광도가 국화의 생육에 미치는 영향

광도 조건을 50, 100, 200, 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  수준으로 처리하였을 때 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 에서 지상부 생체중 및 건물중이 가장 높았다(Fig. 7). 초장 및 엽면적도 PPF 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 에서 가장 높게 나타났고 특히 초장은 PPF 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 과 PPF 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 에 비해 2배 이상 크게 증가하였다(Table 7). 엽수에 있어서는 처리간 유의 차가 없었으며 경경 및 엽록소 함량은 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  수준에서 가장 높았으나 초장은 짧아지면서 과번무한 형태의 식물체 성장을 보였다(Fig. 9).

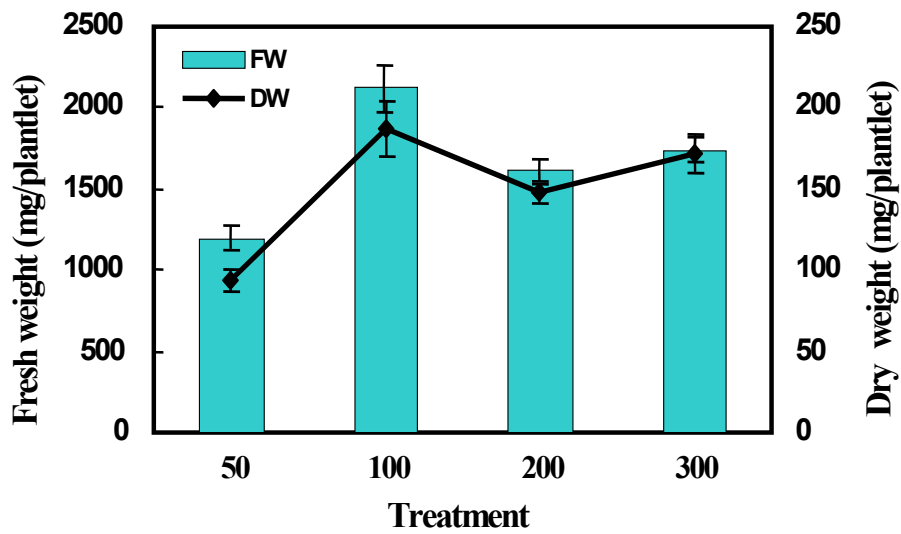


Fig. 7. Effects of PPF on fresh and dry weight of chrysanthemum plantlets after 5 weeks of culture. Vertical bars represent mean  $\pm$  SE.

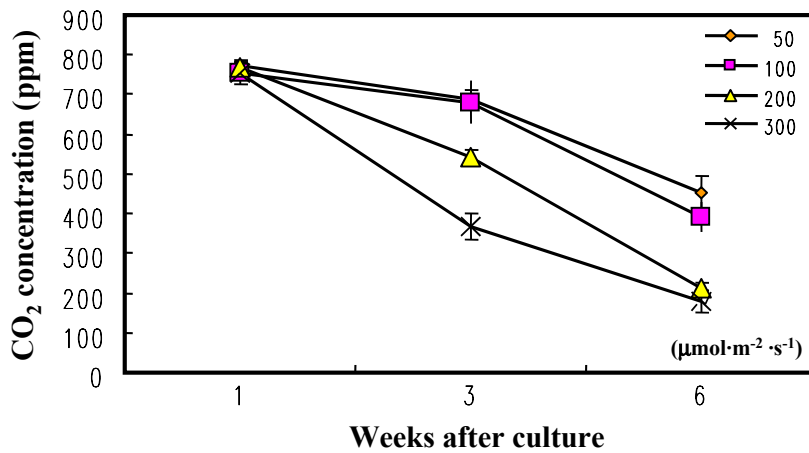
Table 7. Effect of PPF on growth of chrysanthemum plantlets after 5 weeks of culture.

PPF ( $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )	Plant height (cm)	Stem diameter	Leaf area ( $\text{cm}^2$ )	No. leaves (per plantlet)	Chlorophyll content <sup>z</sup>
50	8.4 b <sup>y</sup>	0.17 d	21.2 c	13.0 a	39.5 c
100	11.0 a	0.25 c	39.5 a	14.0 a	38.6 c
200	5.0 c	0.29 b	27.8 b	13.8 a	43.3 b
300	3.7 d	0.32 a	25.7 bc	14.2 a	53.0 a

<sup>z</sup>SPAD value of leaves.

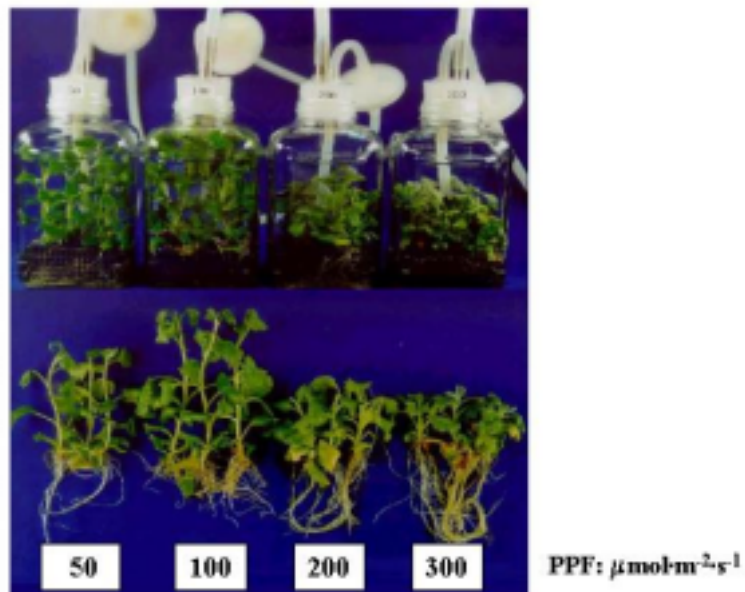
<sup>y</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test,  $p \leq 0.05$ .

광도에 따른 배양기간별 기내 CO<sub>2</sub> 농도를 조사한 결과는 그림 8과 같다. 배양기간이 지날수록 기내 CO<sub>2</sub> 농도는 감소하였으며, 광도가 높을수록 그 농도가 낮았는데 이는 광도의 증가에 따른 식물체의 광합성 속도 증가로 인한 결과로 생각되었다. PPF의 증가는 광합성과 성장을 촉진시키는 효과와 함께 엽록소 함량에도 영향을 끼친다고 한다(Nguyen 등, 1998). 그러나 적정 광도 이상의 PPF는 식물체 신장을 억제하고 마디 간격을 줄이는 등 식물 생육에 부정적 영향을 미친다. 본 실험에서도 PPF 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 에서는 생장이 억제되었는데 이는 광도의 영향 뿐 아니라 고광에 의한 온도의 상승으로 인한 부정적 영향 때문으로 생각되었다. Jeong 등(1996)은 카네이션 기내 배양시 PPF가 높을수록 생체중과 건물중 및 엽면적은 증가하지만 초장이 짧아짐과 동시에 엽수도 감소한다고 보고하였다. Nguyen 등(1999)은 적정 PPF보다 높은 광조건은 식물 성장을 저해한다고 하여 식물체의 대량생산에는 효과적이지 않다고 하였다. 본 실험에서는 PPF 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 이 국화 식물체 배양에 가장 효과적이었다.



**Fig. 8. Changes in CO<sub>2</sub> concentration in the culture vessel during the culture period.**





**Fig. 9. Growth of Chrysanthemum plantlets as influenced by PPF levels.**

#### 실험 5. 광질이 국화의 형태형성에 미치는 영향

실험개시 35일째 국화 배양소식물체의 생장은 형광등 및 적색광과 청색광을 혼합 조사한 RB구에서 가장 증가하였고 청색광과 원적색광을 혼합 조사한 BFr구에서 생체중, 건물중, 엽면적 및 엽록소 함량이 가장 낮았다(Table 8). 형광등과 RB에서 소식물체의 엽면적은 다른 실험구에 비해 2배 이상 증가하였다. 단일광 조사구인 R구와 B구 및 적색광과 원적색광의 혼합 조사구인 RFr구간에는 유의차가 없었다. Tanaka 등(1998)도 Cymbidium 기내 배양시 적색이나 청색의 단일광을 조사했을 때 보다 적색과 청색을 혼합 조사한 실험구에서 식물체의 생체중 및 건물중이 증가하나 대조구인

형광등구와 혼합광 실험구 간에는 유의차가 인정되지 않는다고 하여 본 실험의 결과와 일치하였다. 엽록소 함량은 BFr구를 제외한 모든 실험구에서 광질에 따른 유의차를 보이지 않았다. 엽록소 함량에 미치는 단색광의 효과를 보면 청색광은 촉진적인데 비해 원적색광과 혼합했을 경우 억제되었고 적색광의 경우 원적색광과 혼용하면 촉진되는 현상을 관찰할 수 있었다. McMahon 과 Kelly (1999)는 적색광을 반사시키고 청색광을 흡수하는 CuSO<sub>4</sub> 필터 하에서 자란 국화의 엽록소 함량이 적색의 단일광 조사 조건에 비해 엽록소 함량이 높다고 보고하였으나 본 실험에서는 청색과 적색의 단색광 조사구간에는 유의차가 없는 것으로 나타났다. 식물체 생장에 미치는 광질의 영향은 식물체의 종류, 환경조건 등에 따라 같은 파장의 광에서도 다르게 나타나 광질에 따른 식물체 내 효소 발현이나 탄수화물 대사 등에 대한 연구가 병행되어야 할 것으로 생각되었다.

**Table 8. Effects of light quality on growth of chrysanthemum plantlets.**

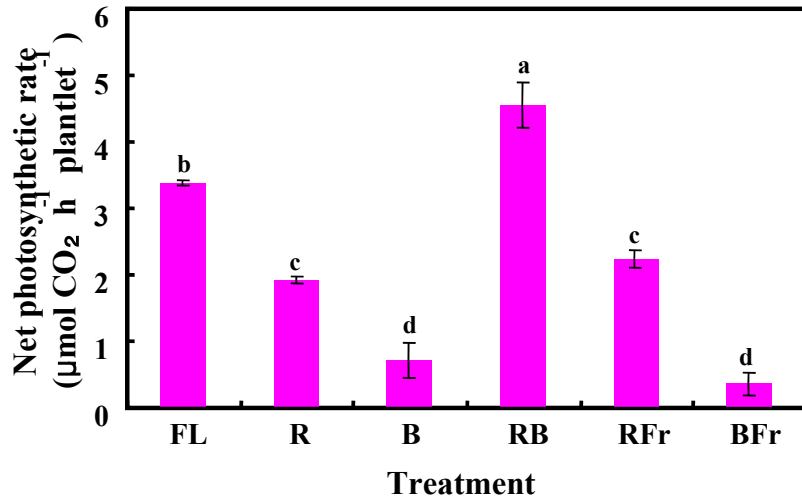
Light quality	Fresh weight	Dry weight	Leaf area (cm <sup>2</sup> /plantlet)	Chlorophyll content <sup>z</sup>
	(mg · plantlet <sup>-1</sup> )			
FL (Fluorescent lamp)	713.0 a <sup>y</sup>	57.9 a	13.1 a	37.4 ab
R (Red)	446.2 bc	39.7 b	9.4 b	34.7 b
B (Blue)	361.1 c	28.4 cd	8.0 b	38.1 ab
RB (Red+Blue)	750.3 a	61.2 a	20.1 a	39.9 a
RFr (Red+Far red)	498.7 b	35.8 bc	10.1 b	36.1 b
BFr (Blue+Far red)	254.7 d	22.7 d	4.0 c	31.2 c

<sup>z</sup>SPAD value of leaves.

<sup>y</sup>Mean separation within columns by Duncan' s multiple range test,  $p \leq 0.05$ .

국화 배양소식물체당 순광합성속도(Net Photosynthetic rate, NPR)는 적색광과 청색광을 혼합 처리한 RB구에서 최대를 나타내었으며 BFr구에 비해 13배가 증가되었다 (Fig 10). 또한, R구와 RFr구, B구와 BFr구간에서는 통계적 유의차가 인정되지 않았다. 일반적으로 식물 잎의 광흡수율은 적색과 청색의 파장대에서 높은 것으로 알려져 있는데, 이 파장대의 광을 조사한 실험구인 RB구에서 식물체의 생장에 효과적인 영향을 미쳐서 국화의 건물중, 엽면적 및 순광합성속도가 현저하게 증가한 것으로 생각된다(Taiz 와 Zeiger, 1991). Goins 등(1997)은 적색광에 청색광을 보광한 밀재배 실험을 통하여, 청색광과 적색광을 동시에 조사하면 밀의 지상부 건물중과 순광합성 속도가 증가한다는 것을 보고하였는데 이와 같은 실험결과로부터 적색과 청색의 파장대는 식물체의 엽록소 흡수 파장대와 일치하며 식물체의 광합성속도를 증가시키는 파장임을 기내 실험으로서도 확인할 수 있었다. 또한 적색광 및 적색광과 원적색광의 혼합 처리 시 순광합성 속도는 청색광 및 청색광과 원적색광을 혼합 처리한 구에 비해 2배 이상 증가하였다. 이러한 결과는 단색의 적색광 하에서 자란 밀이 형광등이나 적색광과 청색광을 혼합 조사한 실험구보다 CO<sub>2</sub> 동화율이 낮기 때문에, 기공전도도가 낮아 순광합성 속도가 낮고 기공의 광반응은 적색광 보다는 청색광에 의해 영향을 받는다는 Goins 등(1997)의 실험결과로 설명할 수 있었다.

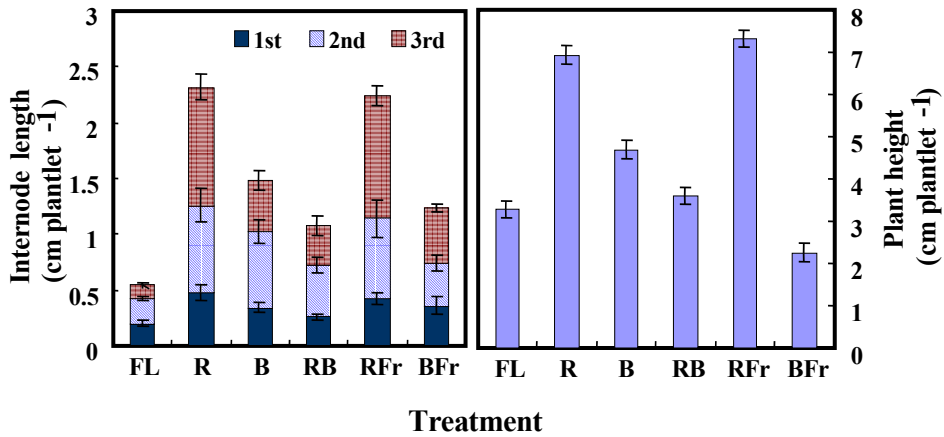
순광합성율은 청색광에 비해 적색광에서 배양된 식물체에서 더 높았는데 이는 식물체에 적색광을 조사하면 Photosystem I 과II에 유효한 빛에너지의 불균형을 초래하고 전자전달 체계가 변화함으로써 순광합성속도가 저하한다는 보고(Tennessen 등, 1994)와는 반대되는 결과였다. 그러나 적색광의 효과는 광도에 따라 달라질 수 있고 한편, Tennessen 등(1994)은 칩(Kudzu) 식물에 광도가 175 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  인 적색광을 조사한 결과, 형광등에서 자란 것보다 광합성이 증가한다고 보고하였다. 그러나 광도를 175 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  이상으로 높인 조건에서는 오히려 적색광 하에서 광합성속도가 낮아졌다고 하였다. 따라서 광도에 따라 NPR에 미치는 청색 및 적색의 광질의 효과가 달라진다는 것을 알 수 있었으며 배양배지 내 당의 첨가 유무에 따라 순 광합성에 미치는 광질의 효과에 차이가 있다는 보고도 있어 (Hahn 등, 2000) PPF 및 Sucrose에 따른 광질 실험도 이루어져야 할 것으로 생각되었다.



**Fig. 10.** Effect of light quality on net photosynthetic rate of chrysanthemum plantlets after 35 days in culture. Vertical bars represent mean  $\pm$  SE.

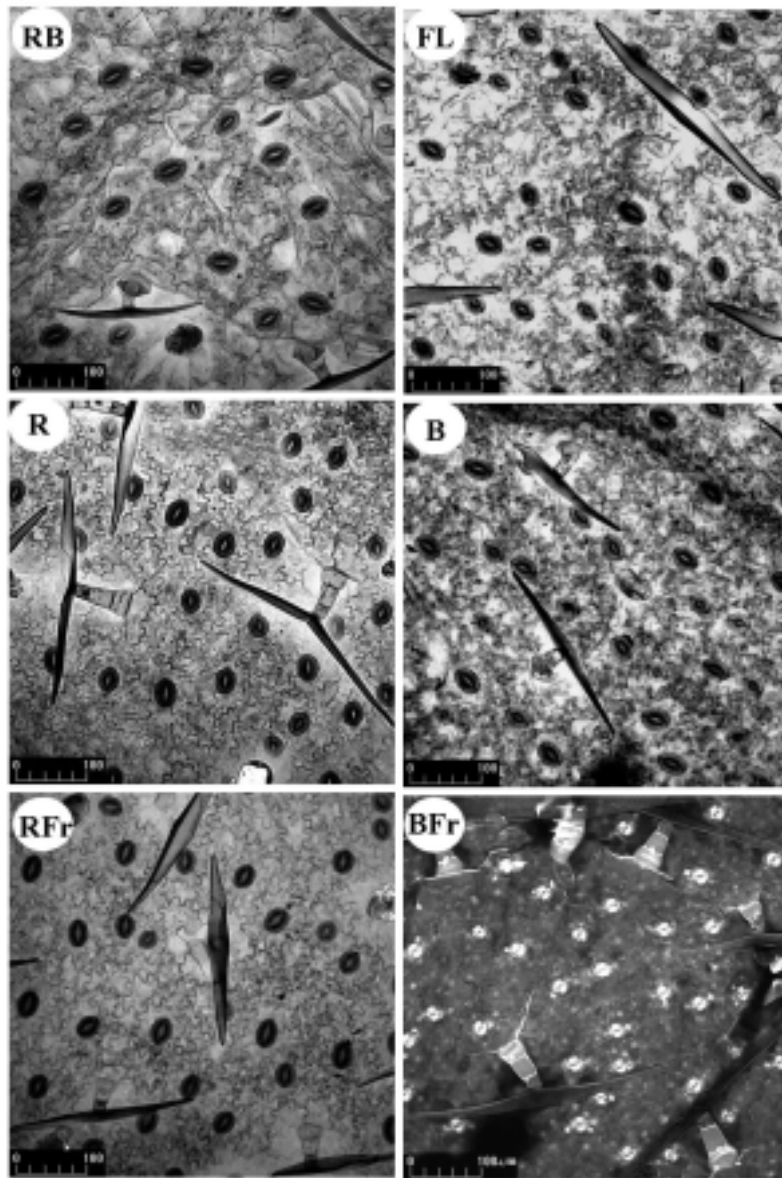
제 1, 2 및 3 절간길이(식물체의 기부로부터 첫 번째, 두 번째와 세번째 마디길이)는 R구와 RFr구에서 길어지는 경향을 나타냈다(Fig. 11). 식물체의 초장은 BFr구에서 가장 짧았으며 그 다음으로 대조구인 FL구와 RB구에서 짧았고, R구와 RFr구에서 커지는 경향이였다. 또한, R구와 RFr구의 초장은 BFr구에 비해 약 3배 이상 증가한 결과로 보아 줄기 신장의 효과가 현저한 것을 알 수 있다. 적색의 단일광 처리나 적색과 원적색의 혼합광 처리에 의해 식물체의 줄기신장이 촉진되는 것으로 보아 청색, 적색 및 원적색광의 적절한 혼합 조사(혼합광질이나 혼합비율 조절)가 기내 배양묘나 플러그 묘 생산에 있어서 식물체의 줄기신장을 억제시키거나 촉진시킬 수 있는 수단으로 이용될 수 있다고 생각되었다(John 등, 1993). 한편, 원적색광과 적색광의 비율(FR:R)을 조절하여 피망(Decoteau 등, 1990) 이나 국화(Oyaert 등, 1999) 배양소식물체의 초장을 조절할 수 있었는데, FR:R비율이 낮을 때보다 높을 때가 50%이상 초장의 길이가 증가한다고 하였다. Kasperbauer 와 Hunt(1992)는 적색광과 원적색광의 비율에 따른 목화 식물체의 형태적 반응을 조사한 결과 FR:R비율이 높을 때 줄기가 길고 굵게 발달하며 신초/뿌리 비율이 높아지고 뿌리의 발달이 저하한다고 보고하였다.

이와 같은 실험결과들은 뿌리생장의 저해나 초장의 조절과 같은 성장 반응은 식물체 내의 파이토크롬에 의한 가역반응을 통해 이루어진다는 것을 시사한다고 할 수 있다. 본 실험의 결과는 기내에서 다량의 삼수 채취를 할 경우 기내 식물체의 초장 조절에 LED의 이용 가능성을 시사하였다(Reddy 등, 1996).



**Fig. 11. Effects of light quality on internode length and plant height of chrysanthemum plantlets after 35 days in culture. Vertical bars represent mean  $\pm$  SE.**

광질은 국화 소식물체의 기공 형태 및 밀도에도 영향을 미쳤다. 적색광과 청색광을 혼합 조사한 실험구인 RB구에 있어서 기공의 수는 적었으나 다른 처리구에 비해 기공의 크기가 컸던 반면 청색광과 원적색광을 혼합 조사한 처리한 BFr구의 기공의 밀도는 RB구에 비해 1.7배였으나 기공의 크기가 가장 작았다(Table 9) (Fig. 12). 이 밖에도 광합성에 효과적인 과장으로 알려진 적색과 청색의 광을 조사함으로써 식물체의 기공열림을 촉진시킬 수 있고 청색광은 광합성에 관여하는 엽육세포와 공변세포에 직접적인 영향을 미치기 때문에 기공열림에 있어서 적색광보다 효과적이라고 알려져 있다(Taiz 와 Zeiger, 1991). 본 실험에서 청색광, 적색광 및 원적색광을 혼합조사한 결과, 단일광 보다 청색과 적색의 혼합광을 조사하는 것이 기공발달 뿐만 아니라 기공발달에 따른 광합성 촉진에 효과적인 것으로 나타났다. 광질에 따른 국화의 성장도 차이가 있었다(Fig 13).



**Fig. 12. Leaf stomata of chrysanthemum plantlets cultured under different light qualities for 35 days. Laser scanning confocal imaging system was used for observation of stomata (FL: Fluorescent light, RB: Red and Blue LED, R: Red LED, B: Blue LED).**

**Table 9. Effect of light quality on number and size of leaf stomata in chrysanthemum plantlets.**

Light quality	No. stomata per mm <sup>2</sup>	Size(μm)	
		Diameter <sup>z</sup>	Length
FL (Fluorescent lamp)	76.9 d <sup>y</sup>	30.1 b	38.4 bc
R (Red)	87.3 b	29.7 b	37.4 c
B (Blue)	81.9 c	30.1 b	39.9 b
RB (Red+Blue)	56.4 e	32.9 a	44.7 a
RFr (Red+Far red)	80.6 cd	28.8 c	37.1 c
BFr (Blue+Far red)	98.7 a	24.3 d	31.7 d

<sup>z</sup>Including guard cell.

<sup>y</sup>Mean separation within columns by Duncan' s multiple range test,  $p \leq 0.05$ .

LED system을 이용하여 광질을 달리 하였을 경우, 단색광 조사보다는 식물체의 성장과 형태형성에 관여하는 청색광과 적색광을 혼합 조사하는 것이 성장 및 광합성을 촉진시킨다는 것을 알 수 있었다. 앞으로의 실험에서는 배양기간 동안 광도나 이산화탄소 농도를 증가시키고 배지에 당을 첨가하지 않은 광독립영양배양 조건하에서 혼합광 처리에 의해 기공의 개폐활동을 증가시킨다면 식물체의 성장 및 광합성속도를 더욱 촉진할 수 있을 것으로 기대된다. 현재, LED가 여러 배양기내·외식물체의 성장 및 형태형성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으나, 아직은 단가가 비싸다는 경제적 이유로 식물 조직배양이나 대량생산 시스템에 상업적으로 적용하기는 어려운 실정이다. 그러나 식물체의 성장 및 형태형성에 필요한 파장역을 갖는 LED만의 장점을 이용하여 국화 이외의 다양한 기내 배양소식물체를 대상으로 성장 및 형태형성에 미치는 광질의 효과를 구명할 필요가 있다고 생각되었다.

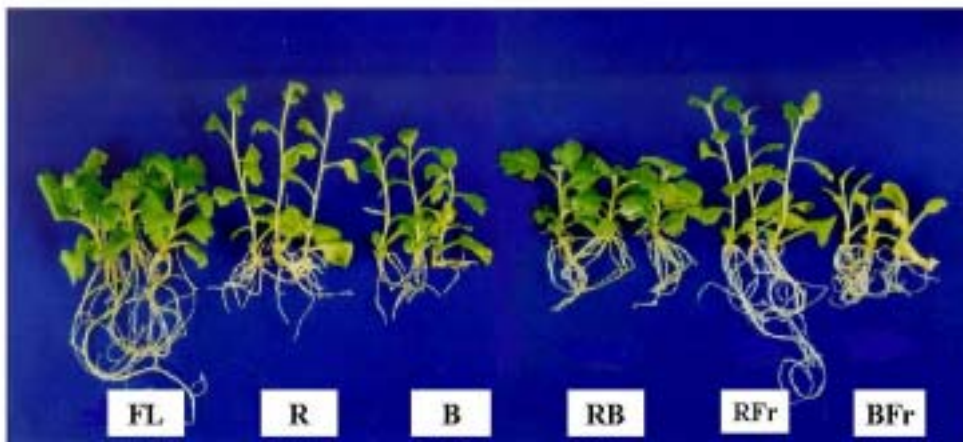


Fig. 13. Growth of chrysanthemum plantlets under different light qualities.

## 2. 생물반응기를 이용한 국화묘의 대량 증식

기내 배양환경에 대한 결과를 토대로 생물반응기를 이용한 국화 shoot의 대량 증식 시스템을 확립하기 위해서는 생물반응기의 형태와 배양기 내 물리환경을 최적화하는 것이 반드시 필요하다. 이에 따라 생물반응기 형태, 공기 주입량, 배지 공급방식, 배양 밀도에 따른, 식물체 성장, 이온 흡수, 광합성, CO<sub>2</sub> 농도의 변화 등에 대한 실험을 실시하였다.



### 가. 실험방법

배양 재료는 기내 환경 실험에서와 동일하게 사용하였고 배지는 당 3%를 첨가한 MS 기본 액체배지를 사용하였다. 배양조건은 온도 25℃, 광도  $100\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 으로 하였으며 광주기는 16시간으로 하였다. 각 실험은 3반복 처리하였으며 이에대한 통계분석은 SAS(SAS Institute, Cary, NC) program을 이용하여 Duncan의 다중검정에 의해 처리하였거나 평균±표준오차로 표시하였다.

실험에 사용한 생물반응기의 형태는 Fig. 14와 같다.



Balloon type

Column type

Modified cone type

Fig. 14. Different types of bioreactor used in the experiment.

#### 실험 1. 생물반응기 내 공기 주입량이 국화 shoot 성장에 미치는 영향

1L 생물반응기 배양시 배지량(200ml)의 10%에 해당하는 공기를 cc/min의 양으로 주입할 경우 이를 0.1vvm이라 하며 이를 기준으로 0, 0.05(10cc/min), 0.1(20cc/min), 0.3(60cc/min), 0.5(100cc/min) vvm의 수준으로 공기를 주입하였다. 5주 배양 후 지상부 생체중, 초장 및 엽수, 엽면적, 엽록소 함량을 조사하였다.

#### 실험 2. 생물반응기 내 접종 밀도가 국화의 성장에 미치는 영향

10L 생물반응기에 배지를 1.5L 분주한 후 생물반응기당 각각 20마디, 40마디, 60마

다, 80마디를 접종하였다. 배양 10주 후 식물체의 지상부 생체중, 초장, 줄기두께, 및 분지수와 엽수 등을 조사하였다.

### 실험 3. 생물반응기 배양방식(배지공급)이 국화의 생장에 미치는 영향

10L 생물반응기에 1.5L의 배지를 넣고 50마디씩 접종하였다. 배양방식으로는 생물반응기내 배지가 일정시간 동안 공급된 후 저장고로 빠지는 Ebb & Flood 배양과 식물체를 완전히 배지에 침지시켜 배양하는 immersion 배양, 지지대로서 플라스틱 net를 걸어 그 위에 배양체를 배양하는 Raft 배양 등의 3가지 방식으로 처리하였다. Ebb & Flood 방식의 경우, 배양 후 2주 동안은 30분간 배지를 공급한 후 1시간 동안은 배지가 저장고로 빠져나가도록 하였고 이후 3주 동안은 30m/30m, 그 다음 5주 동안은 1h/30m 간격으로 배양하였다. 배양 10주 후에 지상부 생체중, 초장 및 엽수, 줄기두께, 엽면적 그리고 엽록소 함량과 잎의 수분 포텐셜을 측정하였다. 또한, 배양기간별로 2주, 4주, 6주, 8주, 10주째의 생물반응기 내의 CO<sub>2</sub> 농도를 gas chromatography를 이용하여 측정하였다. Ebb & Flood 배양방식의 CO<sub>2</sub> 농도 측정은 배지가 공급되는 시간대에 측정하였다.

### 실험 4. 생물반응기 배양중 배지 공급의 유무가 국화의 생장에 미치는 영향

10L의 생물반응기를 이용하여 실험을 실시하였다. 대조구로는 배양기간 동안 새로운 배지를 공급을 하지 않았고 배지에 sucrose를 첨가한 처리구의 경우, 배양 6주째에 당 3%가 포함된 MS 기본배지를 1L 첨가하였으며 배지에 sucrose를 첨가하지 않은 처리구의 경우에는 배양 6주째에 당이 포함되지 않은 MS 기본 배지를 1L 첨가하였다. 배양 12주 후 식물체당 지상부 생체중과 초장 및 엽수를 비교하였으며 생물반응기 내 CO<sub>2</sub> 농도 일변화 및 배양기간별 당 및 양분 소모량을 알기 위하여 10일 간격으로 sampling 하여 배양기간 별 당 함량, 음이온과 양이온 변화를 분석하였다. 배지 내 당 함량 변화인 sucrose, glucose 및 fructose의 분석은 HPLC (Waters 600S controller, Waters 626 pump. Waters Co., Milford, USA)를 이용하여 분석하였다. Coregel 87C carbohydrate column (300×7.8mm, Waters Co., Milford, USA)을 장착하고 이동상으로 순수수를 1mL·min<sup>-1</sup>의 유속으로 용출하였으며, RI detector (Refractometer Differential, Waters 410, Milford, USA)로 sucrose, glucose, fructose를 분석하였다. 배지 내 음이온과 양이온 분석은 I. 2 실험과 동일한 방법으로 실시

하였다.

## 나. 실험결과

### 실험 1. 생물반응기 내 공기 주입량에 따른 국화의 생장

생체중, 초장, 엽수는 0.1vvm의 공기를 주입하였을 때 가장 증가하였고 0.1vvm 이상의 공기를 주입한 경우에는 생장이 감소하여 0.5vvm의 공기를 주입하였을 때 배양 4주만에 배지가 모두 증발되어 배양 소식물체는 고사하였다(Table 10), (Fig. 15). 공기 주입량에 따른 배지량의 오차를 줄이기 위하여 공기 용적이 5L인 생물반응기를 이용하여 배지 1L에 본 실험에서와 같은 양의 공기를 주입한 결과, 0.1vvm에서 생체중 및 엽수가 가장 높았으나 0.05vvm과 0.3vvm과 유의차는 없었다. 초장은 0.1vvm에서 가장 높았으며 0.5vvm에서는 생육이 현저히 감소하였다(Table 11). 공기주입량이 많을수록 배양 후 배지량도 적었다.

**Table 10. Effects of air volume on growth of chrysanthemum plantlets after 7weeks of culture.**

Air volume (vvm)	Fresh weight (mg/plantlet)	Plant height (cm)	No. leaves (per plantlet)	Leaf area (cm <sup>2</sup> )	Chlorophyll content <sup>z</sup>
0	661.0 ± 83.8 <sup>y</sup>	7.3 ± 0.3	13.4 ± 0.2	14.9 ± 0.8	27.9 ± 0.6
0.05	1180.6 ± 80.1	8.8 ± 0.3	13.2 ± 0.2	31.3 ± 0.6	42.9 ± 0.5
0.1	1308.3 ± 79.7	10.4 ± 0.2	13.6 ± 0.2	25.9 ± 0.9	38.7 ± 0.7
0.3	852.3 ± 69.1	8.4 ± 0.4	11.8 ± 0.4	20.9 ± 0.7	41.7 ± 0.6
0.5	218.1 ± 37.9	3.9 ± 0.4	7.8 ± 0.4	- <sup>x</sup>	-

<sup>z</sup>SPAD value of leaves.

<sup>y</sup>Mean ± standard error.

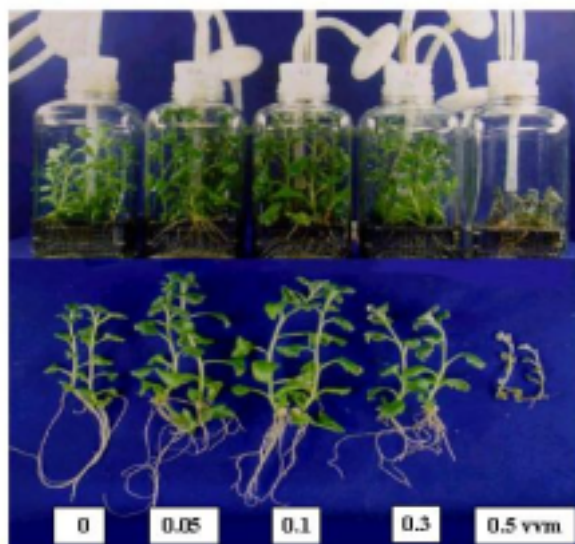
<sup>x</sup>Not determined.

\*Working volume: 900ml

**Table 11. Effects of air volume on growth of chrysanthemum plantlets in the bioreactor.**

Air volume (vvm)	Fresh weight (g/plantlet)	Plant height (cm)	No. leaves (per plantlet)
0.05	2.23 a <sup>z</sup>	10.19 bc	15.86 ab
0.1	2.54 a	13.83 a	16.29 a
0.3	2.35 a	11.26 b	15.28 ab
0.5	1.69 b	9.70 c	14.43 b

<sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan' s multiple range test,  $p \leq 0.05$ .



**Fig. 15. Growth of chrysanthemum plantlets as influenced by the amount of air volume.**

일반적으로 기내 배양시 환기횟수를 증가시키면 생장과 광합성이 촉진되는데 이러한 결과는 지황(Cui 등, 2000), 고추냉이(Eun, 1998), 딸기(Desjardins 등, 1987) 등에서 보고된 바 있다. Kozai와 Sekimoto(1988)는 배양병 내 환기횟수와 CO<sub>2</sub> 농도가 딸기 배양 식물체의 생장에 미치는 영향을 조사한 실험에서 환기횟수가 증가할수록 생체중과 건물중, 초장 및 엽면적이 증가하는 것으로 보고하였다. 이는 배양병의 환기횟수를 증가시키면 배양병 내로의 CO<sub>2</sub> 공급이 원활하게 이루어져 배양 식물체의 광합성과 생장이 촉진된 것으로 생각된다. 또한 De Proft 등(1985)은 배양병의 환기가 불량하면 배양병 내에 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>의 농도와 유독성 화합물의 증가로 인하여 *Magnolia*의 생장이 억제된다고 보고한 바 있다. 그러나 공기 주입량이 지나치게 높아지면 배양병 내의 상대습도는 낮아지고 배양 초기의 뿌리가 없어서 수분 흡수가 어려운 배양체의 경우 낮은 상대습도에 의해 수분스트레스를 받게된다(Shim, 2002). 또한 배지의 고갈로 인한 무기이온의 흡수 저해도 생장을 억제한 요인으로 생각되었다.

## 실험 2. 접종 밀도가 국화의 생육에 미치는 영향

공기 용적이 10L인 생물반응기 배양시 적정 밀도를 구명하기 위하여 국화 node cutting을 20, 40, 60, 80마디로 달리하여 접종한 결과, 식물체 당 생체중은 40마디를 접종하였을 때 가장 높았으며 초장은 80마디 접종 시 가장 길었다(Table 12). 즉, 초장이 긴 만큼 엽수가 적었으며 높은 밀도에서 배양되어 식물체 줄기가 약하고 웃자람음을 알 수 있었다.

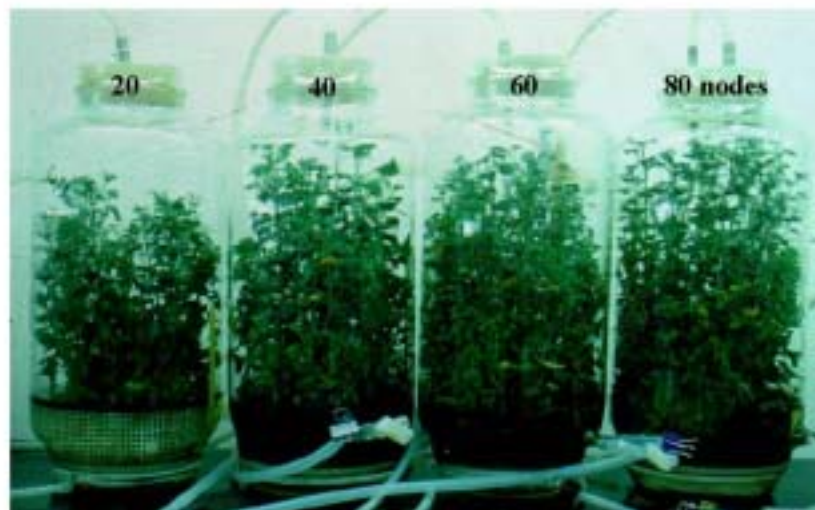
12주 배양기간동안의 분지 발생은 20마디 접종시 가장 많았는데 식물체 간의 공간이 넓었기 때문에 분지가 발생할 확률이 높았던 것으로 생각되었다. 분지를 포함한 총 엽수는 40마디 접종 시 가장 많았으나 증식율은 일정기간 내에 기내에서 형성된 마디수로 나타내기 때문에(Pierik 등, 1988) 생물반응기 당 가장 많은 마디를 확보할 수 있었던 60마디 처리구가 가장 효과적인 접종 밀도로 생각되었다(Fig. 16). Kozai 등(1989)는 감자 기내 배양시 배양병 내의 식물체 밀도에 따라 생장이 크게 영향을 받는다고 하였으며 식물 밀도가 증가함에 따라 무기물 농도, CO<sub>2</sub> 농도, 순광합성속도는 감소한다고 하였다. 또한, 환기횟수와 PPF 수준이 같은 조건에서 기내 감자의 생장은 배양병 내의 식물 밀도가 증가함으로써 감소한다는 보고도 있어(Niu 등, 1997) 본 실험의 결과와 유사하였다.

**Table 12. Effects of inoculation density on growth of Chrysanthemum plantlets in a bioreactor after 12weeks of culture.**

Inoculation density <sup>z</sup>	Fresh weight (g)	Plant height (cm)	Stem diameter(cm)	No. branching No. leaves (per plantlet)	
20	7.84±1.1 <sup>y</sup>	23.4±2.3	0.25±0.05	8.33±1.5	59.2±6.8
40	9.67±1.7	26.7±1.5	0.24±0.11	6.61±0.8	63.8±5.2
60	9.54±2.1	26.9±2.4	0.22±0.09	6.58±1.0	62.7±6.4
80	8.44±0.9	28.3±2.0	0.22±0.07	4.52±0.9	54.1±4.1

<sup>z</sup>Number of inoculation nodes per bioreactor.

<sup>y</sup>Mean ± standard error.



**Fig. 16. Growth of chrysanthemum plantlets in bioreactors as influenced by inoculation density.**

### 실험 3. 배양방식에 따른 국화의 생육

생체중과 초장은 Raft 배양방식에서 가장 높았으며 엽수는 Ebb & Flood 배양방식에서 가장 많았으나 Raft 배양방식과의 유의차는 없었다(Table 13). 경경 및 엽면적은 Raft 배양방식에서 가장 컸으며 엽록소 함량을 측정해본 결과, 모든 처리간의 유의차가 나타나지 않았다. 배양방식에 따라 식물체가 배지에 침지되는 정도가 다르기 때문에 수분포텐셜을 측정하였는데 Raft 배양방식에서 가장 낮았던 것으로 보아 잎조직 상태가 가장 양호했음을 짐작할 수 있었다(Table 14). 배양 기간별 생물반응기내 CO<sub>2</sub> 농도를 측정한 결과, Raft 배양 방식이 그 농도가 가장 낮았고 Liquid 배양방식에서 그 농도가 가장 높았는데, 이로 미루어 Raft 배양방식으로 배양된 식물체의 광합성 속도가 가장 높았음을 짐작할 수 있었다(Fig. 17). Ebb & flood 배양방식에서는 배지 공급시간에 따라 배양기 내 CO<sub>2</sub> 농도가 달랐는데 배지가 공급되는 시간대에는 그 농도가 낮았으며 저장고로 빠지는 시간대에는 1500ppm 이상으로 높게 나타났다.

지속적인 침지 상태인 immersion (liquid) 배양방식에서 생장이 가장 낮았던 이유는 배양체가 지속적인 침지 상태로 자랐기 때문에 조직의 유리화와 산소의 부족에 따라 식물체의 재생력이 떨어진 것으로 생각된다. Ebb & Flood 배양방식은 raft 배양방식에 비하여 그 생장이 낮았는데 이는 Ebb & Flood 배양방식이 배양기간 동안 배지가 공급되는 기간이 raft 배양방식에 비하여 짧기 때문에 양분 흡수가 적었을 것으로 생각된다. Akita 등(1998)은 감자 생물반응기 배양에서 Ebb & Flood 시스템을 이용하여 1단계로 shoot를 증식시킨 후 2단계에 괴경형성을 성공적으로 유도하였다. 이와 같이 백합 자구나 감자 괴경의 기내 생장에는 Ebb & Flood 배양방식이 효과적이었으나 shoot의 증식을 목적으로 하는 경우에는 raft 배양방식이 더 효과적이었다.

**Table 13. Effects of culture method on fresh weight, plant height, and number of leaves of chrysanthemum plantlets grown in a bioreactor for 10 weeks.**

Culture method	fresh weight (g/plantlet)	Plant height (cm)	No. leaves (per plantlet)
Ebb & flood	1.73 b <sup>z</sup>	12.8 b	17.5 a
Liquid	1.54 b	11.9 b	15.0 b
Raft	2.63 a	15.8 a	17.0 a

<sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan' s multiple range test,  $p \leq 0.05$ .

**Table 14. Effects of culture method on stem diameter, leaf area, chlorophyll content and water potential of chrysanthemum plantlets grown in a bioreactor for 10 weeks.**

Culture method	Stem diameter (cm)	Leaf area (cm <sup>2</sup> /plantlet)	Chlorophyll content <sup>z</sup>	Water potential (Mpa)
Ebb & flood	0.19 b <sup>y</sup>	36.9 b	43.9 a	-3.76 b
Liquid	0.19 b	35.5 b	41.5 a	-3.29 ab
Raft	0.22 a	45.3 a	42.2 a	-2.91 a

<sup>z</sup>SPAD value of leaves.

<sup>y</sup>Mean separation within columns by Duncan' s multiple range test,  $p \leq 0.05$ .



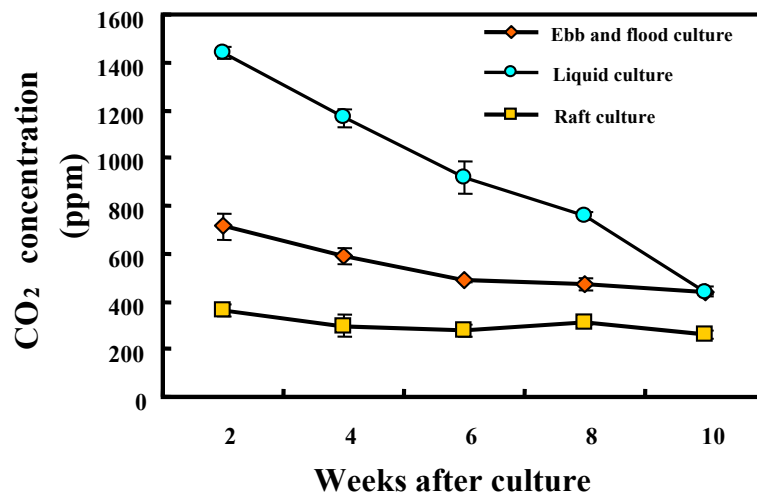


Fig. 17. Changes in CO<sub>2</sub> concentration in a bioreactor during culture period as affected by culture method.



Fig. 18. Chrysanthemum plantlets grown with different culture methods.

#### 실험 4. 생물반응기 배양 중 배지 공급에 따른 국화의 생육

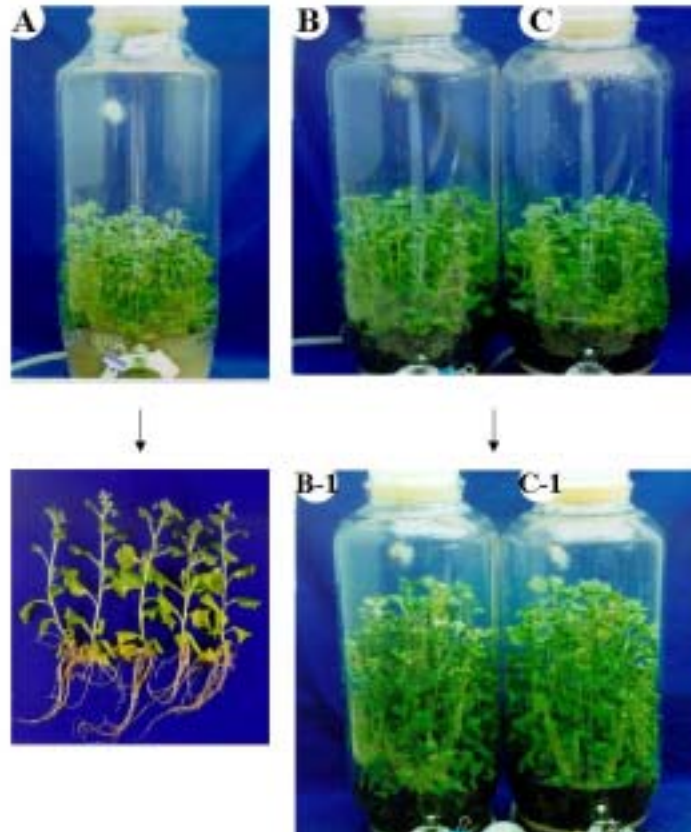
10L Column 형태의 생물반응기에서 배양을 한 결과, 6주가 지나면 정단부에서 영양생장이 멎고 생식생장 현상이 나타나 더 이상의 길이 생장을 하지 못했다. 이것은 영양분 부족의 원인으로 생각되어 배양 기간 중 배지를 공급하였는데 이때 당을 첨가하지 않은 배지와 당을 첨가한 배지를 공급하였다.

배지를 첨가하지 않고 8주간 배양한 식물체에서는 정단부에 생식생장 현상이 나타나는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 19). 당이 첨가된 배지와 첨가되지 않은 배지를 6주째에 각각 공급하였을 때 무당 배지 첨가구에서 생체중, 초장 및 엽수가 모두 증가하였다(Table 15). 배양 초에는 배지내의 당에 의존하여 생장을 하지만 배양 후기엔 무당배지를 첨가해도 배양이 가능한 점으로 보아 식물체 스스로 광합성을 할 수 있을 정도의 생장 단계에서는 배지 내 당이 국화의 생육에 미치는 영향은 크지 않다고 생각한다. Cristea 등(1999)은 기내 배양묘를 기외 순화시킬 때 가장 크게 문제가 되는 것은 식물체가 기내에서 자랄 때 필요한 탄소원을 배지에 포함된 Sucrose에 의존하기 때문에 기외 순화시 생존율이 낮아진다고 하였다. 따라서 배지 내 당과 비타민의 공급없이도 CO<sub>2</sub> 시용 및 광도를 높인 경우에 국화 식물체 생장이 좋았다고 보고하였다. 본 실험의 경우에도 초기에는 배지 내 당을 넣어 생장을 촉진시킨 후 배양 후기에 당을 뺀 배지를 첨가하여 식물체의 광합성을 유도함으로써 기외 순화시 식물체 생존율 및 생장 속도를 증가시킬 수 있었던 것으로 보인다.

**Table 15. Effects of medium supplement on fresh weight, plant height and number of leaves of chrysanthemum plantlets after 12weeks of culture.**

Treatment	Fresh weight (g/plantlet)	Plant height (cm)	No. leaves (per plantlet)
No supplement	1.98 ± 0.13 <sup>z</sup>	12.24 ± 0.41	14.8 ± 0.37
Medium supplement (Sugar-containing)	2.73 ± 0.26	21.20 ± 0.59	21.4 ± 0.68
Medium supplement (Sugar-free)	3.08 ± 0.27	21.23 ± 0.74	22.5 ± 0.55

<sup>z</sup>Mean ± standard error.



**Fig. 19. Growth of chrysanthemum plantlets in bioreactors as affected by medium supplement method during culture period.**

A: Cont. (No supplement)-8 weeks of culture.

B: Medium supplement (Sugar containing)-8 weeks of culture.

C: Medium supplement (Sugar free)-8 weeks of culture.

B-1, C-1: After 12 weeks culture.

배양기간에 따른 배지 내 당농도 변화를 보면 sucrose 농도는 배양 초기에 급격히 감소하여 배양 20일 후에는 완전히 소모되어 갈락토스와 글루코스로 분해됨을 알 수 있었다. 이에 따라 배양 40일 쯤 배지를 첨가해 주었는데 sucrose 첨가구에서는 처리 10일 후에 sucrose 농도가 급격히 감소하였다(Fig. 20).

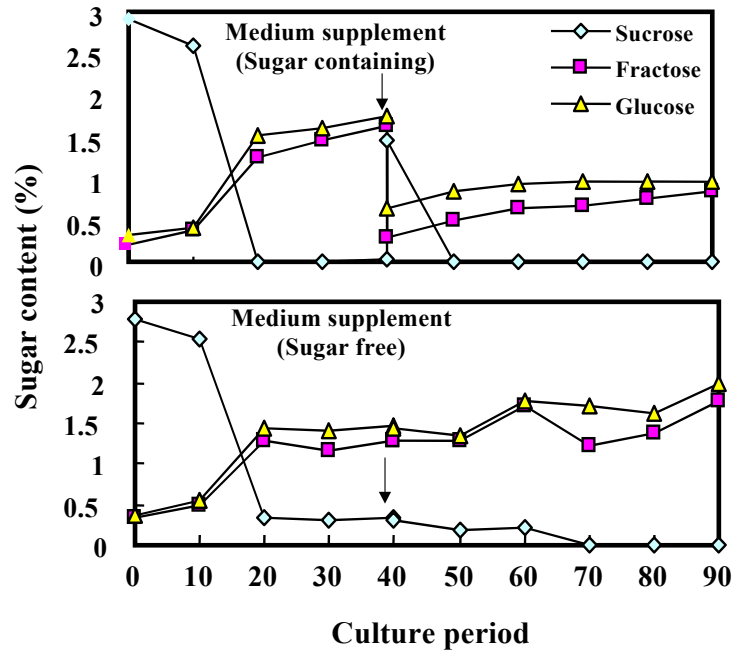


Fig. 20. Changes in sugar contents during the culture period.  
(→: Supplement of the medium)

배양기간에 따른 음이온과 양이온 변화량에서는 음이온 중  $\text{NO}_3^-$  이온의 변화량이 가장 컸으며 양이온 또한  $\text{NH}_4^+$  이온의 흡수량이 가장 많음을 알 수 있었다.  $\text{H}_2\text{SO}_4^-$ 와  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$  음이온은 생장 기간에 따라 거의 변화가 없었으며 양이온 중  $\text{Mg}^{2+}$ 와  $\text{Ca}^{2+}$ 의 변화량은 미비하였으며  $\text{Na}^+$ 와  $\text{K}^+$  이온은 생장기간에 따라 감소하는 경향을 보였다(Fig. 21, 22). 식물체 생장시  $\text{NH}_4^+$ 와  $\text{NO}_3^-$ 의 흡수율은 식물에 따라 다르지만 기내 식물의 형태형성에 영향을 미친다(Williams 등, 1995). 기내 배양의 경우, 식물이 필요로 하는 적정 농도의 무기물은 소식물체의 상태와 성장단계에 따라 다르며 기내 배양

환경조건에 따라 식물의 이온 흡수 정도가 다르게 된다. 특히, 생장이 가장 활발한 시기의 배지 내 무기물 이온 농도는 식물 성장에 중요하다(Yang 등, 1995). 식물 조직배양에서 배지량은 이온농도 변화에 매우 중요하게 작용하고 초기 배지량과 초기 양분 농도를 결정하는것이 중요하며 초기 배양 배지의 무기물 이온 농도는 각 이온의 흡수율과 상관이 있으며 기내 식물체가 흡수함으로서 그 농도는 감소하게 된다(Kozai 등, 1991). 따라서 본 실험에서와 같이 성장속도가 가장 빠른 단계에 배지를 공급해 줌으로써 국화의 성장을 촉진시킬 수 있었다.

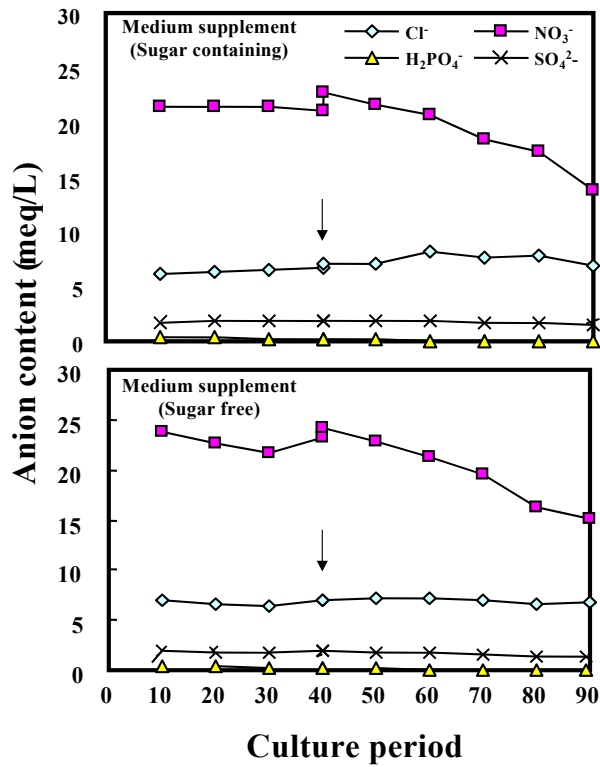


Fig. 21. Changes in anion contents during the culture period.  
(→: Supplement of the medium)

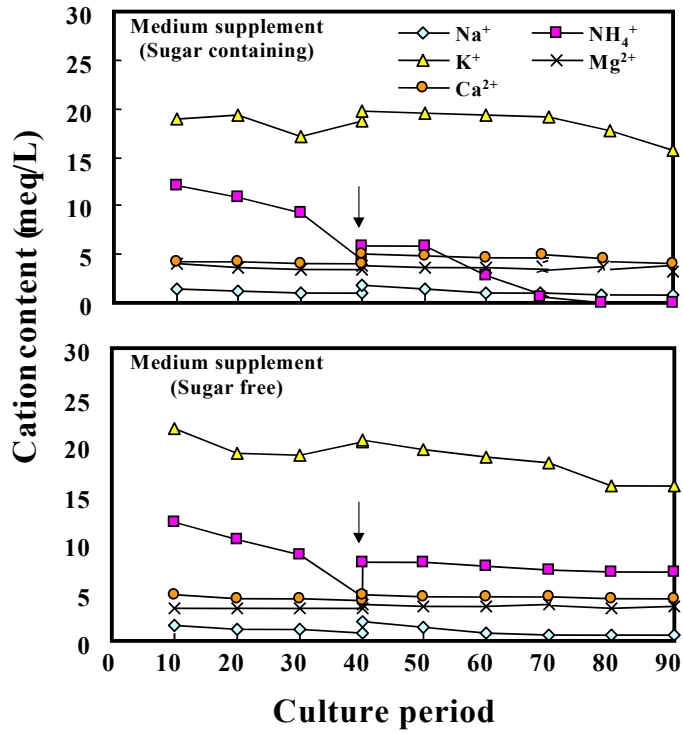


Fig. 22. Changes in cation contents during the culture period.  
(→: Supplement of the medium)

무당 배지를 첨가했을 때 식물체의 광합성능력 및 하루동안의 광합성 변화를 알기 위하여 생물반응기 내 CO<sub>2</sub> 농도의 변화 정도를 측정하였다. 명기동안은 CO<sub>2</sub> 농도가 700-800ppm 이었으며 암기로 바뀌면서 급격히 그 농도가 증가함을 알 수 있었다 (Fig. 23). 무당 배지를 첨가했을 때 식물체의 광합성능력 및 하루동안의 광합성 변화를 알기 위하여 생물반응기 내 CO<sub>2</sub> 농도의 변화 정도를 측정하였다. 명기동안은 CO<sub>2</sub> 농도가 700-800ppm 이었으며 암기로 바뀌면서 급격히 그 농도가 증가함을 알 수 있었다(Fig. 23).

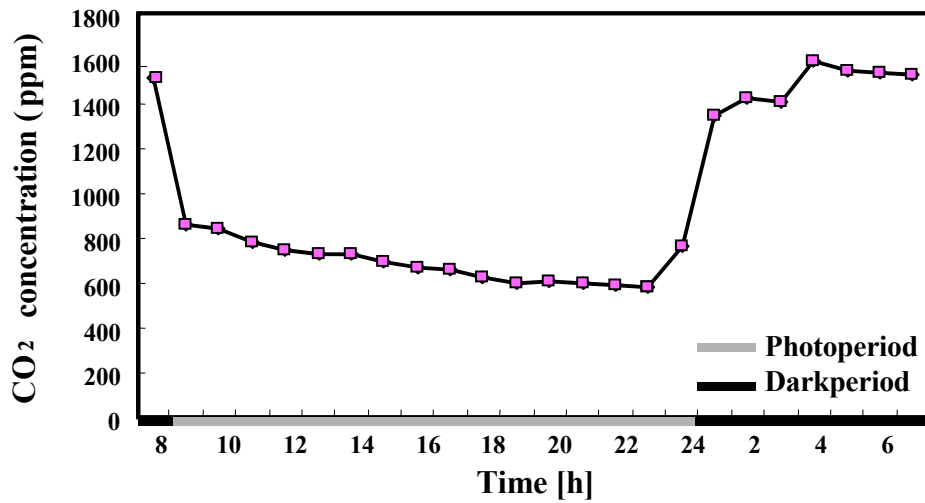


Fig. 23. Diurnal changes in CO<sub>2</sub> concentration in a bioreactor. (Supplement of sugar free medium)

### 3. 생물반응기 생산 묘의 기외순화 및 생장

생물반응기에서 대량생산된 국화 single node cutting을 이용하여 고품질의 transplant를 생산하기 위해서는 순화 과정을 일원화하여 순화에 걸리는 시간과 묘 생장기간을 단축하는 것이 무엇보다 중요하다. 이를 위해 본 연구에서는 양액재배 시스템을 적용하여 순화와 묘 생장을 동시에 진행시키는 새로운 묘 생산 방법을 개발하기 위해 배양 방식에 따른 묘 생장을 비교하였고 이후 배양환경에 대한 실험을 병행하였다.

#### 가. 실험방법

##### 실험 1. 기외 삼목시 nodal position에 따른 국화 묘의 생장

생물반응기에서 배양된 국화 줄기를 한매의 잎을 가진 단일마디로 절단하여 기외 삼목하였다. 삼목부위에 따른 국화의 기외 생육정도를 알고자 정단부(제거)로부터 6번

째 마디까지를 상부로 정의하였으며, 상부로부터 6번째 마디까지를 중부, 중부로부터 6번째 마디까지를 하부로 구분하여 처리구 당 100마디씩 128구(2.7×2.7×4cm) Plug tray에 삽목하였다. 배양용토로는 모래를 사용하였으며 삽목 1주부터 이틀에 한번 관수하였다. 삽목 40일 후 지상부와 지하부의 생체중 및 건물중을 조사했으며 초장, 엽수, 뿌리길이 및 생존율 등을 조사하였다.

## 실험 2. 삽목용토에 따른 국화묘의 생장

삽목 재료 및 순화조건은 위와 동일하며 삽목용토로 모래와 피트모스 단용, 피트모스와 펄라이트의 50:50 혼용, 피트모스와 버미큘라이트의 50:50 혼용하여 처리구당 50마디씩 삽목하였다. 삽목 40일 후 지상부, 지하부 생체중, 초장 및 엽수와 뿌리길이를 조사하였다.

## 실험 3. 순화 방식이 국화묘의 생장에 미치는 영향

생물반응기에서 배양된 국화의 정단부를 100마디씩 모래, 피트모스 단용, 피트모스와 펄라이트 혼용, 피트모스와 버미큘라이트 혼용배지에 삽목 후 모래에는 물을 관수하였고 나머지 고�형 배지경에는 국화 배양액을 삽목 1주부터 이틀에 한번 관수하였다. DFT(Deep Flow Technique) 배양에서는 지지물로 스폰지를 사용하였고 배양 기간 중 공기를 공급하였다. 배양액의 조성은 일본 아이치현 원예시험장 처방액으로 하였으며 EC와 pH는 각각 2.0, 6.0으로 조절하였다. 삽목 40일 후에 지상부, 지하부 생체중 및 건물중을 조사했으며 초장, 엽면적 및 엽수를 조사하였다.

## 실험 4. 배양액의 EC와 광도(PPF)가 묘 생장에 미치는 영향

실험 3에서 묘 생장이 가장 좋았던 DFT 시스템을 이용하여 microponic culture system 확립하였다(Fig. 4). 배양액의 EC와 PPF가 묘의 생장에 미치는 영향을 구명하기 위해 PPF를 50, 100, 250  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 로 달리하고 각각의 PPF level에서 배양액의 EC를 0.8, 1.6, 30  $\text{dS} \cdot \text{m}^{-1}$ 로 다시 나누어 실험을 실시하였다. 배양 5주 후 묘의 생체중, 건물중, 초장, 근장, 광합성을 측정하였고 엽록소 형광 parameter도 측정하였다. 식물체의 엽록소 형광은 휴대용 엽록소 형광측정기 PAM chlorophyll fluorometer (PAM-2000, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany)에 Leaf-Clip Holder (2030-B,



Walz)와 데이터 수집프로그램 DA-2000 (Walz)를 연결하여 측정하였다. 해질녘, 처리구 당 15개체씩 20분간 암 적응시킨 후 PSII 반응센터가 열린 상태의 최소형광(minimal fluorescence,  $F_0$ )은 낮은 광강도( $250\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )의 펄스광을 조사하였으며, 이어 PSII 반응센터가 닫힌 상태의 최대형광(maximal fluorescence,  $F_m$ )은 암 상태에서 3 $\mu\text{sec}$ 동안  $2400\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 whit광으로 포화펄스(saturated pulse)를 주어 측정하였다. PSII 반응센터의 최대 양자수율  $F_v/F_m$  (maximal PSII photochemical efficiency)은  $F_v = F_m - F_0$ 의 식으로 산출하였는데, Van Kooten과 Snel(1990)의 방법에 따라 명명하였다.

### 실험 5. PPF와 CO<sub>2</sub> 처리가 국화묘의 생장에 미치는 영향

지상부 환경 중 묘 생장에 큰 영향을 미치는 요인인 PPF와 CO<sub>2</sub>의 처리를 달리하여 각각의 요인이 묘 생장에 미치는 영향을 구명하고 두 요인 간의 상관관계를 조사하고자 실험을 실시하였다. 배양방법과 나머지 환경 설정은 이전의 실험에서 가장 묘 생장에 효과적인 수준으로 유지하였다. 처리구로는 PPF를  $50\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 과  $150\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 로 달리 한 후 CO<sub>2</sub> 농도를 350 mmol<sup>-1</sup>(control)과 1000 mmol<sup>-1</sup>로 각각 다르게 처리하여 5주간 배양한 후 묘의 생체중, 건물중, 초장, 근장, 엽수, 엽록소 함량, 광합성, chlorophyll fluorescence 등을 조사하였다.

### 실험 6. 저온처리에 의한 국화묘의 rosette화 방지

기내에서 생산된 묘를 바로 절화재배에 이용하는 경우, 계절(봄, 가을), 품종(신마, 백선)에 따른 rosette 발생을 방지하기 위해 추국과 하국 품종을 대상으로 저온 처리 방법(기내 및 기외)과 처리기간을 각각 달리하여 실험을 실시하였다. 저온처리는 4-5°C의 범위로 40일간 유지하였다. 저온처리 방법으로는 기내배양묘의 무처리(Control), 기내묘의 저온처리 (배양병 상태로 저온처리), 식물체의 저온처리, 삽수(shoot)의 저온처리(기내 배양묘 순화 완료후 온실에서 1달 재배 후 삽수 채취하여 저온 저장) 등으로 나누어 65x24x25cm flower box에 각 200주씩 저온처리 한 후 실험기간 동안 배양액을 1일 5분씩 4회 공급하였다. 정식은 4/22일과 6/17일에 실시하였는데 각 처리별 저온처리 일정을 정식일에 맞추어 역산 계산하였다. 처리 후 30, 60일 후에 생육조사를 실시하였다.

**실험 7. 생물 반응기와 Microponic culture system을 이용해 생산된 묘와 기존 관행배양 방법과의 비교**

처리방법	관행배양	생물반응기
배 지	MS Solid medium (Sucrose 3%)	MS liquid medium (Sucrose 3%)
배 양 기 접 종 수	500ml 삼각 플라스크 10마디	5L Ballon type bioreactor 100마디
품 종	신마(추국)	
배양기간	60일	
순 화	Microponic system(펄라이트 EC1.5배양액)	

**나. 실험결과**

**실험 1. 기외 삽목시 nodal position에 따른 국화 묘의 성장**

기내 생산된 국화 줄기를 상부, 중부, 하부로 나누어 기외 삽목한 결과, 상부와 중부간의 생체중, 건물중의 차이는 나타나지 않았으며 초장과 엽수도 상부와 중부에서 모두 높았다(Table 16) (Fig. 24) (Fig.25). 한편, 뿌리길이를 측정 한 결과는 하부에서 가장 길었으나 상부, 중부, 하부와는 차이가 나지 않았다. 하부로 갈수록 성장 및 생존율이 감소하는 경향을 보였으며 상부의 생존율은 100%인데 반하여 하부는 50%밖에 되지 않았다. 기내 성장시 하부는 이미 목질화 및 하엽현상이 많이 일어난 상태에서 뿌리 및 신초 형성이 늦었던 것으로 생각되었다(Tomas, 1998). 삽목 시에는 엽면적, 삽수의 생체중, 삽목 부위같은 다양한 생리학적 요인들이 기외 발근에 영향을 주는데, 포도의 삽목시 초기에는 상부의 발근 속도가 느렸으나 삽목 7일 후에는 발근율이 가장 높았고 기부의 발근율은 저조했다는 보고가 있다(Tomas, 2000). 그 외에도 삽수의 엽면적이 작을수록 상대적으로 신초 발생은 빠르나 그 생장은 약하며 큰 잎을 가진 삽수는 뿌리 생장이 빠르고 신초 발생은 지체되나 왕성한 성장을 한다고 하였다. 국화는 일정 기간 동안 생물반응기 내에서 길이 성장을 하기 때문에 기외 삽목시 그 위치에 따라 생장이 다를 것으로 예상된다. 이와 같이 삽수에 따라 기외에서의 성장력의 차이가 크기 때문에 생물반응기에서 줄기 신장에 걸리는 배양기간을 단축하여

기부의 흡수가 배양액에 침지되어 있는 기간을 줄이는 것이 중요하다.

**Table 16. Effects of part of nodal cuttings on growth of Chrysanthemum plantlets.**

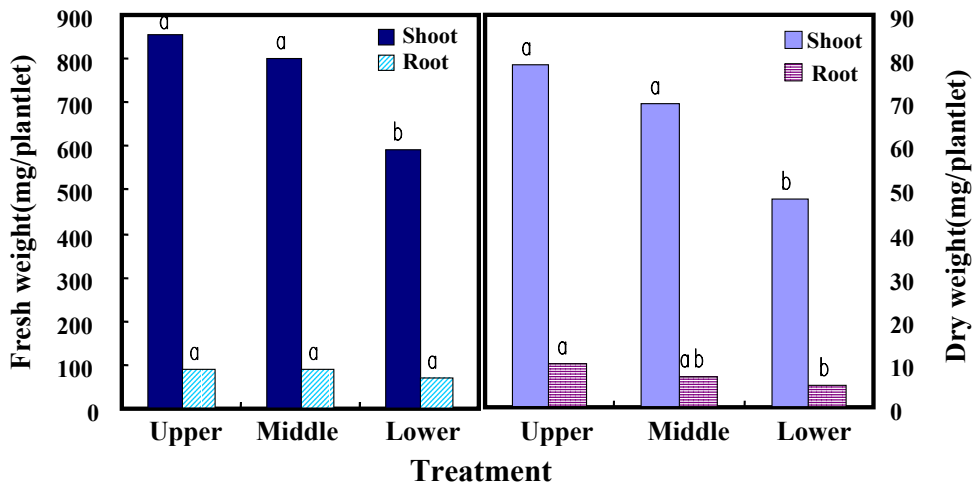
Part of nodal cuttings <sup>z</sup>	Plant height (cm)	No. of leaves (per plantlet)	Root length (cm)	Survival rate (%)
Upper	7.4 a <sup>y</sup>	11.0 ab	4.1 a	100
Middle	7.1 a	11.4 a	4.6 a	86.7
Lower	5.5 b	9.6 b	5.1 a	50

<sup>z</sup>Upper: 6 nodes from the shoot tip.

Middle: 6 nodes from the upper part.

Lower: 6 nodes from the middle part.

<sup>y</sup>Mean separation within columns by Duncan' s multiple range test,  $p \leq 0.05$ .



**Fig. 24. Fresh and dry weight of chrysanthemum transplants as influenced by part of nodal cuttings.**



**Fig. 25. Growth of Chrysanthemum transplants as influenced by nodal position.**

## 실험 2. 삽목용토에 따른 국화묘의 생장

국화의 플러그 삽목 묘 생산에 적합한 삽목용토를 선발하기 위하여 실험을 한 결과는 Table 17과 같다. 전체적인 지상부 생육은 피트모스와 펠라이트 혼용구에서 좋았으며 지상부 생체중은 피트모스와 펠라이트 혼용구와 피트모스 단용구에서 가장 좋았다. 지하부 생체중은 처리간 유의차가 없었으며 초장은 피트모스와 펠라이트 혼용구에서 가장 컸으며 뿌리 생육은 모래 단용구를 제외한 모든 배지에서 대체적으로 좋았다(Fig. 26). 그러나 삽목 7일 이내에 모든 삽목 용토에서 발근이 되었다.

삽목시 사용되는 발근용토는 수분과 공기를 제공하는 한편, 삽수 기부를 암상태로 유지하며(Hartmann 등, 1997), 발근과 묘품질을 결정하는 외부 환경요인으로는 삽수의 상태, 광, 온도, 수분 등을 들 수 있다(Sang 등, 1999). Yoshida 등(1992)은 국화

삽목에서 발근은 공기와 수분함유율 및 공극율같은 배지의 물리적 성질에 의해 영향을 받는다고 하였다. 펄라이트, 피트모스, 버미큘라이트, 모래등과 같은 상업적으로 이용되는 용토는 각각 물리적, 화학적 특성을 가지며 특히 발근 배지의 공기, 수분함량 및 배지 기상율은 삽목시 산소의 효율성을 결정하는 중요한 요인이다(Lemaire, 1995; Hartmann 등, 1997). 오 등(1998)은 발근배지의 조성과 그 배지의 기상이 국화 삽목묘의 발근과 생육에 미치는 영향에 대하여 연구하였는데 입자가 굵은 펄라이트 및 펄라이트와 피트모스 혼용배지에서 발근에 좋았으나, 버미큘라이트, 피트모스, 펄라이트와 버미큘라이트 혼용배지에서는 뿌리와 줄기생장을 억제하였다고 한다. 본 실험에서도 피트모스와 펄라이트 혼용처리구가 생장이 좋았는데 이는 펄라이트가 기상을 즉, 통기성이 높고 삽수 기부로의 산소의 확산이 용이했기 때문으로 사료된다. 한편, 우 등(2000)은 배양토+펄라이트와 배양토+훈탄의 혼합용토에서 국화 삽목 묘의 발근속도가 가장 빨랐고 묘소질, 발근상태 및 분형근 성형율은 펄라이트+배양토+훈탄 처리에서 양호하였다고 하였다. 그러나 배양토 종류에 따른 삽목 묘 생장의 차이는 배양토의 물리적, 화학적 특성에 따른 수분 공급 방법에 따라 크게 영향을 받기 때문에 배지별 적정 수분 공급 방법의 확립이 먼저 요구된다.

**Table 17. Effect of growing medium on growth of chrysanthemum transplants.**

Growing medium	Fresh weight (mg/plantlet)		Plant height (cm)	No. leaves (per plantlet)	Root length (cm)
	Shoot	Root			
Sand	855.5 b <sup>z</sup>	90.7 a	7.4 b	11.0 a	4.0 b
Peatmoss	1147.8 a	105.2 a	6.8 c	11.8 a	7.3 a
Peatmoss +Perlite	1194.8 a	105.4 a	8.7 a	11.6 a	5.6 ab
Peatmoss +Vermiculite	719.9 b	109.8 a	6.4 c	9.8 b	7.6 a

<sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test,  $p \leq 0.05$ .



**Fig. 26. Growth of chrysanthemum transplants as influenced by growing medium.**

### 실험 3. 순화 방식이 국화묘의 생장에 미치는 영향

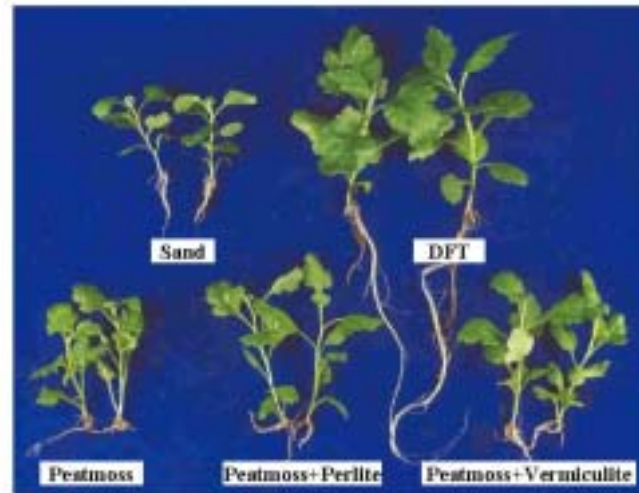
국화 묘 기의 순화를 기존 방법, 고행경, 수경으로 나누어 실시하였다. 식물체 지상부, 지하부 생육 모두 DFT 배양에서 월등히 좋았다. 초장의 생육은 P+P, P+V 처리구에서도 높았다. DFT에서의 엽면적 증가는 고행 배지경에 비해 2배 이상이었고 기존의 순화 방식과 비교하였을 때 3배 이상의 증가를 보였다(Table 18). 지상부 생체중 및 건물중은 DFT 방식에서 다른 처리구에 비해 약 3배 이상의 현저한 증가를 보였으며 지하부 생체중 및 건물중 또한 10배 이상의 증가를 보였다 (Fig. 27).

**Table 18. Effect of culture methods on growth of chrysanthemum transplants.**

Culture method	Shoot length (cm)	Leaf area (cm <sup>2</sup> )	No. leaves (per plantlet)	Fresh weight (mg/plantlet)		Dry weight (mg/plantlet)	
				Shoot	Root	Shoot	Root
Sand (Cont.)	5.0 c <sup>z</sup>	19.2 c	9.6 b	457.7 c	41.0 b	34.8 b	3.6 b
DFT	9.2 a	68.9 a	13.4 a	2800.3 a	357.1 a	255.0 a	310.5 a
Peatmoss	7.2 b	32.5 b	9.6 b	877.3 b	33.9 b	58.5 b	2.5 b
Peatmoss +Perlite	8.8 a	32.9 b	10.4 b	893.3 b	39.7 b	55.2 b	2.5 b
Peatmoss +Vermiculite	8.6 a	32.0 b	10.4 b	899.7 b	32.9 b	52.7 b	2.6 b

<sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan' s multiple range test,  $p \leq 0.05$ .

지금까지의 재배방식인 토경에서는 지상부 환경조절에 중점을 두었고 지하부의 환경조절은 거의 무시되어 왔다. 그러나 양액재배는 토양을 배제한 재배형태로 지하부의 환경조절이 용이하다는 점에서 관심을 끌고 있으며 양액재배 방식에 대한 다양한 연구가 많이 이루어지고 있다. Karsen (1997)은 근권부 환경이 작물의 줄기 신장에 영향을 주며 특정 양분 흡수 또는 저해 현상을 발생시키고 작물의 광합성 속도 및 생산성 향상에 영향을 주며 작물의 생육에 직접적으로 관여하고 있다고 한다. 손 등 (1996)은 무토양 재배방식이 NFT 및 DFT일 경우, 양액 공급량 및 재배조내의 양액 수위에 따라서 작물의 뿌리가 잠겨 있는 양액의 온도와 뿌리 부분이 노출되어있는 재배조내의 공기 온도가 다양하게 변하며 이것이 결국 작물의 생육에 영향을 주게 된다고 보고하였다. 손(1999)은 NFT 배양방식의 양액 및 근권부 공기온도는 양액 공급 및 중단에 민감하게 반응하며 온도하강 및 상승을 반복하며 DFT 배양방식은 지하부 온도와 밀접한 관계를 가지고 있다고 보고하였다.



**Fig. 26. Difference in growth and acclimatization of chrysanthemum transplants after 5 weeks of culture.**

#### 실험 4. 배양액의 EC와 광도(PPF)가 묘 생장에 미치는 영향

식물체의 생장은 광도와 EC가 높을수록 함께 증가하여 PPF  $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 과 EC  $3.0 \text{ dSm}^{-1}$  일 때 생체중, 건물중, 초장, 근장 및 엽수 모두 가장 높은 증가치를 보였다(Table 19, Table 20).  $\text{CO}_2$  흡수속도 역시 광도와 EC가 증가함에 따라 증가하였는데 특히 PPF  $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , EC  $3.0 \text{ dSm}^{-1}$ 에서 현저하게 증가하였다(Fig. 27). 기공전도도와 증산률 역시 같은 경향을 보였다 (Fig. 28, Fig. 29). 그러나 PPF와 EC를 각각 비교해 보면, EC 보다는 PPF가 식물체 생장에 더 중요한 요인으로 작용하는 것을 알 수 있었다. 식물체의 생체중과 건물중 모두 EC가 낮아도 PPF가 높아지면 증가하여 PPF  $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서는 EC가  $0.8 \text{ dSm}^{-1}$ 로 가장 낮았을 때도 PPF가  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 EC가  $3.0 \text{ dSm}^{-1}$ 로 가장 높은 경우와 비교하여 생체중은 2.5배,



건물중은 2배 이상 높았다 (Table 19). 광합성의 경우에도 PPF 50과 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서는 EC level에 따른  $\text{CO}_2$  흡수율의 차이가 크지 않았으나 PPF가 250  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 로 가장 높았을 때는 EC가 증가할수록  $\text{CO}_2$  흡수율도 크게 증가하였다. 특히, 배양 일수가 경과함에 따라 광합성도 크게 증가하였다 (Fig. 27).

일반적으로 광도와 식물 생장은 비례하는 것으로 알려져 있다. 특히, 기내 식물의 경우, 광도를 100-150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 까지 증가시킬 경우, 배양체의 성장속도는 기존의 낮은 광도(50-70  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )에서 자란 식물체에 비해 2배 이상 증가한다는 결과가 많이 보고되어 있다(Kozai and Iwanami, 1988; Hahn, 1998). 그러나 기내 배양시 낮은 광도에서 자란 식물을 갑자기 고광에 노출시키게 되면 광 stress에 의해 식물생장이 억제되거나 고사하는 경우가 많다(Shim, 2002). 본 실험에서 국화 식물체의 생장이 광도가 높아질수록 증가했던 것은 생물반응기 배양과정에서 광도를 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  이상으로 유지하였기 때문에 기외 이식 후에도 광도 증가에 따른 생장의 증가가 이루어졌을 것으로 보였다. EC의 경우, 비교적 높은 EC 수준에서도 국화의 생장이 증가하였던 것은 온도 등 다른 환경요인들이 국화묘의 성장에 적절한 수준으로 유지되었기 때문으로 생각되었다. 배양액의 적정 EC level은 식물의 종류, 성장단계, 계절 등에 따라 달라지기 때문에 온도, 광도, 습도 등 성장환경의 적절한 조절이 이루어진다면 1.5  $\text{dSm}^{-1}$ 내외로 유지시키는 것이 일반적이다(Holder and Christensen, 1988; Schwarz, 1995). 또한 성장초기에는 비교적 낮게 관리하는 것이 유리하지만 배양액의 pH, EC관리가 규칙적으로 잘 이루어진다면 EC를 높임으로써 성장기간을 단축하면서 품질을 함께 높일 수 있을 것으로 보인다.

**Table 19. Effect of PPF and EC levels on fresh and dry weight of chrysanthemum transplants after 30 days of microponic culture.**

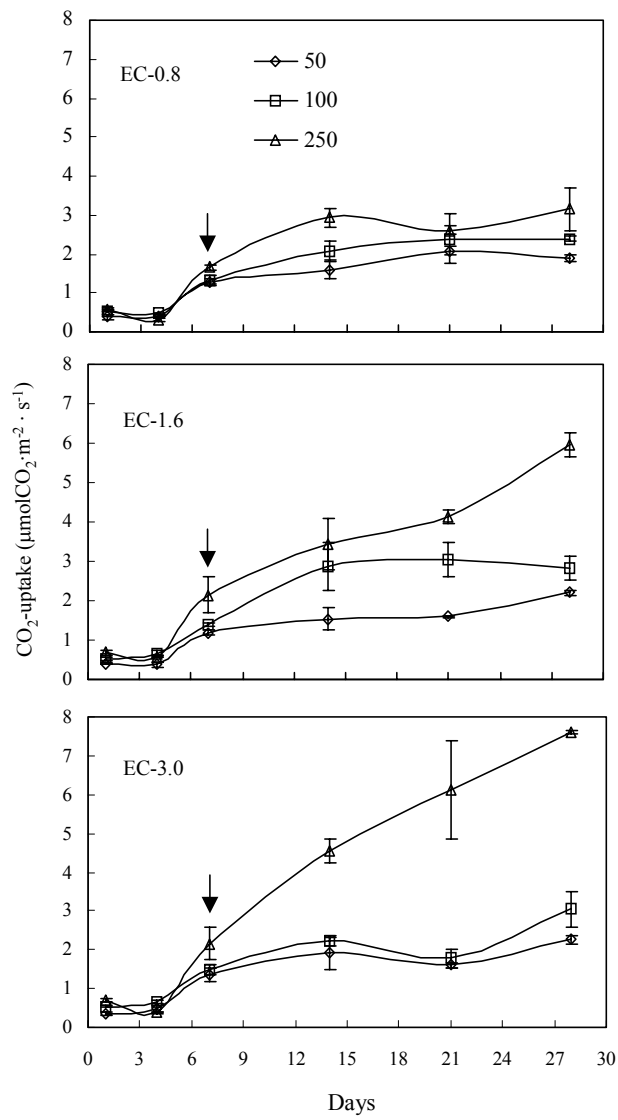
Treatment		Fresh weight (g)			Dry weight (g)		
PPF ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	EC ( $\text{dSm}^{-1}$ )	Top	Root	Total	Top	Root	Total
50	0.8	4.1 $\pm$ 0.11	0.7 $\pm$ 0.02	4.8 $\pm$ 0.12	0.27 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.004	0.33 $\pm$ 0.009
	1.6	5.2 $\pm$ 0.08	0.5 $\pm$ 0.04	5.7 $\pm$ 0.03	0.36 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.009	0.42 $\pm$ 0.004
	3.0	4.4 $\pm$ 0.26	0.9 $\pm$ 0.08	5.3 $\pm$ 0.33	0.34 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.003	0.43 $\pm$ 0.018
100	0.8	8.0 $\pm$ 0.63	2.0 $\pm$ 0.41	10.0 $\pm$ 1.05	0.60 $\pm$ 0.07	0.13 $\pm$ 0.021	0.72 $\pm$ 0.089
	1.6	9.7 $\pm$ 0.77	1.8 $\pm$ 0.26	11.5 $\pm$ 1.02	0.74 $\pm$ 0.07	0.11 $\pm$ 0.003	0.85 $\pm$ 0.068
	3.0	8.6 $\pm$ 0.60	1.6 $\pm$ 0.12	10.2 $\pm$ 0.72	0.67 $\pm$ 0.05	0.13 $\pm$ 0.007	0.80 $\pm$ 0.054
250	0.8	10.5 $\pm$ 0.95	2.6 $\pm$ 0.28	13.1 $\pm$ 1.09	0.78 $\pm$ 0.07	0.15 $\pm$ 0.008	0.94 $\pm$ 0.082
	1.6	11.9 $\pm$ 0.68	2.6 $\pm$ 0.35	14.5 $\pm$ 1.03	0.93 $\pm$ 0.06	0.16 $\pm$ 0.013	1.08 $\pm$ 0.069
	3.0	21.1 $\pm$ 2.91	5.03 $\pm$ 1.14	26.1 $\pm$ 4.05	1.79 $\pm$ 0.23	0.27 $\pm$ 0.050	2.06 $\pm$ 0.284

<sup>z</sup>Average of five samples  $\pm$  standard error of the mean.

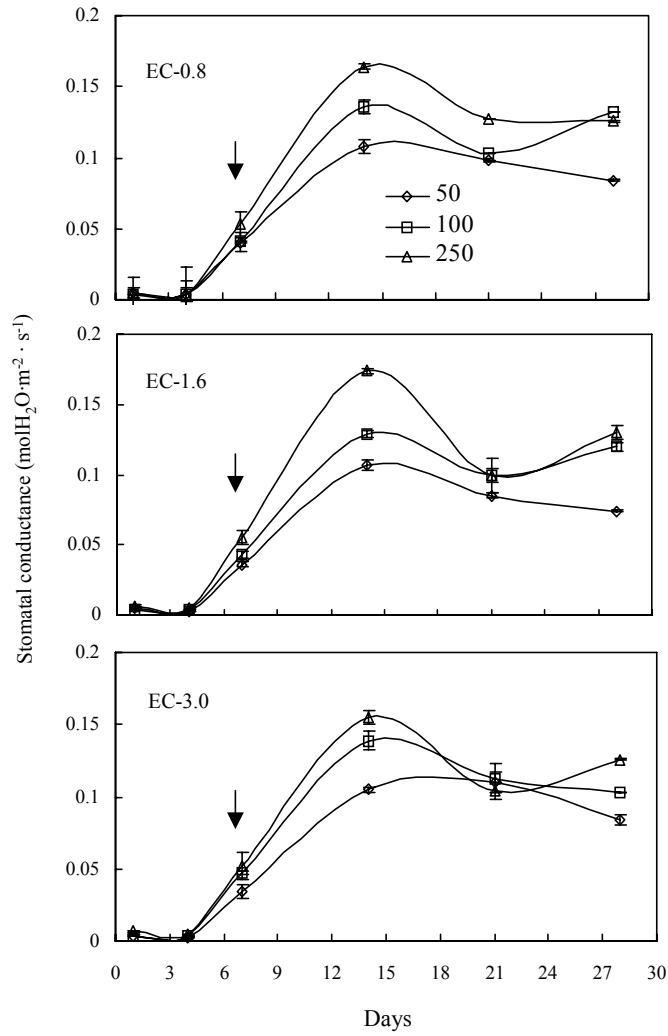
**Table 20. Effect of PPF and EC levels on shoot length, root length and number of new leaves of chrysanthemum transplants after 30 days of microponic culture.**

Treatment		Shoot length (cm)	Root length (cm)	No. new leaves
PPF ( $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s} \cdot \text{s}^{-1}$ )	EC ( $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ )			
50	0.8	12.6±0.59 <sup>z</sup>	17.3±1.12	7.3±0.23
	1.6	13.5±0.32	10.5±0.32	7.5±0.32
	3.0	12.3±0.68	17.5±1.14	7.5±0.26
100	0.8	16.0±0.32	25.5±2.89	10.5±0.96
	1.6	17.1±0.56	25.6±0.93	10.8±0.23
	3.0	15.9±0.50	22.5±0.58	11.8±0.23
250	0.8	18.3±0.68	26.0±0.91	12.3±0.23
	1.6	20.5±0.23	26.0±0.79	13.7±0.69
	3.0	24.1±0.59	26.1±0.98	16.3±0.44

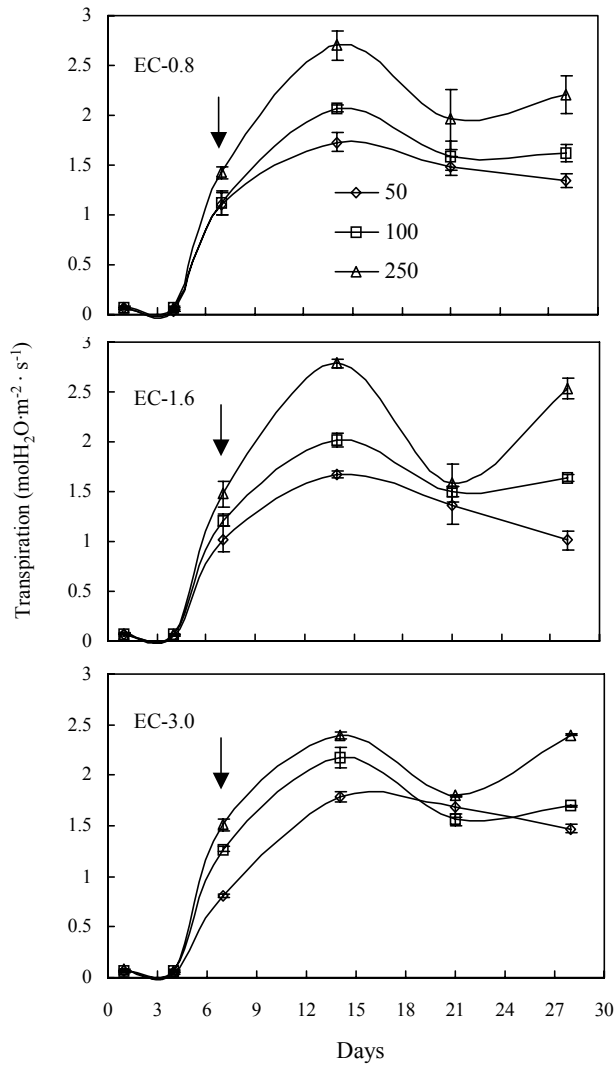
<sup>z</sup>Average of five samples ± standard error of the mean.



**Fig 27. Change in CO<sub>2</sub>-uptake of the plantlet during 30days of microponic culture as influenced by PPF and EC levels.**



**Fig 28.** Change in stomatal conductance of chrysanthemum transplants during 30days of microponic culture as influenced by PPF and EC levels.



**Fig 29.** Change in transpiration of chrysanthemum transplants during 30days of microponic culture as influenced by PPF and EC levels.

### 실험 5. PPF와 CO<sub>2</sub> 처리가 국화묘의 생장에 미치는 영향

생체중, 건물중, 초장, 근장, 새로 나온 엽수 모두 광도와 CO<sub>2</sub> 농도가 증가할수록 증가하였다. 광도가 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 로 높았을 경우에는 CO<sub>2</sub> 농도에 따른 생체중, 건물중, 초장, 근장, 새로 나온 엽수의 차이가 거의 없었으나 광도가 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 로 낮았을 때는 CO<sub>2</sub> 농도에 따른 식물체의 생장에 큰 차이를 보였다. 즉, CO<sub>2</sub> 농도가 100  $\text{mol mol}^{-1}$ 인 경우가 350  $\text{mol mol}^{-1}$ 이었을 때에 비해 생체중, 건물중, 초장, 근장, 새로 나온 엽수 모두 크게 높았다 (Table 21 ) (Fig. 30). 이와는 달리 엽록소에서는 광도 별, CO<sub>2</sub>별 차이가 현저하지 않았다 (Table 22).

**Table 21. Effect of PPF and CO<sub>2</sub> levels on fresh and dry weight of *Chrysanthemum* after 30 days of microponic culture.**

Treatment		Fresh weight (g)			Dry weight (g)		
PPF ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	CO <sub>2</sub> ( $\text{mol mol}^{-1}$ )	Top	Root	Total	Top	Root	Total
150	350	10.3 a <sup>z</sup>	5.3 a	15.6 a	0.92 a	0.43 a	1.35 a
150	1000	10.3 a	5.0 a	15.3 a	0.83 a	0.41 a	1.24 a
50	350	2.3 b	2.0 b	4.3 b	0.16 b	0.16 c	0.32 b
50	1000	4.5 b	2.4 b	6.9 b	0.32 b	0.25 b	0.57 b

<sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

**Table 22. Effect of PPF and CO<sub>2</sub> levels on Shoot length, Root length and number of new leaves of chrysanthemum after 30 days of microponic culture.**

Treatment		Shoot length (cm)	Root length (cm)	No. new leaves
PPF ( $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	CO <sub>2</sub> ( $\text{molmol}^{-1}$ )			
150	350	18.0 a <sup>z</sup>	31.8 a	13.7 b
150	1000	14.1 b	31.0 a	16.3 a
50	350	6.8 c	18.3 c	9.0 d
50	1000	9.4 c	24.3 b	11.0 c

<sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

**Table 23. Effect of PPF and CO<sub>2</sub> levels on chlorophyll content of chrysanthemum after 30 days of microponic culture.**

Treatment		Chlorophyll content ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ )			Chlorophyll a/b
PPF ( $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	CO <sub>2</sub> ( $\text{molmol}^{-1}$ )	a	b	a+b	
150	350	3.09 a <sup>z</sup>	1.89 a	4.98 a	1.63 b
150	1000	2.33 ab	1.69 ab	4.02 ab	1.37 c
50	350	3.11 a	1.81 ab	4.92 a	1.72 a
50	1000	2.12 b	1.36 b	3.48 b	1.56 b

<sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.





<b>PPF 150</b>	<b>PPF 150</b>	<b>PPF 50</b>	<b>PPF 50</b>
<b>CO<sub>2</sub> 350</b>	<b>CO<sub>2</sub> 1000</b>	<b>CO<sub>2</sub> 350</b>	<b>CO<sub>2</sub> 1000</b>

**Fig 30. Effects of CO<sub>2</sub>(350, 1000 mol mol<sup>-1</sup>) and PPF(50, 150μmolm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) on growth of chrysanthemum after 30 days of microponic culture.**

이 같은 결과는 앞서의 실험에서와 같이 국화묘의 성장에는 광도의 영향이 가장 크다는 것을 암시한다. 일반적으로 기내에서 바로 나온 식물의 경우에는 광도를 서서히 높여야 하나 본 실험에 사용된 국화 cutting은 생물반응기에서부터 고풍(100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)하에서 성장하였기 때문에 기외에서도 높은 광도 하에서 발근과 지상부 생장이 더욱 촉진되었던 것으로 생각된다 (Hahn et al., 1999). 이 같은 경향은 광합성, 기공전도도, 증산률의 측정에서도 나타났는데 광도가 높은 경우에는 CO<sub>2</sub> 농도와 관계 없이 광합성, 기공전도도, 증산률이 모두 높았지만 광도가 낮은 경우에는 CO<sub>2</sub> 농도가 높았을 때의 광합성, 기공전도도, 증산률이 CO<sub>2</sub> 공급을 하지 않았을 때에 비해 훨씬 높게 나타났다. (Fig. 31). 이에 비해 Fv/Fm 수치는 처리 별로 뚜렷한 경향을 나타내지 않았는데, 이는 삼수의 기외 이식 후 발근과 새로운 잎의 전개 등으로 생장이 충분히 이루어지지 않은 상태에서 chlorophyll fluorescence 측정이 이루어졌기 때문으로 생각되었다. 따라서 새로운 잎의 전개가 충분히 이루어진 후 측정한다면 처리에 따른

Fv/Fm의 차이가 뚜렷할 것으로 생각된다.

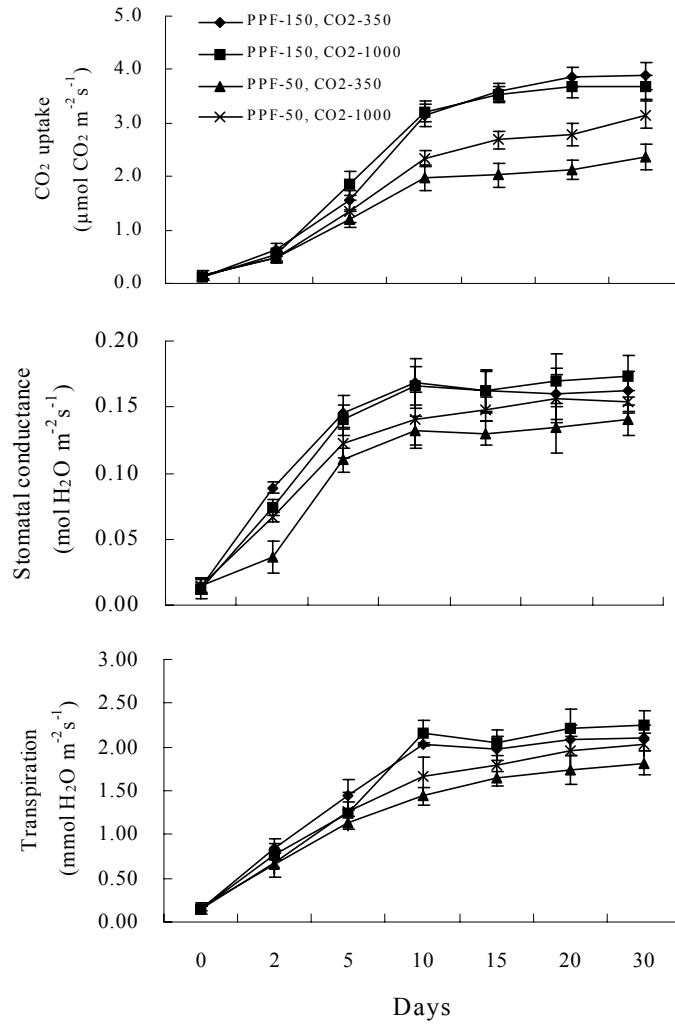
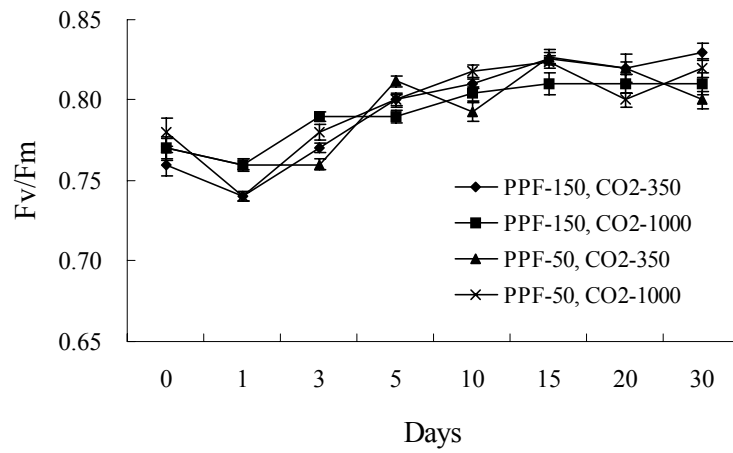


Fig. 31. Change in CO<sub>2</sub>-uptake, stomatal conductance and transpiration of the plantlet during 30days of microponic culture at different PPF and CO<sub>2</sub> levels.



**Fig. 32. Change in maximum photochemical efficiency of PS II ( $F_v/F_m$ ) of the plantlet during 30days of microponic culture at different PPF and  $CO_2$  levels.**

최종적으로 지금까지의 실험결과를 토대로 생물반응기에서 대량 생산된 국화 삽수를 한꺼번에 발근, 순화 및 공정묘까지 성장시킬 수 있는 새로운 transplant 생산시스템(microponic culture system)을 확립하였다 (Fig. 33).

## Hydroponic Culture System for Transplant production

### Metal halide and high-pressure sodium lamps

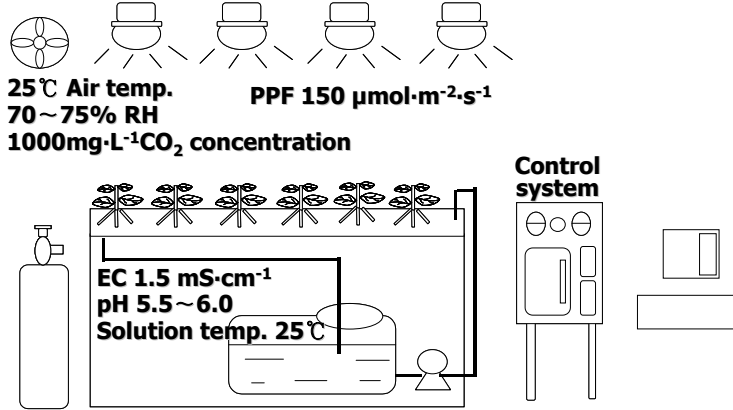


Fig. 33. Establishment of microponic culture system for the production of chrysanthemum transplants.

### 실험 6. 저온처리에 의한 국화묘의 rosette화 방지

배양 0, 30, 60일 후 묘 생장을 비교하였다. 저온처리한 묘의 생장이 저온처리를 하지 않은 묘(대조구)에 비하여 성장속도가 약간 빨랐고 고른 생육을 보였는데 이 같은 결과로 보아 저온처리를 실시하는 것이 묘의 성장 기간을 단축하는데 효과적으로 생각되었다(Table 24), (Fig. 34). 정식 초기에는 식물체(plantlet) 상태에서 저온처리 했을 때 잎수, 초장, 지상부 무게, 지하부 무게, 뿌리 길이 등 모든 조사항목에서 가장 높은 생장을 보였다. 그러나, 생육 중기 이후부터는 기내묘(in vitro) 상태에서 저온처리한 구에서 빠른 생장을 보여, 식물체 상태에서 저온 처리한 구와 거의 같은 증가율을 보였다. 이 같은 실험 결과로 미루어 볼 때, 배양병 내의 식물체를 저온처리 하는 것이 기외로 나온 식물체 상태로 저온 처리하는 방법에 비해 처리하기가 간편하고, 저온처리 기간동안 식물생장이 영향을 덜 받기 때문에 훨씬 효과적인 방법으로 생각되었다.

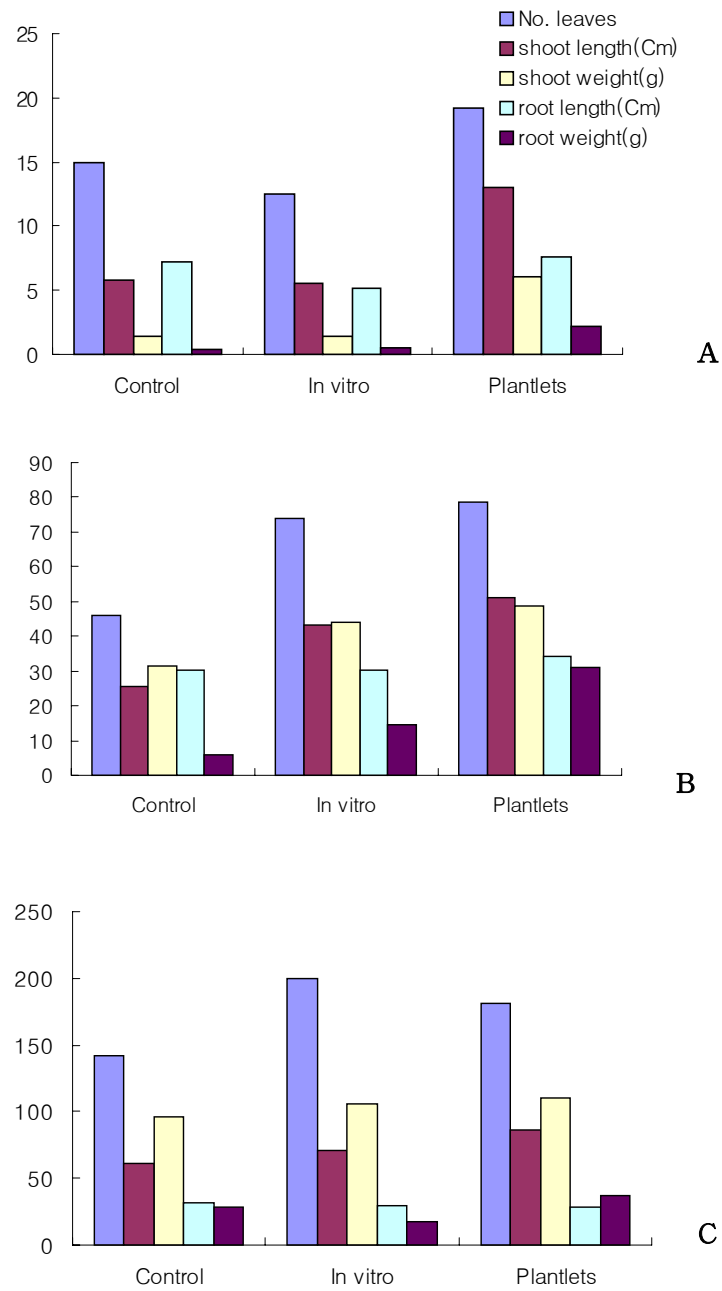
신마의 경우에는 추계 개화성 품종으로 여름철 단일 처리를 실시하지 않았으므로 개화까지는 관찰할 수 없었으나 저온처리 및 무처리구 모두 로제트 현상은 발생하지

않았고, 단지 저온처리하지 않은 묘의 생장이 저온처리한 묘에 비해 약간 낮았다 (Table 24).

**Table 24. Effect of low temperature treatment time on growth of chrysanthemum transplants 'Shinma' after 40 days (Transplanted in April).**

Treatment time	Date	No. leaves	Shoot		Root	
			length (cm)	Weight (g)	Length (cm)	Weight (g)
Control	0	15.00b <sup>z</sup>	5.83b	1.46b	7.23ab	0.50b
	30	46.00b	25.63c	31.63b	29.38a	6.08c
	60	141.75a	61.23c	95.90a	31.25a	28.54a
In vitro	0	12.50c	5.55b	1.38b	5.2b	0.43b
	30	74.00a	43.25b	44.05a	30.28a	14.58b
	60	199.5a	71.2b	105.40a	29.63a	17.90a
Ex vitro	0	19.25a	13.03a	6.02a	7.56a	2.13a
	30	78.75a	51.00a	48.92a	30.38a	29.81a
	60	181.00a	85.88a	110.10a	28.75a	37.10a

<sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test,  $P \leq 0.05$ .



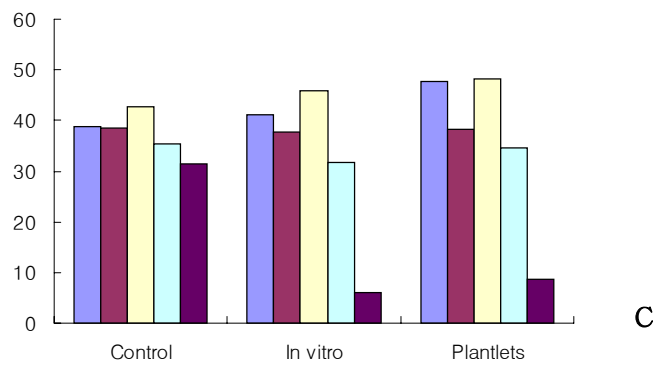
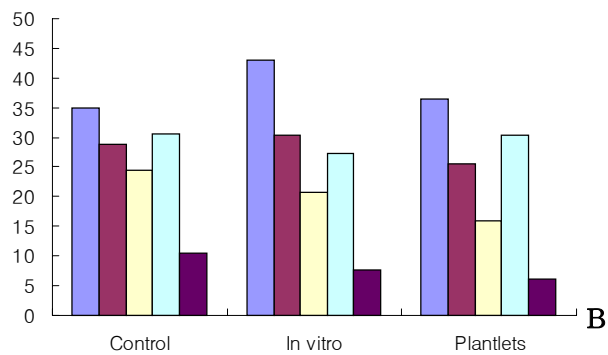
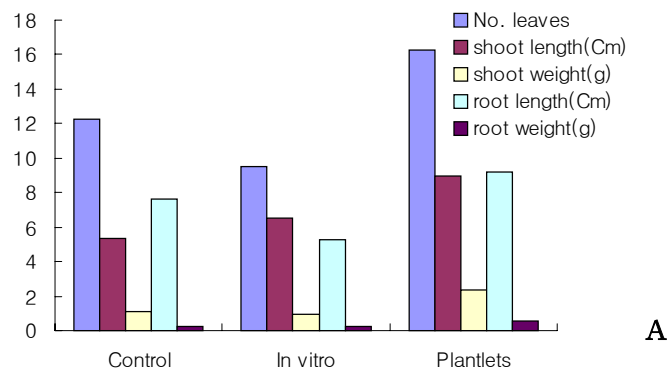
**Fig. 34. Effect of low temperature treatment time on growth of chrysanthemum transplants 'Shinma' after 40 days (A: 0 day after treatment, B: 30 days after treatment, C: 60 days after treatment).**

백선에서도 신마와 마찬가지로, 초기에는 순화완료후 식물체(plantlet)로 저온처리한 구에서 가장 생장이 좋았다. 그러나 생장기간이 경과함에 따라 기내 저온처리구(in vitro)가 빠르게 성장하여 식물체를 저온처리한 묘보다 오히려 보다 성장속도가 더 빨랐고 생장 후기에는 저온처리구에서 화아 분아가 빠르게 일어나 개화하였고, 저온처리하지 않은 대조구의 묘는 화아 분아가 느렸다 (Table 25), (Fig 35). 그러나 백선이 여름 개화성 품종이어 초장을 신장시키기 위해 전조재배를 실시하여야 하였으나, 자연 일장조건으로 재배하여 초장이 신장하지 못한 상태에서 개화하였다.

**Table 25. Effect of low temperature treatment time on growth of chrysanthemum transplants 'Baeksun' after 40 days (Transplanted in April).**

Treatment	Date of measurement	No. leaves	Shoot		Root	
			length (cm)	Weight (g)	Length (cm)	Weight (g)
Control	0	12.25a <sup>z</sup>	5.35b	1.08b	7.63a	0.23b
	30	35.00a	28.75a	24.35a	30.5a	10.48a
	60	38.75a	38.6a	42.63a	35.48a	31.43a
In vitro	0	9.5b	6.55b	0.97b	5.25b	0.25b
	30	43.00a	30.38a	20.78ab	27.33a	7.66a
	60	41.25a	37.63a	45.83a	31.63a	6.08b
Plantlets	0	16.25a	8.93a	2.33a	9.20a	0.55a
	30	36.50a	25.5b	15.98b	30.38a	6.08a
	60	47.75a	38.25a	48.15a	34.63a	8.71b

<sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test,  $P \leq 0.05$ .



**Fig. 35. Effect of low temperature treatment time on growth of chrysanthemum transplants 'Baeksun' after 40 days(A: 0 day after treatment, B: 30 days after treatment, C: 60 days after treatment).**



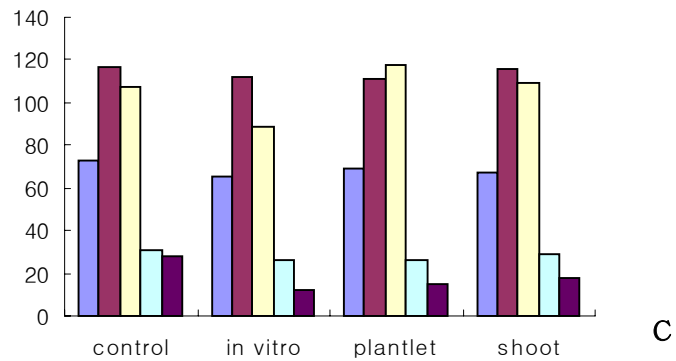
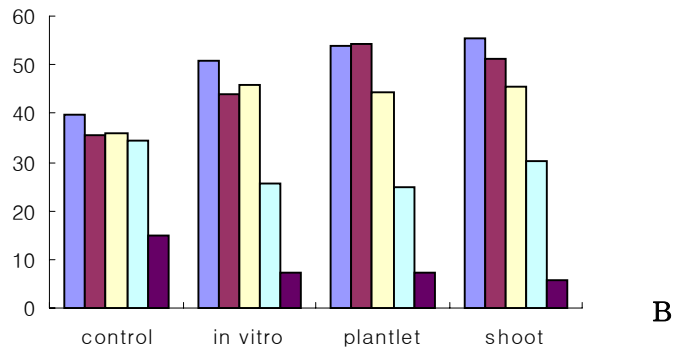
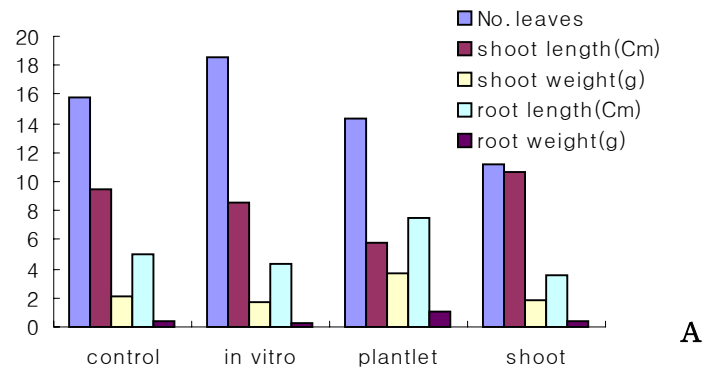
6월 17일 정식한 신마의 경우에도 정식시의 식물체 생장은 기내 저온처리구에서 가장 빨랐고 다음이 대조구의 순이었으나 생장 중반기 이후부터는 저온처리구와 무처리구 간의 차이가 커졌다. 즉, 저온처리구의 묘는 고른 생장을 한 반면, 무처리구의 묘 생장은 저하하였다(Table 26) (Fig. 356. 또한 화아 분아도 약간 늦어지는 경향을 보였다.

지금까지의 실험결과를 토대로 본다면, 생장 환경조건이 열악한 겨울철 재배시에는 저온처리에 의해 생장과 개화를 정상적으로 유지할 수 있고 로제트를 방지할 수 있어 산업적인 대량생산의 경우에는 저온처리를 실시하는 것이 바람직할 것으로 생각되었다. 또한, 저온처리의 시기로는 묘의 기내 증식 후 배양용기 채로 저온처리를 실시하는 것이 기외 이식 후 저온처리하는 것에 비해 묘의 handling 등에 있어 훨씬 유리한 점이 많은 것으로 생각되었다.

**Table 26. Effect of low temperature treatment time on growth of chrysanthemum transplants 'Baeksun' after 40 days (Transplanted in June).**

Treatment	Date of measurement	No. leaves	Shoot		Root	
			length (cm)	Weight (g)	Length (cm)	Weight (g)
Control	0	15.8b <sup>z</sup>	9.44ab	2.07b	5.0b	0.39b
	30	39.75b	35.58c	35.76a	34.3a	15.03a
	90	72.5a	116.63a	107.27ab	30.68a	28.16a
In vitro	0	18.6a	8.60b	1.89b	4.3b	0.23b
	30	50.75a	44.10c	46.02a	25.65b	7.12a
	90	65.75a	111.88a	88.85b	26.08a	12.02b
Plantlets	0	14.4b	5.74c	3.72a	7.54a	1.09a
	30	53.75a	54.33a	44.92a	24.95b	7.16a
	90	69.25a	111.53a	117.63a	26.40a	15.20ab
Shoot	0	11.2c	10.6a	1.89b	3.58b	0.35b
	30	55.50a	51.18a	45.63a	30.08a	5.66a
	90	67.00a	115.50a	109.02ab	29.03a	17.38a

<sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test,  $P \leq 0.05$ .



**Fig. 36. Effect of low temperature treatment time on growth of chrysanthemum transplants 'Baeksun' after 40 days(A: 0 day after treatment, B: 30 days after treatment, C: 60 days after treatment).**

**실험 7. 생물 반응기와 Microponic culture system을 이용해 생산된 묘와 기존 관행배양 방법과의 비교**

생물반응기와 microponic system을 이용하였을 때의 국화 transplant 생장은 기존의 방법으로 증식, 순화된 국화묘에 비해 초장, 엽수, 생체중, 경경 모두 1.5배 이상의 증가를 보였다(Table 27), (Table 28), (Fig. 38), (Fig. 39). 특히, 초장의 신장은 2배 이상 증가하였다. 이 같은 생장의 차이는 생물반응기에서의 배양환경 최적화와 연관이 있으며 이에 대해서는 앞서의 실험 결과에서 충분히 설명되었다. 또한 microponic culture system에서는 배양액을 이용하고 지상부 지하부 환경 조절로 발근을 빨리 시켰기 때문에 그 이후의 지상부 성장 속도가 기존의 순화 시스템에서의 묘에 비해 현저히 증가하였던 것으로 생각되었다. (Hahn et al., 2000).

이상의 결과에서와 같이 국화 transplant의 생산에 생물반응기와 microponic system을 적용한다면 한꺼번에 많은 수의 삽수를 얻을 수 있을 뿐 아니라 기외순화 및 transplant 생산까지의 성장기간을 단축 시키고 고품질의 묘를 얻을 수 있어 시간과 노동력의 절감에 크게 기여할 수 있는 것으로 판단되었다. 특히 일시에 같은 소질의 묘를 대량생산할 수 있어 기외에서의 반복적인 삽수 채취에 따른 시간과 노동력의 낭비 및 이에 따른 묘 소질의 저하를 막을 수 있는 효율적인 시스템으로 생각되었다.

**Table 27. Growth of chrysanthemum plantlets as affected by culture methods.**

Culture method	No. leaves	Shoot length (cm)	Shoot weight (g)	Stem diameter (cm)
Conventional culture	24.4±0.54 <sup>z</sup>	7.61±0.40	1.13±0.10	0.17±0.01
Bioreactor culture	17.9±0.54	15.11±0.63	2.49±0.22	0.24±0.01

<sup>z</sup>Mean±standard error.

**Table 28. Ex vitro growth of chrysanthemum transplants as affected by acclimation methods.**

Culture method	No. leaves	Shoot		Root	
		length(cm)	weight(g)	length(cm)	weight(g)
Conventional method	15.4±0.51	10.28±0.33	2.46±0.22	8.50±0.69	0.55±0.07
Microponic culture	14.9±0.37	15.38±0.32	2.94±0.18	8.04±0.65	0.52±0.05

<sup>z</sup>Mean±standard error.



**Fig. 38. Growth of chrysanthemum plantlets as affected by culture methods (Left: Conventional culture, Right: Bioreactor culture).**



**Fig. 39. Growth of chrysanthemum transplants as affected by acclimation methods (Left: Conventional method, Right: Microponic culture).**

#### **4. 생물반응기 생산묘를 이용한 국화재배**

상품성이 높은 고품질의 국화를 생산하기 위해서는 여름철 고온과 고광으로 인한 초장 감소, 노심 등의 생리장애 발생을 방지해야 한다. 이를 위해서는 우량묘의 사용이 필수적이며 원하는 시기에 고품질의 절화를 생산하기 위해 성장조절제 처리 등으로 지상부 및 지하부의 생육 환경과 생리 기작을 조절하는 것도 필요하다. 특히 양액재배로의 전환이 절실한 실정인데 최근 들어 국화의 양액재배 면적이 증가 추세에 있다. 이에 따라 재배기술의 확립을 위한 많은 연구가 필요하다. 이에 따라 본 연구에서는 생물반응기에서 대량생산된 삼수를 양액재배시스템을 적용(microponic culture)하여 transplant를 생산한 후 실제 재배 실증 실험을 하였는데, 기존의 삼수를 이용하였을 때와 식물체생장, 개화, 절화 품질 등을 비교하였다.

## 가. 실험방법

### 실험 1. 양액재배시 성장조절제 처리에 따른 국화 transplants의 성장 및 절화품질에 미치는 영향

본 실험은 충북농업기술원의 비닐하우스에서 수행하였다. 하우스는 측창, 환풍기 및 환기팬을 설치하여 고온 방지 및 시설내 공기의 흐름을 원활하게 하였으며 한여름 고온 및 고광의 피해를 줄이고자 7, 8월은 비닐하우스 외표면에 30% 차광망을 설치하여 차광하여 주었다. 양액재배 베드는 하우스 파이프( $\phi$  25mm)를 이용, 높이 1m, 길이 30m, 너비 70cm의 길이로 제작, 1/500의 경사도를 주었으며, 성형 스티로폼베드 100×37×19cm를 베드위에 안착시키는 방법으로 베드를 만들어 사용하였다. 배지로는 파라트 1호와 2호((주)삼손)를 섞어서 스티로폼 베드를 채우고 0.5마력의 모타를 설치, 타이머를 이용해 관수하였으며 점적호스를 이용하였다.

배양액은 화란 온실연구소의 국화전용액을 사용하였으며, microponic culture system에 의하여 생산된 묘와 재래식 삽목방법으로 생산된 'Jeongun' 묘를 사용하여 3월 18일에 베드당 10×10cm, 2조식으로 정식하였다. 정식 후 1주일은 배양액을 섞지 않은 지하수만으로 관수한 뒤 1주일 후부터 생육전기까지는 1일 6~8회 배양액을 공급하였고 생육중기부터 화되기까지는 10~12회, 화되기 이후는 8~10회로 생육단계 및 계절에 따라 차등을 주어 1회당 15분씩 공급하였다.

성장조절제 처리로는  $GA_3$  50, 100mg · L<sup>-1</sup>과 에테폰 50, 100mg · L<sup>-1</sup>을 정식 후 22, 29일에 잎과 줄기에 골고루 분무해주었으며 월 1회 병충해 방제를 실시하였다. 무적심으로 재배하였고 시험구 배치는 난괴법 3반복으로 실험을 수행하였다. 주요 생육조사는 처리별로 생육 상화, 절화 품질, 개화 소요일수, 생리 장애 및 상품수량 등을 농진천 농사시험연구 조사기준(RDA, 1995)에 준하여 조사하였다. 초장은 만화기 때 지표면에서부터 꽃의 상단부까지, 화경장은 절단부위에서부터 꽃의 상단부까지, 화수장은 상위 제 1엽부터 꽃받침까지를 측정하였으며, 경경은 꽃 수확 시 절단부위에서 1cm이내의 직경을, 생리장애 발생은 반복구별 300주씩을 육안 조사하였고, 상품수량은 생리장애 발생량을 제외한 절화수를 조사하여 300평으로 환산 산출하였다.

### 실험 2. 하추국 양액 재배시 성장조절제 처리가 재절화 품질에 미치는 영향

실험 재료 및 양액재배 방법은 실험 1에서와 동일하게 설정하였고 생물반응기에와

microponic system에서 생산된 국화 transplants를 이용하여 1차 절화 후 재절화 재배를 위해 성장조절제 처리를 하였다. 무적심으로 재배하였고 난피법 3반복으로 실험을 수행하였다. 1차수확은 성장조절제별로 다소 차이가 있어 무처리구는 7월 5일, GA<sub>3</sub> 처리구는 농도에 관계없이 6월 26일, 에데폰 처리구는 7월 26일에 일제히 수확을 하였다.

재절화 재배는 1차 수확 후 지하부 모주에서 성장한 곁가지 중 세력이 제일 왕성한 1개를 골라 2차 수확경으로 하였으며 잔여 곁가지는 모두 제거하였다. 재절화 재배시 성장조절제처리 역시 1차 재배 때와 마찬가지로 GA<sub>3</sub> 100, 200 및 400mg · L<sup>-1</sup>과 에데폰 50, 100 및 150mg · L<sup>-1</sup>을 절화 후 15, 22일 2회 엽, 경에 골고루 묻도록 분무 해주었다.

## 나. 실험결과

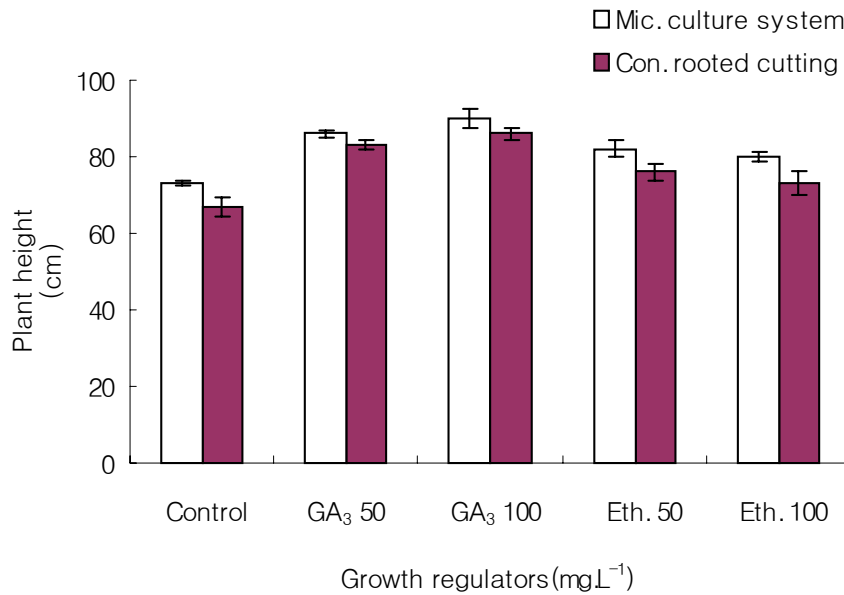
### **실험 1. 양액재배시 성장조절제 처리에 따른 국화 transplants의 성장 및 절화품질에 미치는 영향**

생물반응기와 microponic system에 의하여 생산된 묘와 재래식 삽목묘를 사용하여 양액재배 하였을 때 성장조절제 처리가 초장에 미치는 영향은 Fig. 40과 같다. 재래식 삽목묘에 비해 생물반응기에서 생산된 묘의 초장이 더 길었고 성장조절제 처리의 경우에는 묘 생산방법에 관계없이 무처리에 비해 GA<sub>3</sub> 처리시 초장의 신장이 현저했다. 특히 GA<sub>3</sub> 100mg · L<sup>-1</sup> 처리구에서 초장이 가장 길게 나타났다. 생물반응기에서 생산된 묘의 초장이 길었던 것은 재래식 삽목묘에 비해 생육기간이 길었기 때문인 것으로 보인다. 국화는 바이러스에 감염시 바이러스 종류에 따라 초장이 현저히 감소하는 경우도 있다고 하였으나(Jeong 등, 2002), 본 실험에서는 바이러스 감염에 의한 초장 신장의 억제현상은 없었다. 또한, 성장조절제인 GA<sub>3</sub>는 줄기생장을 촉진시킨다고(De Hertogh와 Blakely, 1972; MacMillan, 1980)하였는데, 본 실험에서도 묘생산방법에 관계없이 무처리에 비해 GA<sub>3</sub> 처리시 초장이 커지는 경향이어서 같은 결과를 보였다.

묘 생산방법 및 성장조절제 처리가 생육에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 29와 같다. 엽수는 묘 생산방법에 있어서는 큰 차이를 보이지 않았으나 성장조절제 별로는 에데폰 처리구에서 가장 높게 나타났으며, 이는 절수에 있어서는 마찬가지로 경향이였다. 경경 및 절간길이는 GA<sub>3</sub> 100mg · L<sup>-1</sup> 처리구에서 다소 증가하였으며, 절간길이의 경우 에데폰 처리구에서 짧아지는 경향이였다. 엽록소함량은 Microponic culture

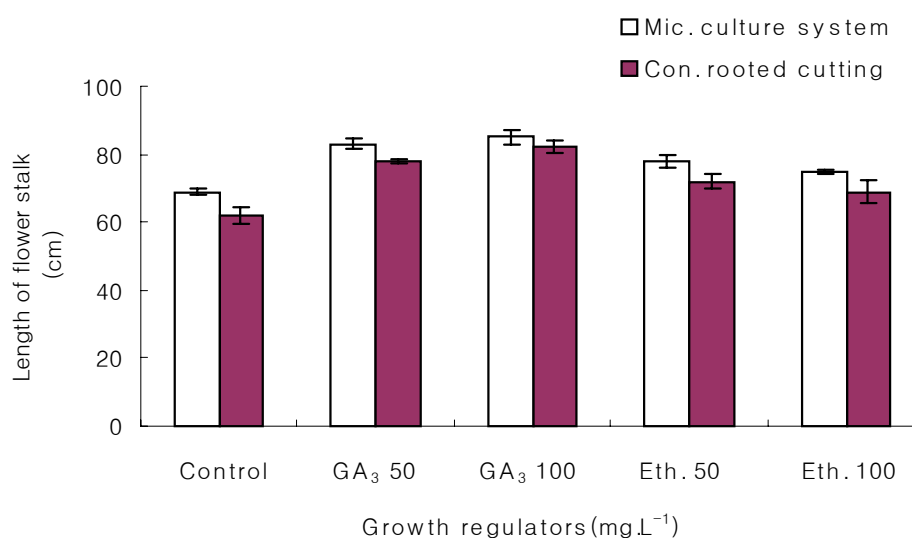
system에 의하여 생산된 묘에 비해 재래식 삽목묘에서 증가하는 경향이었으며, 성장 조절제 처리에서는 큰 차이를 보이지 않았다.

묘 생산방법 및 성장조절제 처리에 따른 화경의 길이도 초장에서와 마찬가지로 생물반응기 생산묘를 이용하였을 경우가 기존의 삽수 이용방법에 비해 성장조절제 처리와 관계없이 길었으며, GA<sub>3</sub> 처리가 무처리에 비해 화경장을 증가시키는데 효과적이었다. GA<sub>3</sub> 100mg · L<sup>-1</sup> 처리구에서 가장 좋은 결과를 보였다(Fig. 41).



**Fig. 40. Effect of growth regulators on plant height in hydroponic culture of chrysanthemum 'Shinma'.**





**Fig. 41. Effect of growth regulators on flower stalk length in hydroponic culture of chrysanthemum ‘Shinma’.**

**Table 29. Effect of growth regulators on growth of chrysanthemum ‘Shinma’ in hydroponic culture.**

Plantlets production method(A)	Growth regulators (mg · L <sup>-1</sup> )	No. leaves /branch	Stem diameter (mm)	No. internode	Internode length	Spad
Microponic culture system	Control	32.9 e <sup>z</sup>	4.2 a	9.0 bc	1.7 a	48.0 b
	GA <sub>3</sub> 50	35.1 de	4.2 a	8.0 bc	1.9 a	51.7 ab
	GA <sub>3</sub> 100	38.1 cde	4.7 a	7.3 c	2.0 a	51.8 ab
	Eth. 50	47.5 ab	4.3 a	18.3 a	0.8 a	53.4 ab
	Eth.100	50.0 a	4.2 a	20.3 a	0.7 a	53.6 ab
Rooted cutting	Control	31.3 e	4.3 a	12.0 b	1.3 a	55.9 a
	GA <sub>3</sub> 50	38.2 cde	4.3 a	10.0 bc	1.5 a	57.3 a
	GA <sub>3</sub> 100	39.2 bcde	4.6 a	9.3 bc	1.6 a	59.4 a
	Eth. 50	45.6 abc	4.6 a	22.0 a	0.7 a	56.4 a
	Eth.100	44.3 abcd	4.6 a	22.3 a	0.7 a	58.7 a
LSD .05	(A)	ns	ns	ns	*	*
	(B)	**	**	**	**	ns
	(A)×(B)	ns	*	ns	ns	ns

<sup>z</sup>DMRT 0.05

묘 생산방법 및 성장조절제 처리가 잎, 줄기, 뿌리 및 꽃의 생체중에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 30과 같다. 참나리 인편번식시 성장조절제인 NAA  $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 농도에서 생체중이 증가한다고(Chung 등, 1981) 하였는데, 본 실험에서도 생체중은 줄기를 제외한 잎, 뿌리 및 꽃에서 무처리에 비해 성장조절제 처리에서 증가하는 경향을 보였고, 성장조절제 별로는  $\text{GA}_3$  처리에 비해 에데폰 처리에서 대체적으로 높아지는 경향이었고, 묘 생산 방법별로는 큰 차이를 보이지 않았다. 성장조절제 처리에서 생체중의 증가는 무처리에 비해 초장, 화경장 등의 증가로 인하여 생체중도 상대적으로 증가 한 것이 아닌가 판단되었다.

**Table 30. Effect of growth regulators on fresh weight of hydroponically grown chrysanthemum plants bioreactor system and conventional system.**

Plantlets production method(A)	Growth regulators(B) ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Fresh weight (g/plant)			
		Leaf	Shoot	Root	Flower
Microponic culture system	Control	32.5 ab <sup>z</sup>	7.3 a	24.4 ab	10.3 c
	$\text{GA}_3$ 50	33.2 a	8.2 a	25.6 ab	11.5 bc
	$\text{GA}_3$ 100	38.2 a	9.5 a	29.3 a	13.8 abc
	Eth. 50	35.5 a	8.4 a	27.0 ab	12.6 bc
	Eth. 100	36.8 a	9.0 a	28.7 a	12.9 abc
Conventional rooted cutting	Control	29.7 b	8.2 a	15.1 b	12.5 bc
	$\text{GA}_3$ 50	36.6 ab	9.1 a	20.0 ab	14.0 abc
	$\text{GA}_3$ 100	29.9 b	8.4 a	17.7 ab	16.3 ab
	Eth. 50	40.2 ab	10.1 a	24.7 ab	15.6 ab
	Eth. 100	42.0 a	10.1 a	26.2 ab	17.7 a
LSD .05	(A)	ns	ns	ns	ns
	(B)	*	ns	ns	**
	(A)×(B)	*	ns	ns	ns

<sup>z</sup>DMRT 0.05

묘 생산방법 및 성장조절제 처리가 잎, 줄기, 뿌리 및 꽃의 건물중에 미치는 영향을 조사한 결과, 무처리구에서는 생물반응기 생산묘의 건물중이 재래식 삼목묘에 비해 모두 높았으나 GA<sub>3</sub> 처리시에는 큰 차이가 없었다(Table 31).

**Table 31. Effect of growth regulators on dry weight of hydroponically grown chrysanthemum plants produced by bioreactor system and conventional system.**

Plantlet production method(A)	Growth regulators(B) (mg · L <sup>-1</sup> )	Dry weight (g/plant)			
		Leaf	Shoot	Root	Flower
Microponic culture system	Control	11.1 bc <sup>z</sup>	6.0 d	13.0 bcd	3.6 c
	GA <sub>3</sub> 50	9.8 c	6.9 bcd	11.4 cde	4.0 bc
	GA <sub>3</sub> 100	10.4 c	7.5 bcd	12.4 cd	4.2 bc
	Eth. 50	12.2 abc	6.3 cd	13.2 bcd	3.7 c
	Eth. 100	11.8 abc	7.3 bcd	20.1 a	3.9 bc
Conventional rooted cutting	Control	5.1 d	6.3 cd	10.6 de	4.1 bc
	GA <sub>3</sub> 50	11.4 bc	8.1 bc	7.5 e	4.1 bc
	GA <sub>3</sub> 100	13.0 abc	10.5 a	15.8 abc	4.9 ab
	Eth. 50	14.1 ab	8.8 ab	17.4 ab	6.0 a
	Eth. 100	15.1 a	8.8 ab	17.3 ab	4.7 bc
LSD .05	(A)	ns	**	ns	*
	(B)	**	**	**	**
	(A)×(B)	**	*	**	**

<sup>z</sup>DMRT 0.05

묘 생산방법 및 성장조절제 처리가 절화품질 및 개화기에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 32와 같다. 절화 튜울립의 수확 후 ethephon 전처리는 꽃목의 신장을 억제시켜 휘어지는 현상을 방지할수 있었다고 하였는데(Suh와 Lee, 1997), 본 실험에서도 묘생산 방법에 관계없이 에데폰 처리시 화수장이 짧아져 이와 같은 결과를 보였다. 꽃목 굵기의 경우 bioreactor 생산묘가 재래식 삼목묘에 비해 다소 증가하였으며,

화국은 묘 생산 방법에 관계없이 무처리에 비해 성장조절제 처리구에서 증가하는 경향이였다. 개화소요일수에 있어서는 묘 생산 방법별로는 Microponic culture system에 의하여 생산된 묘에서 늦어지는 경향이였고 성장조절제별로는 GA<sub>3</sub> 처리의 경우 Microponic system에 의하여 생산된 묘에서 빨라지는 경향이였고, 에데폰 처리시는 묘 생산방법에 관계없이 무처리에 비해 14~16일 정도 지연되는 경향이였다. 식물의 개화조절을 위해 주로 사용하고 있는 수단으로는 온도, 일장외에 성장조절물질을 사용하고 있는데(Lee, 1991), 성장조절제인 GA<sub>3</sub> 국화의 개화기간을 단축시킨다고 하였고(Kim 등, 2000), 에데폰은 백합에서는 개화를 촉진시키지만(Lee와 Roh, 1985), 국화에서는 본 실험과 같이 개화를 지연시킨다고 하여(Sachs, 1972) 작목에 따라 작용기작이 다르게 나타나는 것으로 판단되였다.

**Table 32. Effect of growth regulators on growth of hydroponically grown chrysanthemum produced by bioreactor system and conventional system.**

Plantlets production method(A)	Growth regulators(B) (mg · L <sup>-1</sup> )	Length of spike (cm)	Dimeter of spike (mm)	Flower width (cm)	Days to flowering
Microponic culture system	Control	5.2 a <sup>z</sup>	2.4 a	12.0 a	109
	GA <sub>3</sub> 50	5.9 a	2.7 a	12.3 a	103
	GA <sub>3</sub> 100	5.9 a	2.9 a	12.4 a	102
	Eth. 50	3.5 b	2.9 a	12.5 a	117
	Eth. 100	3.5 b	2.6 a	12.4 a	119
Conventional rooted cutting	Control	5.7 a	2.6 a	12.1 a	103
	GA <sub>3</sub> 50	5.6 a	3.0 a	12.6 a	103
	GA <sub>3</sub> 100	6.0 a	3.1 a	12.4 a	101
	Eth. 50	3.7 b	3.1 a	12.8 a	119
	Eth. 100	3.4 b	3.1 a	13.1 a	118
LSD .05	(A)	ns	ns	ns	
	(B)	**	ns	**	
	(A)×(B)	ns	ns	*	

<sup>z</sup>DMRT 0.05

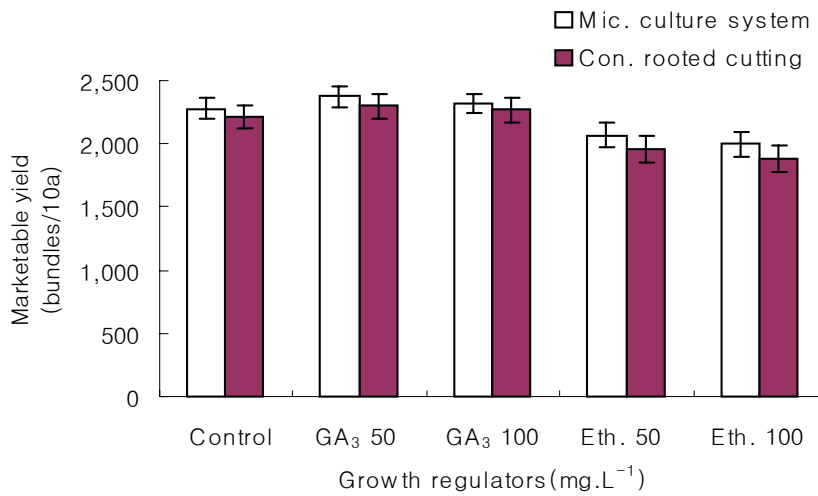
묘 생산방법 및 성장조절제 처리가 생리장애에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 33과 같다. 생리장애는 재래식 삽목묘에 비해 bioreactor 생산묘묘에서 적었으며, 성장조절제 별로는 무처리에 비해 GA<sub>3</sub> 처리구에서 적었으며, 에테폰 처리구에서는 증가하는 경향이였다. 일반적으로 국화에서 관찰되는 바이러스 병징은 모틀증상이며, 그 외에 위축, 잎 뒤틀림 황화증상 등이 있다고 하였고, 많은 품종들에 있어서 CVB 감염에 의해서는 병징을 나타내지 않는다고 하였는데(Jeong 등, 2002), 본 실험에서는 위에서 언급한 증상 등은 거의 관찰되지 않았으나 재래식 삽목묘의 바이러스 감염 여부에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 판단되었다.

**Table 33. Effect of growth regulators on occurrence of physiological disorders in hydroponically grown chrysanthemum produced by bioreactor system and conventional system.**

Plantlets production method	Growth regulators (mg · L <sup>-1</sup> )	Open center (%)	Atrophy (%)	Crown bud (%)	Malformed flower (%)	Others (%)	Total (%)
Microponic culture system	Control	4.0	0.0	2.5	1.0	1.0	8.8
	GA <sub>3</sub> 50	3.2	0.0	1.0	0.3	0.5	5.0
	GA <sub>3</sub> 100	4.0	0.0	2.0	0.5	0.5	7.3
	Eth. 50	7.5	0.0	6.0	2.1	1.7	17.3
	Eth. 100	8.0	0.3	8.4	1.3	2.1	20.1
Conventional rooted cutting	Control	5.3	0.0	3.0	1.7	1.5	11.5
	GA <sub>3</sub> 50	4.5	0.0	1.5	1.0	1.0	8.0
	GA <sub>3</sub> 100	4.0	0.3	3.5	0.5	1.0	9.3
	Eth. 50	8.5	0.5	7.5	3.0	2.1	21.6
	Eth. 100	11.0	1.0	7.0	3.5	2.1	24.6

묘 생산방법 및 성장조절제 처리가 상품수량에 미치는 영향은 Fig. 42에 나타내었다. 상품수량은 성장조절제 처리에 관계없이 재래식 삽목묘에 비해 Microponic culture system에 의하여 생산된 묘에서 증가하였으며, 특히 성장조절제인 GA<sub>3</sub> 처리구에서 가장 높게 나타났다. Microponic culture system에 의하여 생산된 묘에서 상품수량이 증가한 것은 생육기간의 연장으로 인한 초장 및 화경장의 증가와 무병주 재배에 의한 절화품질 등의 향상에 의한 결과로 판단되었다. 따라서 해외 수출시장 및 국

내 수요 등의 확대를 위해서는 절화품질을 향상시키고 생산성을 높일수 있는 Microponic culture system에 의한 무병주의 묘 공급이 확대되어야 할 것으로 판단되었다.



**Fig. 42. Effect of growth regulators on marketable yield in hydroponically grown *Chrysanthemum* ‘Shinma’ produced microponic culture system.**

## 실험 2. 하추국 양액 재배시 성장조절제 처리가 재절화 품질에 미치는 영향

재절화 재배 시 성장조절제 처리가 생육에 미치는 영향을 보면 엽수는 무처리에 비해 성장조절제 처리에서 대체적으로 많이 부착되었으며 특히 에테폰 처리에서 또한 에테폰의 농도가 높을수록 높게 나타났다. 그러나 GA<sub>3</sub>처리에서는 28.9~31.1개의 범위로 농도간의 차이는 없었다. (Table 34). 화경장의 경우는 GA<sub>3</sub> 처리에서 무처리보다 13.3~19.3cm 길었으나 농도간의 유의차는 없었으며, 에테폰 처리시에는 농도가 높아질수록 무처리에 비해 짧아졌다. 경경 역시 화경장의 경우와 비슷한 경향으로 GA<sub>3</sub> 처리에서 양호하였다. 화폭은 무처리에 비해 에테폰 처리시 굵게 나타나 국화에 있어서 Ethrel 처리에 의해 화폭이 작아졌다는

Sachs(1972)의 보고 상이함을 나타냈고 에테폰의 농도가 높아감에 따라 다소 작아지는 경향이 있었으나 무처리나 GA<sub>3</sub>처리보다는 크게 나타났다. GA<sub>3</sub> 처리시는 무처리에 비해 별다른 차이가 없었으며 특히 400mg · L<sup>-1</sup>처리의 경우에는 무처리에 비해 작아지는 결과를 보였다. 꽃목굵기 및 화고 또한 화폭과 비슷한 결과로 에테폰 처리에서 굵고, 높게 나타났으나 GA<sub>3</sub> 처리시는 저조하였다. 개화소요일수의 경우 무처리에 비해 GA<sub>3</sub> 처리 시 10~12일 정도 단축되어 하추국 재절화 재배 GA<sub>3</sub> 처리시험에서 개화기가 단축되었다는 김 등 (2000)의 보고와 일치하였으며 에테폰 처리시는 15~29일 정도 연장되어 국화에 있어서 Ethrel 이 개화를 지연시킨다는 Sachs(1972)의 보고와 일치하여 성장조절제 처리에 의한 개화 시기의 조절로 단경기 생산의 가능성을 볼 수 있었다.

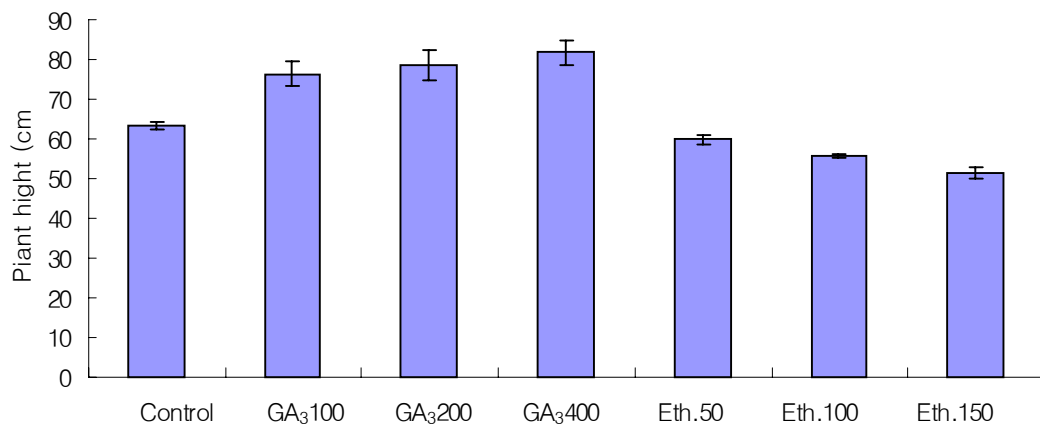
**Table 34. Effect of growth regulators on growth of hydroponically grown *Dendranthema grandiflorum* ‘Shinma’ in secondary flowering culture.**

Growth regulator (mg · L <sup>-1</sup> )	No. leaves /branch	Length of flower stalk (cm)	Stem diameter (mm)	Flower diameter (cm)	Diameter of flower neck (mm)	Spike length (cm)	Days to flowering
Control	27.5 d <sup>2</sup>	59.4 b	5.1 c	13.4 cd	3.9 c	3.8 abc	78
GA <sub>3</sub> 100	28.9 cd	72.7 a	6.0 ab	13.3 cd	3.3 d	3.6 bc	68
GA <sub>3</sub> 200	30.5 cd	75.3 a	5.9 ab	13.5 c	3.3 d	3.5 c	66
GA <sub>3</sub> 400	31.1 c	78.7 a	6.1 a	12.7 d	3.0 d	3.5 c	66
Eth. 50	40.1 b	56 b	5.3 bc	15.6 a	4.0 c	4.1 a	93
Eth. 100	44.1 a	52.4 bc	5.1 c	14.3 b	4.5 a	4.0 a	98
Eth. 150	45.5 a	48.2 c	4.7 c	14.6 b	4.3 b	3.9 ab	107

<sup>2</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

양액재절화 재배시 성장조절제 처리가 초장에 미치는 영향을 Fig. 43, 44에 나타냈다. 무처리에 비해 GA<sub>3</sub>처리시 초장이 커지는 결과를 볼 수 있어 GA<sub>3</sub>처리 시 화경장 및 초장이 길었다는 김 등 (2000)의 보고와 일치하였으나 농도간의 유의차는 없었으며 에테폰 처리시는 농도가 높아감에 따라 생육이 저조해지는 결과를 볼 수 있어 국화에 있어서 성장조절제 엽면 살포는 그 종류에 따른 처리농도와 시기, 처리횟수 등

을 정확히 구명할 필요가 있으며 성장조절제에 대한 국화의 성장반응은 환경조건에 따라 영향이 달라지므로 처리비율을 계절별로 조절할 필요가 있다(Cathey, 1964; McDaniel과 Fuhr, 1977)고 한 것과 같이 에데폰 처리 시 농도에 따른 초장의 감소는 에데폰 살포 당시 시설 내 고온에 의한 성장억제 효과에 기인한 것으로 판단되었다.



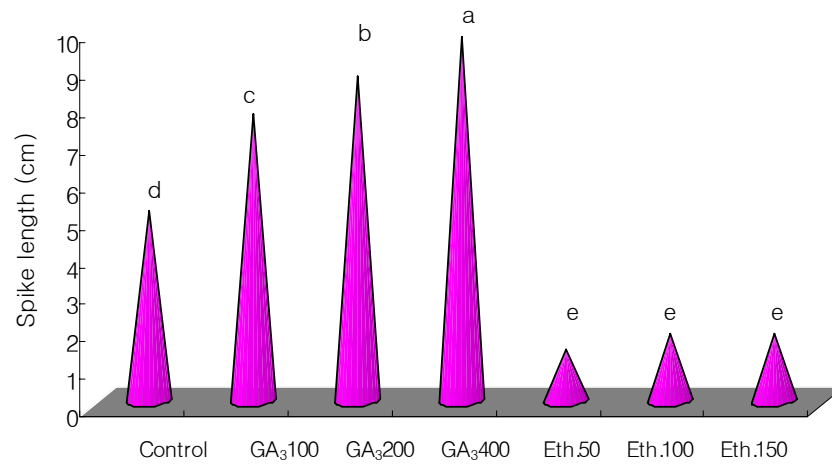
**Fig. 43. Effect of growth regulators on plant height of hydroponically grown *Dendranthema grandiflorum* 'Shinma' in secondary flowering culture.**





**Fig. 44. Effect of growth regulators on growth and flowering of *Dendranthema grandiflorum* 'Shinma' in secondary flowering culture.**

국화 양액 재절화 재배 시 성장조절제 처리가 화수장에 미치는 영향을 보면 무처리에 비해 GA<sub>3</sub>처리시 길게 나타났으며(Fig 45), 이와 같은 현상은 농도가 높아감에 따라 더욱 심하여 하추국 양액 재절화 재배시 GA<sub>3</sub>처리의 경우에는 화수장 단축을 위한 방법의 모색이 있어야 될 것으로 판단되었다. 에테폰 처리에서는 1.4~1.8cm의 범위로 단축 효과가 있어, Suh와 Lee의 튜올립 실험에서 ethephon처리시 화경장이 단축되었다는 보고와 일치하였으나 농도간에 따른 차이는 볼 수 없었다.



**Fig. 45. Effect of growth regulators on spike length of hydroponically grown *Dendranthema grandiflorum* ‘Shinma’ in secondary flowering culture.**



**Fig. 46. Occurrence of long flower neck as affected by high temperature and high light of *Dendranthema grandiflorum* ‘Shinma’ in hydroponic culture.**

국화 양액 재절화 재배 시 성장조절제 처리가 절화수량에 미치는 영향을 Table 35에 나타냈다. 결주율은 무처리에 비해 성장조절제 처리에서 다소 줄어드는 경향이었고 성장조절제 종류간에는 GA<sub>3</sub>보다 에테폰 처리에서 감소됨을 볼 수가 있었으며 특히 고농도보다는 저농도에서 결주 발생이 적었다. 고사율 또한 비슷한 경향으로 성장조절제 처리에서 낮게 나타났고 특히 에테폰 처리에서 감소되는 것을 볼 수가 있었다. 절화수량은 무처리에 비해 GA<sub>3</sub> 처리 시 106~143속, 에테폰 처리 시 145~162속의 증수 효과를 볼 수 있었으며 GA<sub>3</sub> 처리시에는 농도가 높아감에 따라 증가를, 에테폰 처리시에는 농도가 낮아짐에 따라 증가되는 결과를 얻을 수 있었다.

**Table 35. Effect of growth regulators on cut flowering yield of hydroponically grown *Dendranthema grandiflorum* 'Jeongun' in secondary flowering culture.**

Growth regulator (mg · L <sup>-1</sup> )	Non harvest <sup>z</sup> (%)	Mortality (%)	Harvest (%)	Cut flowering yield (Bundle <sup>y</sup> /10a)
Control	3.9	1.7	94.4	2,236
GA <sub>3</sub> 100	3.9	1.5	94.6	2,342
GA <sub>3</sub> 200	3.0	1.1	95.9	2,374
GA <sub>3</sub> 400	3.2	1.1	96.1	2,379
Ethephon 50	2.9	0.2	96.9	2,398
Ethephon 100	3.2	0.2	96.4	2,391
Ethephon 150	3.4	0.4	96.2	2,381

<sup>z</sup>Including plant death

<sup>y</sup>One bundle contains 20 clusters.

양액 재절화 재배시 성장조절제 처리가 생리장해 및 상품화율에 미치는 영향은 Table 36과 같다. 노심의 발생은 무처리에 비해 GA<sub>3</sub> 처리 시 발생량이 적었고 에테폰 처리시에는 높게 발생되었으며 농도가 높아감에 따라 발생량이 줄어드는 결과를 나타냈다. 위축은 노심과는 반대의 현상으로 무처리에서는 발생이 되지 않았던 반면, GA<sub>3</sub> 처리에서는 다소의 발생을 볼 수 있었으나 에테폰 처리에서는 발생이 되지 않았다. 로젯트의 경우에는 GA<sub>3</sub> 처리에서는 발생을 볼 수 없었으나 에테폰 처리시는 농도

가 높아짐에 따라 급증하는 것을 볼 수가 있어 식물생장조절 물질의 체내이동과 발현 기작은 식물이 처한 환경과 매우 밀접한 관련이 있다(Dio. 등. 1989; Richards. 1985) 고 한 바와 같이 로젯트 발생의 증가는 에테폰 처리 시 시설 내 고온 및 고광에 의해 식물체의 내적 변화에 기인 한 것으로 생각되었다.

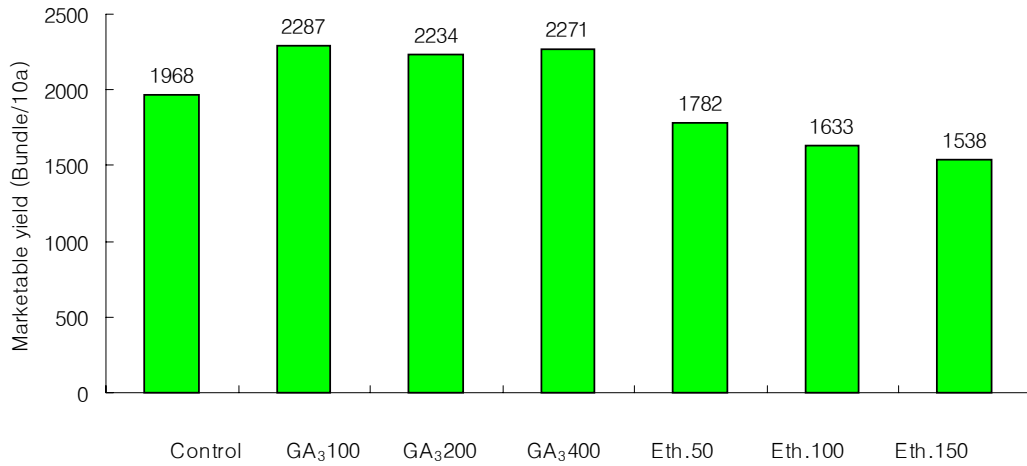
전체적으로 볼 때 무처리에 비해 GA<sub>3</sub>처리에서는 생리장해 발생량이 적었으나 농도에 따른 차이는 크게 없었으며 에테폰 처리시는 25.7~35.4%의 범위로 농도가 높아짐에 따라 12.5 ~ 22.2% 정도 높게 나타났으며 상품화율 또한 비슷한 경향으로 GA<sub>3</sub> 처리시에는 증가를, 에테폰 처리시에는 감소를 나타내어 하추국 양액 재절화 재배시 성장조절제 처리시에는 에테폰보다는 GA<sub>3</sub> 살포가 유리할 것으로 판단되었으며 에테폰 처리시에는 생리장해, 특히 로젯트의 발생 억제를 위한 대책이 강구되어야 할 것으로 생각되었다.

**Table 36. Occurrence of physiological disorder as affected by growth regulators in hydroponic culture of *Dendranthema grandiflorum* 'Shinma'.**

Growth regulator (mg · L <sup>-1</sup> )	Physiological disorder (%)				Marketability (%)
	Open center	Atrophy	Rosette	Total	
Control	7.9	0.0	5.3	13.2	86.8
GA <sub>3</sub> 100	2.3	0.0	0.0	2.3	97.7
GA <sub>3</sub> 200	4.9	1.0	0.0	5.9	94.1
GA <sub>3</sub> 400	3.0	1.5	0.0	4.5	95.5
Eth. 50	17.0	0.0	8.7	25.7	74.3
Eth. 100	12.0	0.0	19.7	31.7	68.3
Eth. 150	4.5	0.0	30.9	35.4	64.6

양액 재절화 재배 시 성장조절제 처리가 상품수량에 미치는 영향을 보면 무처리에 비해 GA<sub>3</sub> 처리시 266~319속의 증가를 볼 수 있었으며 농도간에는 GA<sub>3</sub>100mg · L<sup>-1</sup>에서 다소 많은 수량을 얻을 수 있었다. 에테폰 처리시에는 무처리보다 상품수량 생산이 저조하여 186~430속의 감소를 볼 수 있었으며 에테폰의 농도가 높아짐에 따라 감

소의 현상은 더욱 심하였다(Fig. 47). 이러한 현상은 1차 수확 때와는 달리 에테폰 처리 시 고온 및 고광 등 시설내의 재배환경이 작물의 생육에 부의 영향을 미쳐 상품수량이 급감한 것으로 판단되었으며 고광 및 고온기의 에테폰 처리 시 생리장해 발생, 특히 로젯트 발생 온도의 구멍이 시급한 것으로 생각되었다.



**Fig. 47. Effect of growth regulators on marketability yield of hydroponically grown *Dendranthema grandiflorum* 'Jeongun' in secondary flowering culture.**

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 국화 무병묘의 대량생산을 위한 생물반응기 시스템의 확립

품질이 일정한 기내묘를 대량생산하기 위해 배양기간을 단축시키고 생산비를 절감할 수 있는 생물반응기 배양 시스템을 확립하고자 본 연구를 수행하였다. 이를 위해 우선, 미세 환경조절이 가능한 소형 생물반응기를 제작하여 액체배양과 고체배양시 국화의 생장을 비교하여 액체배양이 고체배양에 비해 2배에 가까운 shoot 증식의 효과가 있음을 증명하였다. 이 후, 광도, 광질, 배양온도, 공기 주입량 등의 물리적 환경에 대한 실험과 배지 내  $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$  비율, 배양 중의 새로운 배지공급, 배지 내 sucrose의 유무 등의 화학적 환경에 대한 실험 등 다양한 배양환경 조건 및 배양 시스템 별 식물체의 생장 및 증식정도를 비교하여 생물반응기를 이용한 국화 shoot의 배양조건을 최적화 하였다. 이를 토대로 생물반응기의 형태, 배양 방식, 배양 밀도 등 국화 shoot 증식에 관여하는 주요 배양 환경의 최적조건을 확립하였다.

지금까지 생물반응기 배양은 주로 세포 증식이나 뿌리 등의 기관배양에 한정적으로 사용되어져 온 것이 사실이다. 또한 이에 적용되는 생물반응기의 용적도 소규모로 운영되어져 왔기 때문에 생물반응기의 scale up과 함께 이에 수반되는 환경조건에 대한 연구가 절실하였다. 이러한 점들을 감안할 때, 본 연구의 결과는 단지 국화묘의 대량생산에 뿐 아니라 국화 이외의 다양한 원예작물의 기내 증식에 적용하여 증식에 걸리는 기간을 단축하고 노동력을 절감하면서 일시에 다량의 식물체를 증식시킬 수 있는 새로운 배양 시스템의 기초를 마련했다고 할 수 있다. 즉, single shoot 또는 multiple shoot의 기내 증식을 통해 묘 생산을 하는 감자, 고구마, 거베라, 칼라, 팔레놉시스, 사과, 포도 등의 조직배양에 다양하게 적용시킬 수 있을 것으로 기대된다.

특히, 원예작물 생산에 있어 가장 중요한 위치를 차지하는 우량묘(transplant)의 안정적인 공급을 위해서는 생산비의 절감이 절실하다. 현재의 조직배양 시스템으로는 묘의 대량생산에 소요되는 생산단가가 너무 높기 때문에 조직배양묘를 이용하여 기외에서 삽수를 채취하는 방식을 취하고 있다. 그러나 지속적인 기외 삽수의 채취는 묘의 소질을 저하시키고 필요로 하는 시기에 원하는 만큼의 묘를 생산할 수 없다는 단점이 있다. 이 때문에 네델란드를 비롯한 국외의 여러 연구소에서는 생산비를 절감하면서 안정적인 묘의 생산을 위해 많은 연구를 하고 있다. 이 점에 있어 생물반응기를

이용한 원예작물의 대량생산은 많은 관심을 끌고 있는 분야이다. 이미 2000년 일본에서 개최된 'Transplant production in the 21st century' 심포지움, 핀란드에서 개최된 'Application of plant biotechnology in tissue culture' 심포지움, 2002년 노르웨이에서 개최된 'Liquid culture system for large scale plant tissue culture' 심포지움 등에서 본 연구 결과를 발표하였으며 많은 연구자들과 특히 묘 생산관련 전문회사 등에 자료를 제공한 바 있다. 따라서 본 연구 결과는 향후 원예작물 묘의 대량생산 시스템의 확립에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 기대된다.

## 2. 고품질의 국화 transplant 생산

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

이러한 문제점을 해결하기 위해 묘 생산에 양액재배 시스템을 적용하여 배양 방법, 광도(PPF), CO<sub>2</sub> 등 지상부 환경과 배양액의 pH, EC 등의 지하부 환경 실험을 통해 microponic system을 확립하였다. 그 결과, 삽수의 생존률은 삽수 부위에 관계없이 100%이었고 묘 성장에 걸리는 기간을 크게 단축하였으며 묘 소질이 균일한 transplant를 일시에 대량 생산할 수 있었다. 이 방법의 가장 큰 장점은 기존의 방법에 비해 지하부의 적정 환경조절이 용이하기 때문에 고품질의 국화묘를 단기간에 대량생산할 수 있다는 것이다. 이렇게 생산된 국화 transplant를 기존의 삽수를 이용하여 생산된 묘와 함께 양액재배에 이용하여 절화 품질을 비교하였는데 초장, 경경, 꽃의 크기 등에서 기존의 묘에 비해 같거나 비교적 높은 품질을 나타내었다. 이로써 생물반응기와 microponic system을 통해 생산된 묘를 기존의 생산 방법과 동일하게 실제 재배에 적용할 수 있음을 알 수 있었다.

Microponic system의 적용으로 기존의 기내 생산묘를 순화, 성장시키는데 드는 시간과 노동력을 1/2로 감소시키면서도 고품질의 원예작물 transplant를 대량 생산할 수 있게 되었다고 생각한다. 특히, 사과와 같이 발근, 순화가 어려운 목본 식물의 기외 순화 및 생장에 본 시스템을 적용하여 90% 이상의 순화율과 건전한 사과 대목(Emna 품종)을 대량생산할 수 있었고 이 같은 결과를 포도에도 적용하였다. 또한 microponic system을 이용한 새로운 transplant 생산에 관해 이미 노르웨이에서 열린 'Liquid culture system for large scale plant tissue culture' 심포지움에서 발표하였다. 현재, 본 연구소에 세워진 (주) CBN Biotech에서 생물반응기와 microponic system을 이용하여 사과, 거베라를 기내에서 대량 증식한 다음, 균일한 소질의 transplant를 거베라의 경우에는 20만주, 사과의 경우는 5만주를 종묘 업자와 농가에 각각 공급하였고 현재는 팔레놀시스와 관엽식물의 생산에 적용하고 있다.

다음은 지금까지의 국화 생물반응기 실험과 관련한 연구결과를 국내외 학술지 및 심포지움에서 발표한 내용이다:

#### 국외 전문학술지

1. Paek, K.Y., **E.J. Hahn**, and S.H. Son. 2001. Application of bioreactors large-scale micropropagation systems of plants. In *Vitro Cell Dev. Biol.* 37: 149-157.
2. **Hahn, E.J.** and K.Y. Paek. 2002. Multiplication of chrysanthemum shoots in bioreactors as affected by culture method and inoculation density of single node stems. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* In press.
3. **Hahn, E.J.**, J.W. Heo, K.Y. Paek. 2002. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of *Chrysanthemum* plantlets. *J. Hort. Biotech.* Submitted.

#### International symposium proceedings

1. **Hahn, E.J.**, S.J. Kim, K.Y. Paek, and Y.B. Lee. 2000. Growth and acclimatization of chrysanthemum plantlets using bioreactors and hydroponic culture techniques. p. 274-278. In: C. Kubota and C. Chun



(ed.). Transplant production in the 21st century. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London.

2. Paek, K.Y., **E.J. Hahn**, J.W. Heo, and S.H. Son. 2000. Micropropagation of ornamental plants using bioreactor system. p. 252-257. In: C. Kubota and C. Chun (ed.). Transplant production in the 21st century. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London.

#### 국제학술회의

1. **Hahn, E.J.**, S.J. Kim and K.Y. Paek. 2002. Application of Bioreactor Culture for Large Scale Production of Chrysanthemum Transplants. p. 127. 26th ISHS Conference. 11-17 Aug. Toronto, Canada.
2. **Hahn, E.J.** and K.Y. Paek. 2002. Plantlet Growth and CO<sub>2</sub> concentration in the Culture Vessel as Affected by Medium Supply in Bioreactor Culture of Chrysanthemum. P. 25. The 1st Intl. Sym. Liquid Systems for in vitro Mass propagation of plants. 29 May- 2 June. Ås, Norway.
3. Paek, K.Y and **E.J Hahn**. 2002. Application of Bioreactor System for Scale up Production of Horticultural and Medicinal Plants. P. 20-21. The 1st Intl. Sym. Liquid Systems for in vitro Mass propagation of plants. 29 May- 2 June. Ås, Norway.

#### 국내 학술회의

1. 김선자, **한은주**, 백기엽. 2000 추계원예학회. 생물반응기를 이용한 국화 무병묘의 대량생산. P. 664. 원예과학기술지.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

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

국화 생물반응기 배양의 결과는 국화와 같이 shoot 증식을 통해 묘 생산을 하는 카네이션, 포도, 감자, 고구마 및 관엽식물 등의 증식에 바로 적용할 수 있다. 이미 본 연구소에서는 감자의 shoot 증식에 생물반응기를 적용, 20 liter 생물반응기에서 5000 주 이상의 삽수를 얻는데 성공하였다. 생물반응기 배양환경의 적정 조건이 국화의 경우와 유사하여 국화에서 확립된 배양 시스템이 실제적으로 적용된 예이다. 이렇게 되면 기존의 기외 삽수 방법이나 microtuber에 의한 씨감자 생산 방식에 비해 시간과 노동력이 크게 절감되어 일시에 씨감자 생산을 위한 우량묘의 대량 공급이 가능할 수 있을 것으로 기대되고 있다. 본 연구의 결과는 single shoot 증식 뿐 아니라 multiple shoot로 증식을 시키는 거베라, 칼라, 사과 등 화훼, 과수류의 묘 생산에도 성공적으로 적용할 수 있다고 생각된다. 생물반응기 내에 net를 걸고 배지 공급 시간과 양을 적절하게 조절한다면 각각의 shoot가 균일하게 성장되어 최종적으로 같은 소질의 묘를 생산할 수 있을 것이다.

팔레놉시스 영양계 번식의 경우, protocorm 유도 후 protocorm의 증식, adventitious shoot의 유도, adventitious shoot로부터의 식물체까지의 유도과정 등 번식이 가장 까다로운 화훼류 중의 하나다. 특히 고체배양에 의한 protocorm의 증식에는 많은 시간이 걸리고 이후 adventitious shoot를 유도하기가 어려울 뿐 아니라 증식과정 중에 페놀화합물 등의 유출로 증식효율이 낮다는 문제점을 가지고 있다. 생물반응기 배양은 이같은 문제점을 해결할 수 있는 훌륭한 대안이 될 수 있다. 액체배지를 이용하고 국화 배양에서 적용하였던 raft 배양방식을 도입하여 배지를 ebb & flow 방식(temporary immersion)으로 공급한다면, protocorm의 증식에 걸리던 시간을 크게 단축할 수 있을 것으로 생각한다. 그 뿐만 아니라 생물반응기를 이용하는 경우, 배양 단계마다 배지가 달라지기 때문에 배양용기를 바꾸어 계대배양을 해야하는 번거로움을 없앨 수 있다. 즉, 생물반응기에서 protocorm을 증식한 후 기존의 배지를

adventitious shoot를 유도하기 위한 배지로 교체하게 된다면 시간과 노동력을 크게 줄이면서 오염의 위험성도 훨씬 적어져 효율적인 증식 시스템을 확보할 수 있을 것이다. 이에 따라 본 연구소에서는 국화 실험의 결과를 토대로 우선 생물반응기를 이용한 팔레놉시스의 protocorm 증식에 관한 기초 실험을 진행하고 있다. 현재 배지 공급 방식에 대해 실험을 진행 중이고 이후 air volumn, 광도, 온도 등에 대해 연구를 계속할 계획을 가지고 있다. 현재 벨기에, 네델란드 등에서 다양한 종류의 팔레놉시스 adventitious shoot의 공급을 요청하고 있어 생물반응기를 이용한 팔레놉시스 유묘의 대량생산 시스템이 확립된다면 묘의 해외수출이 본격화 될 것으로 기대되고 있다.

본 과제에서 얻은 연구 결과를 토대로 앞으로는 shoot의 성장과 관련한 생물반응기 배양조건의 확립 뿐 아니라 somatic embryo의 유도과 증식, 지하부(adventitious root, tuber 등)의 성장 등과 관련한 배양 시스템의 확립으로 뿌리나 배 등의 증식이 요구되는 다양한 약용식물의 급속 증식이 가능하게 되어 유용물질의 대량생산에도 적용할 계획이다.

한편, 생물반응기에서 삽수나 식물체가 일시에 대량생산된다 하더라도 기외에서 순화 및 생장이 원활하지 못하게 되면 고품질의 transplant 생산은 어렵게 된다. 본 연구에서 도입한 microponic system(micropropagation+hydroponics)은 기존의 기내 배양묘 순화 방법에 비해 식물체 생존율이 100%에 가깝고 순화기간과 일정 규격의 묘 생산까지의 성장기간을 크게 단축시킬 수 있다는 장점이 있다. 이에 따라 팔레놉시스, 사과 등과 같이 순화율이 극히 낮고 발근과 순화에 소요되는 시간이 길며 과정이 까다로운 작물을 대상으로 microponic system을 적용할 필요가 있다. 즉, 각 작물에 따라 배양액의 조성 및 배양액 공급시간과 양을 달리하고 지상부 환경의 조절로 순화율을 높일 수 있다면, 기외 이식 후의 묘 손실률을 크게 낮추고 성장을 촉진하여 묘 생산효율을 크게 높일 수 있을 것으로 기대된다. 현재 무병묘 생산에서 발근 및 순화가 가장 문제시되고 있는 사과 기내 배양묘의 발근과 순화에 본 시스템을 적용할 계획에 있다.

식물조직배양의 산업화를 위해서는 공장양식의 자동화, 단순화, 슬림화로의 시스템 변화가 반드시 필요하며 이에 따른 인건비의 감소가 필수적이다. 이러한 점에서 본 과제는 기존의 조직배양 시스템을 scale-up시킨 생물반응기라는 대형 배양용기의 적용과 지상부, 지하부 환경의 최적화를 통한 공장시스템의 새로운 배양방식을 확립하였다고 생각한다. 앞으로는 대량 배양에 필요한 배지의 공급과 회수, 자동조절방안에 대해서도 연구를 진행할 계획이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술 정보

### 1. 기내배양환경의 특성 및 조절

기내 식물체의 성장 및 광합성에 영향을 미치는 중요한 지상부 환경요인으로 광, CO<sub>2</sub> 농도, 온도, 상대습도 및 산소 등을 들 수 있으며 지하부 환경요인인 배양배지로서는 당 농도, 이온성분 농도 및 삼투포텐셜과 pH 등이 중요한 요인으로 작용한다 (Nguyen 등, 1998). 기내 미세 환경조절은 식물 성장과 발달을 촉진시키며 식물체의 형태적, 생리학적 변이 발생률을 낮추고 보다 빠른 증식률과 순화 단계에서 식물 성장을 돕는다. Cournac 등(1992)은 광도(photosynthetic photon flux: PPF)가 식물체 특히, 신초 성장 시의 광합성에 미치는 중요한 요인중의 하나라고 하였으며 감자의 광 독립영양배양 시 CO<sub>2</sub>가 시비되는 조건에서의 높은 PPF는 식물체의 성장 및 광합성 능력을 촉진시킨다고 하였다. Kozai 등(1997)은 온도가 감자의 줄기와 초장에 미치는 영향에 대하여 연구하였으며, 온도 조절은 식물체의 초장을 결정하는 중요한 요인이며 미세 번식의 중요한 기술이라고 하였다.

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

에틸렌 발생과 연관되어 투명화묘를 발생시킨다고 보고하였다.

이와 같이 일반적인 조직배양은 낮은 CO<sub>2</sub> 농도, 낮은 광합성 유효 광양자속 (photosynthetic photon flux, PPF), 높은 상대습도, 배지 내의 높은 당함량, 낮은 공기의 유동 등에 의하여 식물체가 정상적인 광합성률을 유지하기 어려운 환경조건이기 때문에 기외순화율이 낮다(Riek, 1995; Murali와 Duncan, 1995; Van Huylenbroeck 등, 2000). 이러한 불리한 환경 조건에서 성장한 조직배양 식물체의 잎은 많은 경우 잎의 두께가 얇고, 엽록소 a/b의 비율이 낮으며 유리 단백질 함량이 낮은 음지성 식물의 잎이 가지고 있는 특징을 나타내는데, 이는 배양기간 동안 낮은 광도 때문인 것으로 생각된다(Chaves, 1994; Riek, 1995). 음지에서 성장한 잎은 일반적으로 호흡률과 광보상점이 양지에서 성장한 잎보다 낮기 때문에 낮은 광도에서도 독립영양적인 성장을 유지한다. 따라서 갑작스러운 높은 광을 조사하면 이들 음지에서 성장한 잎은 광스트레스 때문에 광억제작용(photoinhibition)을 받는다(Van Huylenbroeck, 1994; Van Huylenbroeck 등, 2000). 또한 명기 동안 식물체의 광합성에 의한 배양병 내 CO<sub>2</sub> 농도 감소나 낮은 PPF와 환기 불량으로 인해 광독립영양 배양에 의해 생산된 식물체에 비해 성장률이 낮으며 투명화 현상이 다발하는 것으로 알려져 있다(Kozai 등, 1990b; Kozai와 Sekimoto, 1988; Shim 등, 2001a). 일반적으로 환기가 불량한 광혼합영양 배양 조건 하에서 자란 식물체는 잎의 표피 왁스층이 감소하거나, 기공의 형태와 개폐 기능이 불량하다(Blanke와 Belcher, 1989; Donnelly 등, 1987; Han 등, 1992; Shim 등, 2001b; Short 등, 1987). 그러나 Kozai (1997) 등은 배지에 탄소원을 첨가하지 않는 광독립영양 배양 방법에 의해 기내 식물체를 생산할 경우, 배지에 당을 첨가하는 광혼합영양 배양에 비해 기내 식물체의 성장 및 광합성이 촉진되며 기내 식물체의 생리적, 형태적 이상과 투명화현상이 감소되고 상대적으로 생장이 균일한 건전묘를 생산할 수 있다고 보고하였다. 이러한 광독립영양 배양 방법으로 기내 식물체의 성장을 촉진하고 순화율을 높이며 생산단가를 낮출 수 있다는 연구결과가 많이 보고되고 있는데, 심비디움(Kozai 등, 1987), 카네이션(Kozai와 Iwanami, 1988), 감자(Kozai 등, 1988) 등을 이용하여 높은 PPF 하에서 CO<sub>2</sub>를 시용하고 배지 내에 당을 첨가하지 않고 배양하였을 때 당을 첨가해준 혼합영양과 같은 성장 결과를 얻어 독립영양 배양의 가능성을 보고하였고, 환기 횟수를 높여주었을 때 환기횟수가 낮은 경우보다 광독립영양배양 및 광혼합영양배양이 좋은 성장을 보여주었으며, 당을 첨가하지 않은 독립영양배양은 당이 첨가된 혼합영양과 비교하였을 때 성장에 큰 차이를 나타내지 않았다고 하였다(Kozai 등, 1990a). Laforge 등(1991)은 딸기와 아스파라거스를 대상으로 기내 및 기외 순화시 성장에 미

치는 영향에 대한 실험에서 높은 PPF와 고농도의 CO<sub>2</sub>에서 좋은 생장을 보였으며, 건전한 기공이 관찰되었고 외피의 구조나 epicuticular wax의 함량을 증가시킬 수 있었는데, 이러한 결과로 기외 순화시 생존율이 증가하였고, 순화 기간을 약 2주 단축할 수 있다고 하였다. Jeong 등(1995)은 배양실 내 CO<sub>2</sub> 시용, 배지 내 당의 제거 및 PPF를 높이거나 배양병의 환기횟수를 증가시키는 등의 광독립영양 배양 방법에 의해 기내 배양 식물체의 생장 및 광합성 속도를 증가시키는 동시에, 배양 식물체 생산에 필요한 생산비를 절감할 수 있다고 시사하였다.

200년 2월 28일부터 일본 지바대에서 열린 'Transplant production in the 21st century' 심포지움에서는 많은 연구자들이 배양용기의 대형화와 기내배양의 환경을 개선함으로써 기내 식물체의 생장을 기외 식물과 유사한 방향으로 유도하는 것이 최종적으로 기외 생산효율을 증가시킨다는 결과를 보고하였다. 또한, 광도, 광원, 공기의 유동에 따른 습도, 온도의 변화 등에 따른 환경제어를 통해 대규모의 transplant production system 확립으로 고품질의 묘를 대량 생산하는 식물공장을 소개하기도 하였다.

## 2. 생물반응기 배양

식물을 산업적으로 대량생산하기 위하여 최근 생물반응기를 이용한 배양방법이 주목받고 있다. 생물반응기는 미생물을 이용한 발효분야에 주로 이용되어 왔으며, 식물의 세포나 조직을 대량으로 배양할 수 있는 생물반응기의 개발이 요구되었다. 생물반응기는 재래적 조직배양에 비해 대규모화할 수 있고, 배양체의 연중생산이 가능하며, 자동화가 가능하여 생산비를 최소화할 수 있다. 또한 최적조건의 구명으로 배양 식물체 및 그 밖의 배양체 등을 대량생산할 수 있어 향후 지속적인 연구가 이루어질 경우 이차 대사산물의 대량생산이나 식물의 기내생산에 많이 이용될 것으로 전망된다(Paek 등, 2001). 하지만 아직까지 전 세계적으로 식물배양용 생물반응기에 대한 연구가 초기단계에 있기 때문에 문제점 해결을 위한 연구가 필요하고 특히 개발될 경우 부가가치가 높으나 연구개발비와 초기 투자비가 많다는 점을 감안하여야 한다(Paek 등, 2001).

식물생산에 생물반응기를 적용한 예는 1981년 베고니아의 대량 증식에서 처음으로 보고되었으며(Takayama 등, 1981) 이 기술은 신초, 인경, 소피경, 구경 등을 포함한 많은 식물에 적용되어 왔다(Preil 등, 1991; Akita 등, 1994). 생물반응기를 이용하여

식물세포(Aitken-Christie 등 1995), 체세포배(Gupta 등, 1993; Preil와 Beck, 1991; Stuart 등, 1987) 및 신초(Akita와 Ohta, 1998), 괴경(Akita와 Takayama, 1988), 자구(Takahashi 등, 1992) 등 식물조직을 배양한 연구 사례가 있고, 대규모화하여 생산비용을 절감하려는 시도가 보고된 바 있다(Son 등, 1999; Leather 등, 1995; Vasil, 1994; Preil, 1991). 그밖의 생물반응기를 이용한 연구의 예를 보면, 알팔파, 자작나무, 당근, 커피, 가문비나무, 고구마 등에서 체세포 배양이 시도되었고(Leather 등, 1995) 기관배양은 감자(Akita와 Takayama, 1993), *Stevia rebaudiana*(Akita 등, 1994) 및 난(Park 등 2000) 등을 대상으로 하였다.

식물의 세포, 조직 및 기관배양에 있어서 생물반응기를 이용한 배양법은 액체배양 배지를 사용한다는 점에서 기존의 조직배양법과 차이를 보이며 플라스크 수준의 현탁 배양과 다른점은 기내 환경을 다양하게 변화시킬 수 있다는 것과 산업화 수준의 대규모 배양이 가능하다는 점이다. 생물반응기는 초기에는 설비가 많이 들지만 장기적으로는 각 식물에 따른 기내 환경의 최적화로 생산 효율성의 증가, 고품질 생산 및 생산비 절감 등의 효과를 얻을 수 있다. 생물반응기는 미생물을 통한 발효분야에 주로 이용되어 왔으나 최근 들어 인삼의 세균 배양, 백합의 무병종구 생산, 감자 경정배양 등의 식물분야에서 이차 대사산물이나 무병종묘를 대량생산할 목적으로 응용되고 있다(Son 등, 1999). 또한, 배양기간을 단축시키고 증식효율을 높이기 위해 아스파라거스, 거베라, 알로에 등의 작물의 기내 증식에 적용되고 있으나 아직은 한정적인 실험 결과 만이 보고되고 있다(Liang 등, 1997).

2002년 노르웨이에서 '기내 식물의 대량생산을 위한 액체배양 시스템'에 관해 개최된 제 1회 국제 심포지움을 계기로 소규모의 생물반응기를 원예작물의 기내생산에 적용하는 시도가 활발해졌다. 이 심포지움에서는 Dr. Ziv(이스라엘), 백기엽 교수(한국), Dr. Sorvari(핀란드), Dr. Arnold(스웨덴) 등이 액체배지에서 shoot 증식 체계와 embryo 유도 및 발달에 관여하는 배양 환경에 대해 주제를 발표하였고 현재 생물반응기 시스템에서 가장 많이 적용되고 있는 temporary immersion system (Ebb & Flow)의 특징과 장점에 관해 토의하였다. 또한 생물반응기 배양 시스템의 자동화에 대한 논의도 있었다. 이들은 모두 현재의 식물 조직배양에 의한 생산체계는 궁극적으로 액체배지를 이용하는 생물반응기 시스템으로 전환되어야 하고 또한 대량생산(Mass propagation)을 위한 생물반응기의 scale up과 자동화도 필요한 연구분야로 지목하였다.

## 제 7장 참고문헌

Aitken-Christie, J., T. Kozai, and S. Takayama. 1995. Automation in plant tissue culture. General introduction and overview. pp 1-18. In: Aitken-Christie J., T. Kozai, and M.A.L. Smith (eds.). Automation and environmental control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Akita, M. and S. Takayama. 1988. Mass propagation of potato tubers using jar fermentor techniques. Acta Hort. 230:55-61.

Akita, M. and S. Takayama. 1993. Induction and development of potato tubers in a jar fermentor. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 36:177-182.

Akita, M. and S. Takayama. 1994. Effects of medium surface level control on the mass propagation of potato tubers using a jar fermentor culture technique. Plant Cell. Rep. 10:242-248.

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 Rep. 18:284-287.

Akita, M., T. Shigeoka, Y. Koizumi, and M. Kawamura. 1994. Mass propagation of shoots of *Stevia rebaudiana* using a large scale bioreactor. Plant Cell Rep. 13:180-183.

Amancio, S., J.P. Rebordao, and M. Chaves. 1999. Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: Photosynthetic competence and carbon allocation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 58:31-37.

Avila, A., S.M. Pereyra, and J.A. Arguello. 1998. Nitrogen concentration and proportion of  $\text{NH}_4^+$ -N affect potato cultivar response in solid and liquid media. HortScience 33:336-338.

Barlass, M. and K.G.M. Skene. 1978. In vitro propagation of grape (*Vitis vinifera*) from fragmented shoot apices. Vitis 117:335-340.

Bi, J., F. Ou, Y. Wang, Z. Hao, and C. Liu. 1997. Bioreactors for plant



- micropropagation. 4th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference. 2:687-690.
- Blanke, M.M. and A.R. Belcher. 1989. Stomata of apple leaves cultured in vitro. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 19:85-89.
- Bugbee, B. 1995. Nutrient management in recirculating hydroponic culture. p. 15-30. In: *Proceedings of the 16th Annual Conference on Hydroponics.* Hydroponic Soc. Am., San Ramon, CA.
- Capellades, M., R. Fontarnau, C. Carulla, and P. Debergh. 1990. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115:141-145.
- Chaves, M.M. 1994. Environmental constraints to photosynthesis in ex vitro plants p. 1-18. In: P.J. Lumsden, J.R. Nicholas, and W.J. Davies (eds.). *Physiology, growth and development of plants in culture.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Chee, R. and R.M. Pool. 1983. In vitro propagation of *Vitis*: Application of previously defined culture condition to a selection of genotypes. *Vitis* 22:363-374.
- Chee, R. and R.M. Pool. 1987. Improved inorganic media constituents for in vitro shoot multiplication of *Vitis*. *Sci. Horti.* 32:85-95.
- Correia, M.J., M.M.C. Chaves, and J.S. Pereira. 1990. Afternoon depression in photosynthesis in grapevine leaves—evidence for a high light stress effect. *J. Exp. Bot.* 41:417-426.
- Cournac, L., I. Cirier, and P. Chagvardieff. 1992. Improvement of photoautotrophic *Solanum tuberosum* plantlet culture by light and CO<sub>2</sub>: Differential development of photosynthetic characteristics and varietal constraints. *Acta Hort.* 319:53-58.
- Cristea, V., F. Dalla Vecchia, and N. La Rocca. 1999. Developmental and photosynthetic characteristics of a photoautotrophic *Chrysanthemum* culture. *Photosynthetica* 37:53-59.
- Cui, Y.Y., E.J. Hahn, T. Kozai, and K.Y. Paek. 2000. Number of air exchanges, sucrose concentration, photosynthetic photon flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets in

- vitro. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 62:219-226.
- Decoteau, D.R., M.J. Kasperbauer, and P.G. Hunt. 1990. Bell pepper plant development over mulches of diverse colors. *HortScience* 25:460-462.
- Dencso, I. 1987. Factors influencing vitrification of carnation and conifers. *Acta Hort.* 212:167-176.
- De Proft, M.P., L.J. Maene, and P.C. Debergh. 1985. Carbon dioxide and ethylene evolution in the culture atmosphere of *Magnolia* cultured in vitro. *Physiol. Plant.* 65:375-379.
- Desjardins, Y., A. Gosselin, and S. Yelle. 1987. Acclimatization of in vitro strawberry plantlets under CO<sub>2</sub> enriched environment and supplemental lighting. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112:846-851.
- Donnelly, D.J., F.E. Skelton, and J.E. Nelles. 1987. Hydathode anatomy and adaxial water loss in micropropagated 'Silvan' blackberry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112:566-569.
- Elsner, E.A. and G.L. Jubb, Jr. 1988. Leaf area estimation of Concord grape leaves from simple linear measurements. *Am. J. Enol. Vitic.* 39:95-97.
- Eun, J.S. 1998. Acclimatization of in vitro plantlets of *Wasabia japonica*(Miq.) Matsum. derived from the apical meristem culture. *Korean J. Plant Tissue Culture.* 25:257-261.
- Eymar, E., J. Alegre, M. Toribio, and D. Lopez-Vela. 2000. Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine on *in vitro* nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 63:57-65.
- Fonteno, W.C. 1996. Growing media: Types and physical/chemical properties. p. 93-122. In David Wm. Reed (ed.). *Water, media and nutrition for greenhouse crops*. Ball Publishing. Batavia, Illinois, USA.
- Fonseka, H.D., K.I. Asanuma, and M. Ichii. 1997. Changes in nitrate reductase activity of leaf and nitrogen distribution with growth in potato plants. *Jpn. J. Crop Sci.* 66:669-674.

Fujiwara, K., T. Kozai, and I. Watanabe. 1987. Fundamental studies on environments in plant tissue culture vessels. (3) Measurements of carbon dioxide gas concentration in closed vessels containing tissue cultured plantlets and estimates of net photosynthetic rates of the plantlets. *J. Agr. Meteorol.* 43:21-30.

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

Gaspar, T., Kevers, C., Debergh, P., Maene, L., Paques, M. and Boxus, P. 1987. Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. In: Bonga, J.M., Durzan, D.J.(eds) *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Vol I.(pp. 152-166) Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht, The Netherlands.

Gifford, R.M., H. Lambers, and J.I.L. Morison. 1985. Respiration of crop species under CO<sub>2</sub> enrichment. *Physiol. Plant.* 63:351-356.

Goins, G.D., N.C. Yorio, M.M. Sanwo, and C.S. Brown. 1997. Photomorphogenesis, photosynthesis, and seed yield of wheat plants grown under red light-emitting diodes (LEDs) with and without supplemental blue lighting. *J. Expt. Bot.* 48:1407-1413.

Grout, B.W.W. and S. Millam. 1985. Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. *Annu. Bot.* 55:129-131.

Hahn, E.J. 1998. The establishment of the microponic system in a plant factory by controlling optimum environment and acclimatization method for the mass-production of in vitro-produced chrysanthemum plantlets. Ph.D. Diss., The Univ. of Seoul, Seoul.

Hahn, E.J., S.J. Kim, K.Y. Paek, and Y.B. Lee. 2000. Growth and acclimatization of chrysanthemum plantlets using bioreactor and hydroponic culture techniques. *Transplant production in the 21st Century.* 274-278.

Hahn, E.J., T. Kozai, and K.Y. Paek. 2000. Blue and red light-emitting diodes with or without sucrose and ventilation affect in vitro growth of *Rehmania glutinosa* plantlets. *J. Plant Biol.* 43:247-250.

- Hahn, E.J., Y.R. Cho, and Y.B. Lee. 1998. Air temperature and relative humidity affect the growth of chrysanthemum plantlets in the microponic system. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 39:625-628.
- Hartmann, H.T., D.E. Kester, F.T. Davies, Jr., and R.L. Geneve. 1997. *plant propagation: Principles and practice*. 6th Ed. Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ.
- Hartmann, H.T., D.E. Kester, F.T. Davies, Jr., and R.L. Geneve. 1997. *Plant propagation: Principles and practices*. 6th Ed. p. 657-659. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Hayashi M., H.C. Lee, and T. Kozai. 1993. Photoautotrophic micropropagation of rose plantlets under CO<sub>2</sub> enriched conditions. *Shita J.* 4:107-110.
- Hdider, C.H., L.P. Vezina, and C.H. Ahn. 1994. Short-term studies of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake by micropropagated strawberry shoots cultured with or without CO<sub>2</sub> enrichment. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 37:185-191.
- Hoenecke, M.E., R.J. Bula, and T.W. Tibbitts. 1992. Importance of 'Blue' photon levels for lettuce seedlings grown under red-light-emitting diodes. *HortScience* 27:427-430.
- Holder, R. and M.H. Christensen. 1988. Effect of EC on the growth, yield and composition of cherry tomatoes grown in rockwool. p. 213-227. *ISOSC Proc. 7th Int. Congr. Soiless culture, Wageningen.*
- Jacobson, B.M. and D.H. Willits. 1998. Developing relationships between environmental variables and stem elongation in chrysanthemum. *Trans. ASAE.* 41:825-832.
- Jackson, M.B., A.J. Abbott, A.R. Belcher, K.C. Hall, R. Butler, and J. Cameron. 1991. Ventilation in plant tissue cultures and effects of poor aeration on ethylene and carbon dioxide accumulation, oxygen depletion and explant development. *Annu. Bot.* 67:229-237.
- Jeong, B.R., C.S. Yang, and E.J. Lee. 1996. Photoautotrophic growth of *Dianthus caryophyllus* in vitro as affected by photosynthetic photon flux and CO<sub>2</sub> concentration. *Acta Hort.* 440:611-615.

- Jeong, B.R., K. Fujiwara, and T. Kozai. 1995. Environmental control and photoautotrophic micropropagation. Hort. Rev. 17:123-170.
- John, J.L., W.H. Courtney, and D.R. Decoteau. 1993. Photocontrol of *Dioscorea alanta* plantlet growth. Scientia Hort. 54:255-265.
- Kang, J.G., J.K. Son, H.S. Park, and S.J. Chung. 1995. Effects of soil, aeroponic and nutrient film technique culture systems on plant growth and flowering of chrysanthemum. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 36(5):747-754.
- Kang, J.G., B.S. Seo, and S.J. Chung. 1995. Effect of nutrient concentration on growth and development of aeroponically grown chrysanthemum. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 36:83-89.
- Karlsen, P. 1997. Root temperature and stem elongation. Acta Hort. 435:33-45.
- Kasperbauer, M.J. and P.G. Hunt. 1992. Cotton seedling morphogenic responses to FR/R ratio reflected from different colored soils and soil covers. Amer. Soc. Photobiology 56:579-584.
- Kozai, T. and K. Sekimoto. 1988. Effect of the number of air exchanges per hour of the closed vessel and the photosynthetic photon flux on the carbon dioxide concentration inside the vessel and the growth of strawberry plantlets in vitro. Environ. Control Biol. 26:21-29.
- Kozai, T. and Y. Iwanami. 1988. Effects of CO<sub>2</sub> enrichment and sucrose concentration under high photon flux on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. J. Jap. Soc. Hort. Sci. 57:279-288.
- Kozai, T. C. Kubota, and B.R. Jeong. 1997. Environmental control for the large-scale production of plants through in vitro techniques. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 51:49-56.
- Kozai, T. C. Kubota, and I. Watanabe. 1990. The growth of carnation plantlets in vitro cultured photoautotrophically and photomixotrophically on different media. Environ. Control Biol. 28:21-27.

- Kozai, T. K. Iwabuchi, K. Watanabe, and I. Watanabe. 1991. Photoautotrophic and photomixotrophic growth of strawberry plantlets *in vitro* and changes in nutrient composition of the medium. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 25:107-115.
- Kozai, T. N. Nishiuchi, K. Fujiwara, and I. Watanabe. 1989. Effects of planting density in the vessel on the growth and net photosynthetic rates of potato plantlets in photoautotrophic micropropagation. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 58:244-245.
- Krause, G. H. 1988. Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms, *Physiol. Plant.* 74:566-574.
- Krause, G.H. and E. Weis. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:313-349.
- Lemaire, F. 1995. Physical, chemical and biological properties of growing medium. *Acta Hort.* 396:273-284.
- Leshem, B., D.P. Shalev, and S. Izhar. 1988. Cytokinin as an inducer of vitrification in melon. *Annu. Bot.* 61:255-260.
- Liang, S., Z. Wu, S. Chen, and K. Gao. 1997. Bioreactors for plant micropropagation. 4th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference. 2:716-719.
- Lichtenthaler, H.K. 1996. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J. Plant Physiol.* 148:4-14.
- Longstreth, D.J. and P.S. Nobel. 1980. Nutrient influences on leaf photosynthesis—Effects of nitrogen, phosphorus, and potassium for *Gossypium hirsutum* L. *Plant Physiol.* 65:541-543.
- Matysiak, B. and J. Nowak. 1996. The effects of growing media and CO<sub>2</sub> on acclimatization and growth of microcuttings of *Anthurium*, *Dieffenbachia*, *Homalomena* and *Spathiphyllum*. *Acta Hort.* 440:628-632.
- McMahon, M.J. and J.W. Kelly. 1999. CuSO<sub>4</sub> filters influence flowering of *Chrysanthemum* cv. Spears. *Scientia Hort.* 79:207-215.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

- Navarro, C., C. Teisson, F. Cote, and J. Ganry. 1994. Effects of light intensity and CO<sub>2</sub> concentration on growth of banana plants (*Musa* AAA, cultivar 'Petite Naine') *in vitro* and subsequent growth following acclimatization. *Scientia Hort.* 60:41-54.
- Nguyen, Q.T. and T. Kozai. 1998. Environmental effects on the growth of plantlets in micropropagation. *Environ. Control in Biol.* 36:59-75.
- Nguyen, Q.T., T. Kozai, G. Niu, and U.V. Nguyen. 1999. Photosynthetic characteristics of coffee (*Coffea arabusta*) plantlets *in vitro* in response to different CO<sub>2</sub> concentrations and light intensities. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 55:133-139.
- Niu, G. and T. Kozai. 1997. Simulation of the growth of potato plantlets cultured photoautotrophically *in vitro*. *Trans. ASAE.* 40:255-260.
- Oh, W., K.S. Kim, and Y.K. Yoo. 1998. Effects of air porosity of rooting media on rooting and growth of chrysanthemum cuttings. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 39:92-97.
- Omer, A.D., J. Granett, J.A. De Benedictis, and M.A. Walker. 1995. Effects of fungal root infections on the vigor of grapevines infested by root-feeding grape phylloxera. *Vitis* 34:165-170.
- Oyaert, E., E. Volckaert, and P.C. Debergh. 1999. Growth of chrysanthemum under coloured plastic films with different light qualities and quantities. *Scientia Hort.* 79:195-205.
- Paek, K.Y. and B.H. Han. 1989. Physiological, biochemical and morphological characteristics of vitrified shoot regenerated *in vitro*. *Kor. Soc. Plant Tissue Culture* 18:151-162.
- Paek, K.Y., E.J. Hahn, and S.H. Son. 2001. Application of bioreactor culture for the large scale micropropagation of plants. *In Vitro Cell Dev. Plant* 37:149-157.
- Park, H.S., J.H. Sul, and M.H. Chiang. 1998. Effects of ammonium and nitrate on callus growth of tobacco and soybean and activities of nitrogen metabolizing enzymes. *Kor. J. Plant Tissue Culture* 25:57-61.

- Park, S.G., B.S. Lee, and S.J. Chung. 1999. Effects of substrates on the growth and fruit quality of 'Mudeungsan' watermelon grown in hydroponics. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 40:419-424.
- Park, S.Y., H.N. Murthy, and K.Y. Paek. 2000. Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 63:67-72.
- Pierik, R.L.M. 1988. In vitro culture of higher plants as a tool in the propagation of horticultural crops. *Acta Hort.* 226:25-40.
- Pospisilova, J., J. Solarova, and J. Catsky. 1992. Photosynthetic responses to stress during in vitro cultivation. *Photosynthetica* 26:3-18.
- Preil, W. 1991. Application of bioreactors in plant propagation. pp 425-445. In: Debergh, P.C. and R.H. Zimmerman (eds.). *Micropropagation technology and application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Preil, W., P. Florek., U. Wix, and A. Beck. 1988. Towards mass propagation by use of bioreactors. *Acta Hort.* 266:99-106.
- Reddy, V.K. and N.C. Rajapakse. 1996. The influence of spectral composition on growth and development of chrysanthemum plants. *Acta Hort.* 440:292-297.
- Reed, D.W. 1996. Closed Production systems for containerized crops: Recirculating Subirrigation and zero-leach systems. p. 93-122. In David Wm. Reed (ed.). *Water, media and nutrition for greenhouse crops*. Ball Publishing. Batavia, Illinois, U.S.A.
- Rout, G.R. and P. Das. 1997. Recent trends in the biotechnology of chrysanthemum: a critical review. *Scientia Hort.* 69:239-257.
- Saccardy, K., B. Pineau, O. Roche, and G. Cornic. 1998. Photochemical efficiency of photosystem II and xanthophyll cycle components in *Zea mays* leaves exposed to water stress and high light. *Photosynthesis Res.* 56:57-66.
- Sang, C.K., B.J. Choi, and E.J. Choi. 1999. Effect of light intensity and mist intervals on the rooting and nursery qualities in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) cuttings. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 40:722-726.



- SAS Institute. 1989. SAS/STAT User's Guide, vers. 6, 4th ed, Vol. 2. SAS Institute, Cary, NC.
- Schwarz, M. 1995. Soilless culture management. Springer Verlag, Berlin. pp. 31-32, 43-56.
- Shim, S.W., J.W. Heo, S.K. Kim, and K.Y. Paek. 2001a. Effects of number of air exchanges, sucrose and BA on shoot proliferation and growth of 'Cambell Early' grape (*Vitis* hybrid) plantlets. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 42:540-544.
- Son, J.E. 1999. Analyses of root-zone temperatures at various locations in NFT, DFT, and aggregate culture systems. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 40:4-8.
- Son, J.E., S.W. Nam, and J.T. Chang. 1996. A study on environmental analyses in NFT culture systems. Bio. Fac. & Env. Abstracts 5:63-64.
- Son, S.H., S.M. Choi, S.R. Yun, O.W. Kwon, Y.H. Lee, and K.Y. Paek. 1999. Large-scale culture of plant cell and tissue by bioreactor system. J. Plant Biotech. 1:1-7.
- Sutter, E. 1988. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and sweetgum plants after removal from in vitro culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 113:234-238.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 1991. Transport across biological membranes. p.134-136. In: L. Taiz and E. Zeiger (eds.). Plant physiology. The Benjamin and Cummings Publishing Company, Inc.
- Takayama, S. and M. Akita. 1994. The types of bioreactors used for shoots and embryos. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 39:147-156.
- Takayama, S. and M. Misawa. 1981. Mass propagation of *Begonia ×hiemalis* plantlets by shake culture. Plant Cell Physiol. 22:261-467.
- Takahashi, S., K. Matsugara, H. Yamagata, and T. Morimoto. 1992. Micropropagation of virus free bulblets of *Lilium longiflorum* by tank culture. Acta Hort. 319:83-88.

- Tanaka, M., T. Takamura, H. Watanabe, M. Endo, T. Yanagi, and K. Okamoto. 1998. *In vitro* growth of *Cymbidium* plantlets cultured under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). *J. Hort. Sci. & Biotech.* 73:39-44.
- Tennessen, D.J., E.L. Singaas, and T.D. Sharkey. 1994. Light-emitting diodes as a light source for photosynthesis research. *Photosyn. Res.* 39:85-92.
- Thomas, P. 1998. Contribution of leaf lamina of grape nodal microcuttings to rooting, root vigour and plantlet growth *in vitro*. *J. Plant Physiol.* 153:727-732.
- Thomas, P. 2000. Microcutting leaf area, weight and position on the stock shoot influence root vigour, shoot growth and incidence of shoot tip necrosis in grape plantlets *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 61:189-198.
- Trigiano, R.N. and R.A. May. 1992. Laboratory exercises illustrating organogenesis and transformation using chrysanthemum cultivars. *HortTechnol.* Jan./Mar. 325-327.
- Van Huylenbroeck, J.M. 1994. Influence of light stress during the acclimatization of *in vitro* plantlets, p. 451-453. In: P.C. Strulk, W.J. Vredenberg, J.A. Renkema, and J.E. Parlevliet (eds.). *Plant production on the threshold of a new century*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Van Huylenbroeck, J.M. and P.C. Debergh. 1996. Physiological aspects in acclimatization of micropropagated plantlets. *Plant Tiss. Cult. Biotec.* 2:136-141.
- Van Huylenbroeck, J.M., A. Piqueras, and P.C. Debergh. 1998. Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during *ex vitro* acclimatization of micropropagated plants. *Plant Sci.* 134:21-30.
- Vasil, I.K. 1994. Automation of plant propagation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 39:105-108.
- Von Caemmerer, S. and G.D. Farquhar. 1981. Some relationship between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153:376-387.
- Williams, R.R. 1995. The chemical microenvironment. In (*Automation and environmental control in plant tissue culture*). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. p.405-439.

- Williams, R.R., A.M. Taji, and K. Winney. 1990. The effects of *Ptilotus* plant tissue on pH of in vitro media. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 22:153-158.
- Woo, J.H., Y.G. Sim, Y.Y. Han, Y.J. Seo, C.B. Kim, K.B. Choi, and K.W. Kim. 2000. Effect of plug cell size, rooting medium and shading duration of rooting and growth of *dendranthema grandiflorum* 'Baegkwang' cuttings. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 41:292-296.
- Yamazaki, K. 1984. Comprehensive hydroponic culture. Hirotoimo Pub. Co., Tokyo. p. 34-40, 49-55. (in Japanese)
- Yang, C.S., T. Kozai, and K. Fujiwara. 1995. Effects of initial inorganic ion composition and initial total inorganic ion concentration of culture medium on the net photosynthetic rate and growth of strawberry plantlets in vitro under photoautotrophic conditions. *Environ. Control in Biol.* 33:71-77.
- Yoshida, H., T. Hayashi, T. Harada, and K. Konishi. 1992. Effects of medium composition and pre-treatment on rooting of plug nursery plant. *Acta Hort.* 319:441-446.
- Yue, D., Y. Desjardins, M. Lamarre, and A. Gosselin. 1992. Photosynthesis and transpiration of in vitro cultured asparagus plantlets. *Scientia Hort.* 49:9-16.