식물조직배양학회지 제28권 제3호
Korean J. Plant Tissue Culture
Vol. 28, No. 3, 117~121 (2001)

기내 환경에 따른 거베라 'Beauty' 배양묘 잎의 구조적 특성과 탄수화물 함량의 차이

이현숙* · 임기병[1] · 정재동[2] · 김창길[3]
경상북도 농업기술원, [1]국제식물연구소, [2]경북대학교 원예학과, [3]상주대학교 원예학과

Structural Characteristics of Leaves and Carbohydrate Content of Propagules Grown at Different Culture Conditions in *Gerbera hybrida* 'Beauty'

LEE, Hyun Suk* · LIM, Ki Byung[1] · CHUNG, Jae Dong[2] · KIM, Chang Kil[3]
Kyungbuk Agriculture Technology Administration, Taegu, 702-320, Korea
[1]Bussiness unit Genetics and Breeding, Plant Research International, P.O. Box 16, 6700 AA, Wageningen, The Netherlands
[2]Dept. of Horticulture, Kyungpook Nat'l Univ., Taegu, 702-701, Korea
[3]Dept. of Horticulture, Sangju Nat'l Univ., Sangju, 742-711, Korea

ABSTRACT Microstructure of abaxial leaf surface and carbohydrate content of propagules grown in different culture conditions such as heterotrophic, mixotrophic and autotrophic carbon source were investigated. In the leaves of propagules which were grown in the green house, autotrophic and mixotrophic conditions, wax layer was observed, but in the leaves of the heterotrophic propagules, it was not observed. Size and number of stomata of the leaves in the heterotrophic condition was larger and more numerous than that of autotrophic propagules. Especially, stomata of the leaves in the autotrophic condition was similar to the leaves of plant grown in green house. Carbohydrate content was higher in photoautotrophic condition than that in mixotrophic and heterotrophic culture. Also, Free sugar content showed higher in photoautotrophic propagules than that in mixotrophic and heterotrophic culture. In all the culture conditions, content of glucose were higher than that of other free sugars.

Key words: Cabohydrate, free sugar, gerbera, heterotrophic, mixotrophic, photoautotrophic, stomata

서 론

일반적으로 조직배양기술을 이용한 식물의 번식은 밀폐된 용기나 가스교환이 제한적인 환경조건하에서 식물체를 배양하기 때문에 자연상태에서 자라는 식물과는 큰 차이를 갖고 있다. 즉, 식물체 스스로의 광합성 작용에 의해서 탄수화물을 공급받는 대신 인위적으로 배지내에 탄소원을 첨가하기 때문에 광합성은 상당히 제한되어 이루어질 뿐만 아니라 균일한 온도와 높은 상대 습도는 수분 및 무기이온의 흡수율과 당의 이용률이 낮을 수밖에 없다 (Kozai와 Kitaya, 1993). 또한 기내 배양묘는 환경 스트레스에 매우 민감하며 포장이식 후 스트레스에 노출된 배양묘는 생장이 지연되거나 고사한다 (Grout와 Aston, 1977). 이러한 현상은 기내 배양환경이 부적절할 경우에 빈번하며 부적절한 배양환경은 식물체 표피층의 발달 불량, 기공의 기능 저하, 책상 및 해면세포 발달의 불량 등을 야기하기 때문이며 묘 생산 측면에서 볼 때 배양묘의 형태가 균일하지 못하고 측근의 발생이 불량한 묘가 생산되어 생산효율성이 극히 떨어질 수 있다 (Kozai와 Kitaya, 1993).

*Corresponding author. Tel 053-320-0289
E-mail 222hs@hanmail.net

또한, 밀폐된 용기를 사용할 경우 명기 동안 배양병내 CO_2 농도가 대기중의 CO_2 농도보다 현저히 낮은데 (Ando 1978; Fujiwara et al. 1987; Infante et al. 1989) 이는 엽록소를 가진 식물체가 공기순환이 이루어지지 않는 환경하에서 광합성이 이루어지고 있음을 암시하며 CO_2 농도의 감소는 광합성을 제한하는 요인이 될 수 있다. 최근 감자 (Kim 등 1999), 딸기 (Jeong 등 1999), 스타치스 (Lee와 Jeong 1999) 등의 묘생산에 있어서 용기 내로 공기순환을 시도함으로써 묘생육에 효과적이라는 결과는 이를 뒷받침하고 있다. 나아가 기존의 용기에 CO_2 공급에 그치지 않고 기내배양기간을 최소화하고 이들 유묘를 환경이 조절된 배양기로 이식하여 배양을 계속함으로써 포장이식 후 환경 스트레스를 받지 않고 활착하여 생장이 지속될 수 있는 방안을 모색하고자 하였다.

따라서 본 실험에서는 밀폐용기를 사용하여 생산한 배양묘와 공기순환이 이루어지는 조건에서 생장한 배양묘 별도로 고안된 배양기내에서 배양한 유묘간의 생리형태적 차이점을 알아보기 위해 표피세포 및 기공의 형태와 탄수화물 함량 등을 분석한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

적색계통의 거베라 'Beauty'를 실험재료로 사용하였고 재료의 증식은 Murashige 등 (1974)이 사용한 MS 기본배지에 adenine sulfate 80 mg · L^{-1}, NaH_2PO_4 85 mg · L^{-1}, IAA 0.5 mg · L^{-1}, kinetin 10 mg · L^{-1}, sucrose 30 g · L^{-1}, 한천 8 g · L^{-1}를 첨가하였고, pH는 5.8로 조정하였다. 배양용기는 350 mL의 Magenta type으로써 50 mL의 배지를 분주하여 잎이 3~4매 부착된 배양묘를 용기당 4개씩 12반복으로 배양하였다. 기본 배양환경은 온도 25±2℃, 광도 40 μmol · m^{-2} · s^{-1} PPF, 일장 16시간으로 하여 20일간 배양하였다.

기내환경

기내 환경은 3가지로 구분하였는데 첫째, MS 기본배지에 adenine sulfate 80 mg · L^{-1}, NaH_2PO_4 85 mg · L^{-1}, IAA 10mg · L^{-1}, sucrose 30 g · L^{-1}, 한천 8 g · L^{-1}를 첨가하여 시간당 공기순환 횟수 0.01회 (Kozai 등 1986)로 조절한 밀폐용기에 배양묘를 이식하여 기본배양환경으로 배양하였고 (이하 heterotrophic 또는 타가영양이라 함), 둘째, 타가영양과 동일한 배지를 사용한 후 배양용기 내로 공기주입이 가능하도록 pore size 0.2 μm인 membrane filter를 배양용기의 뚜껑에 2군데 부착하여 시간당 공기순환 횟수를 1회로 조절한 후 배양묘를 이식하였다. 항온실 (HB-301LP) 조건은 광도 70 μmol · m^{-2} · s^{-1} PPF, 온도 25℃, 16시간 일장, CO_2 500 μmol · mol^{-1}가 연속적으로 공급이 가능하도록 하였다 (이하 mixotrophic 또는 혼합영양이라 함). 셋째, 별도로 고안된 자동화 배양기 (특허출원 제98-12257호)에 혼합영양 상태로 배양한 유묘를 인공 혼합 상토 {cocopeat : peatmoss : perlite : vermiculite = 30 : 20 : 30 : 20 (%, v/v)}를 충진한 트레이 {15(W)×24(L)×3.5 cm(H)}에 24본씩 3반복으로 이식하여 광도 40 μmol · m^{-2} · s^{-1} PPF로 조절하고 온도 25℃, 16시간 일장, 상대습도 70%, CO_2 500 μmol · mol^{-1}하에서 배양하면서 18시간마다 48 mL씩 1회 관수하였고 별도의 영양분은 첨가하지 않았다 (이하 photoautotrophic 또는 자가영양이라 함). 넷째, 타가영양 상태로 배양한 유묘를 인공혼합 상토로 충진한 50공 육묘용 트레이에 옮겨 미스트 시설 하에서 순화 10일간 시킨 후 광도가 200~300 μmol · m^{-2} · s^{-1}가 되도록 차광한 유리온실내에서 배양하였다.

표피 및 기공조직의 형태적 특성

기공형태는 4종류의 배양묘 잎 뒷면을 주사전자현미경 (HITACHI Scanning Electronic Microscope S4100)을 사용하여 500배와 2,000배의 배율로 비교하였으며 이들 3종류의 배양묘는 유리온실에서 20일간 육묘한 건전묘의 잎과 대비하였다. 시료조제는 10 mm^2의 크기의 잎절편을 0.1 M phosphate buffer와 4% osmun 혼합용액 1 mL에 침지시켜 90분 동안 고정시킨 후, 0.1 M phosphate buffer에 15~20분 간격으로 2~3회 수세하고 30, 50, 70, 80, 90, 95% 에탄올로 각각 탈수시킨 뒤 무수 에탄올로 5분씩 2~3회 탈수시키고 isoamylacetate에 10분씩 3회 치환시킨 후 CO_2 critical dryer로 건조하여 백금으로 코팅하였다. 또한 3종류 배양묘 잎의 기공수와 크기를 조사하기 위하여 10 mm×10 mm 크기로 잎을 잘라 앞면과 뒤 표면 위에 finger nail polish를 바르고 7~8분간 말린 뒤 얇은 막으로 벗겨 슬라이드 글라스 위에 놓고 광학현미경 (Olympus CX 40, Japan)으로 검경하였다. 기공 수는 현미경을 400배로 조절하여 시야에 들어오는 지점의 갯수를 조사하였고, 기공의 크기는 타원형의 길이와 폭을 현미경 접안렌즈에 부착된 μm단위의 눈금자를 이용하여 5반복 평균치로 비교하였다.

탄수화물 함량 및 유리당 분석

탄수화물 함량을 조사하기 위하여 4종류 배양묘를 대상으로 잎과 엽병을 포함한 생체 10 g을 증류수와 혼합하여 마쇄한 후 여과지 (Whatman No. 5)로 여과하였다. 추출액을 50 mL로 정용하여 phenolsulfuric법 (Chaplin과 Kennedy, 1986)으로 측정하였다. 당 표준용액은 glucose를 0.125, 0.25, 0.5, 1.0%로 하였고 470nm의 파장으로 UV-VIS spectrophotometer (UV-1201, Shimadzu)로 분석 비교하여 검량곡선을 작성한 후 탄수화물 함량을 환산하였다. 유리당은 생

Table 1. The operating conditions of HPLC for free sugar analysis.

Items	Conditions
HPLC	Waters, Model 510
Column	ID 4.6 × 250 mm carbohydrate column (Waters co.)
Detector	RI detector (Model 410, Waters)
Column Temperature	32℃
Flow rate	10 μl, 1.0 μl/min.
Mobil phase	80% acetonitrile (ioscratic)

체시료 10g을 70% 에탄올 20 mL과 혼합마쇄하여 여과지 (Whatman No. 5)로 여과한 후 실온에서 초음파기로 60분간 추출한 후 추출용액을 0.45 μm membrane filter와 sepax catrige로 전처리한 다음 분석하였으며 그 조건은 Table 1과 같다. Fructose, glucose, sucrose의 표준품을 각각 5가지 농도 (0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0%)로 검량곡선을 작성하였다.

결과 및 고찰

표피 및 기공조직의 형태적 특성

타가영양묘 (Heterotrophic seedlings), 혼합영양묘 (Mixotrophic seedlings), 자가영양묘 (photoautotrophic seedlings) 그리고 유리온실에서 생장한 유묘의 기공형태를 주사전자현미경으로 관찰한 결과, 타가영양묘 (Fig. 1A, 1B)는 잎의 하표피층에 왁스의 결정형이 관찰되지 않았고 기공은 대부분 열려 있는 상태였다. 반면, 혼합영양묘 (Fig. 1C, 1D)는 닫힌 상태의 기공과 열린 기공이 혼재하여 분포하였으며 잎의 각 피층은 다소 발달되어 있었으며 특히 자가영양묘 (Fig. 1E, 1F)는 온실에서 자란 유묘 잎의 기공형태와 유사하였다. 그리고 자가영양묘와 유리온실에서 자란 유묘의 잎 (Fig. 1G, 1H)은 각피 외층에서 발견되는 왁스 결정체의 모양이 편평한 간상이며 그물 모양의 등성 (ridge)이 작고 규칙적으로 잘 발달되어 있었으며 기공 역시 거의 정상상태를 유지하고 있었다. Sutter와 Langhans (1979)는 카네이션 경정배양시 고체 한천 배지에서 배양된 잎에서는 희끗희끗한 왁스의 색채가 대부분이 보이지 않고 액체 배양된 잎에서는 색채가 전혀 나타나지 않고 유리 같은 형상을 나타내는 등 일반적으로 기내 배양묘의 잎은 왁스의 결정체 구조들이 발견되지 않고 상피의 표면이 부드럽고 완만한 층으로 이루어져 있다고 하였는데 거베라의 경우도 타가영양묘는 비슷한 양상을 나타내었다. 그리고 이들 카네이션을 고광도하에서 배양했을 경우 잎의 표면에 희끗희끗한 색채를 띄게 되는데 저광도하에서 배양한 기내 유묘보다 순화가 용이하다고도 하였다. 이러한 점을 고려해 볼 때 거베라는 배지내에 당이 첨가된 타가영양과 당첨가뿐만 아니라 광도와 공기순환 횟수를 늘려준 혼합영양 환경보다는 배지내에 당을 첨가하지 않고 상토를 사용한 자가영양 조건에서는 기공의 형태가 훨씬 더 안정적임을 확인할 수 있어서 자가영양묘는 순화시에도 외부환경 변화에 대한 적응력이 뛰어날 것으로 판단되었다. 유묘의 엽내 기공수와 크기를 관찰한 결과 (Table 2), 기공수는 전반적으로 앞면보다 뒷면에 많았으며 기내환경을 달리하여 생산한 유묘들을 비교해 볼 때 타가영양묘의 기공수가 가장 많았고, 혼합영양묘, 자가영양묘 그리고 유리온실에서 각각 생장한 유묘의 순으로 기공수가 감소하였다. 기공의 길이는 유묘간 큰 차이가 없었으나 폭은 타가영양묘가 12.0 μm인 데 비해 자가영양묘가 9.1 μm로 유리온실에서 생장한 묘의 8.4 μm와 비슷하였다. 이러한 결과는 타가영양묘의 경우 주사현미경 관찰에서와 같이 대부분 기공이 열린 상태로 존재하는 반면 자가영양묘와 유리 온실묘의 경우에는 기공이 닫힌 상태이기 때문인 것으로 생각된다. 33종의 난과식물 (Paek과 Jun, 1995)을 대상으로 조사한 바에 의하면 대부분의 종에서 기공수가 증가할수록 기공의 크기는 작아지는 경향이었다고 하였고 리시안서스 (Paek과 Hahn, 2000)의 경우 기내묘와 기외묘의 기공관찰에

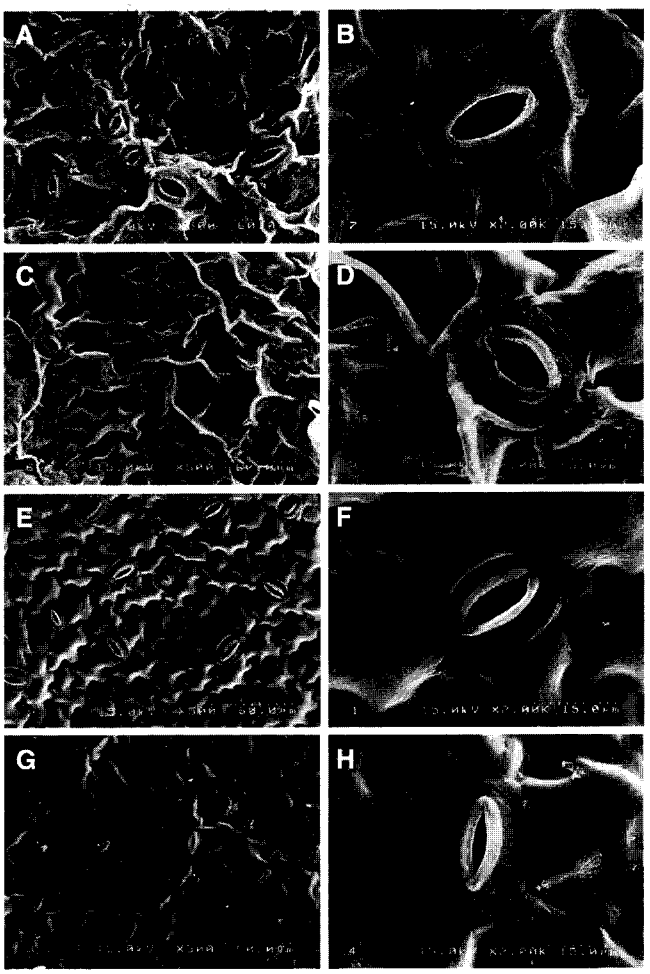

Figure 1. Scanning electron photomicrographs of abaxial leaf surface of heterotrophic propagule (A; X500, B; X2,000), mixotrophic propagule (C; X500, D; X2,000), photoautotrophic propagule (E; X500, F; X2,000) and green house plant (G; X500, H; X2,000).

Table 2. Characteristics of epidermis of propagules grown by means of different culture conditions in *Gerbera* 'Beauty'.

Culture coditions	Adaxial			Abaxial		
	Stomata number	Length (μm)	Width (μm)	Stomata number	Length (μm)	Width (μm)
Heterotrophic[z]	17.7a[v]	10.6a	9.8a	90.3a	11.4a	12.0a
Mixotrophic[y]	12.3b	12.8a	10.4a	56.0b	11.8a	10.4ab
Photoautotrophic[x]	8.4bc	12.8a	10.8a	43.7b	10.6a	9.1b
Green house[w]	5.3c	12.1a	10.4a	38.3b	10.6a	8.4c

[z]Heterotrophic; closed type container (number of air exchange - 0.01 time/hour), 30 g · L^{-1} sucrose and 40 μmol · m^{-2} · s^{-1}.
[y]Mixotrophic; air permeable container (number of air exchange - 1.0 time/hour), 30 g · L^{-1} sucrose, 500 mol · mol^{-1} CO_2 and 70 μmol · m^{-2} · s^{-1} PPF.
[x]Photoautotrophic; medium{cocopeat : peatmoss : perlite : vermiculite = 30 : 20 : 30 : 20 (%, v/v)} without sugar, under 500 mol · mol^{-1} CO_2 and 40 μmol · m^{-2} · s^{-1} PPF in culture chamber.
[w]Green house; seedlings were grown in green house under 200~300 μmol · m^{-2} · s^{-1}
[v]Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

있어서도 기내묘가 기외묘보다 기공수는 많지만 크기는 작았다고 하여 본 실험의 결과와 동일하였다. 자가영양묘는 타가영양묘와 혼합영양묘에 비하여 기공수와 크기는 작았지만 기공의 형태가 안정적이었고 전반적으로 온실묘와 유사하였음을 볼 수 있어 자가영양묘는 다른 배양묘보다도 훨씬 기외이식 후에 활착이 용이하고 그 이후의 생장도 빠를 것으로 판단된다.

탄수화물 함량 및 유리당의 비교

배양방법을 달리하여 생산된 식물체의 탄수화물 및 유리당 함량을 각각 분석한 결과 (Table 3), 자가영양묘, 혼합영양묘, 타가영양묘의 순으로 탄수화물 함량이 감소하였다. 그리고 유리당의 함량도 탄수화물과 동일한 경향을 나타내었으나 배양묘에 따라 유리당 분포를 보면 모든 처리에서 glucose 함량이 가장 많았고, froctose와 sucrose 함량에 있어서는 배양묘간 다소 차이가 있어 타가영양묘는 fructose가, 혼합영양묘, 자가영양묘와 온실묘는 sucrose가 각각 glucose 다음으로 많았다. 한편 온실 배양묘는 상기 배양묘에 비해 전반적으로 탄수화물 함량이 높았다. 탄수화물은 광합성에 의해 합성되는 유기물로서 당, 전분, inulin 등의 형태로 세포의 중요한 에너지원이 된다 (郭 등 1984). 다시 말하면 식물체 속에는 glucose와 fructose 등의 단당류, sucrose 같은 이당류, 여러 분자가 결합한 다당류 등의 탄수화물로 존재하며 이들 동화물질은 호흡에 의하여 소비되거나 새로운 조직 또는 기관을 형성하는 데 이용되고 그 나머지는 저장물질로 축적된다. 그 후에 필요에 따라 저장물질을 여러 가지 대사작용에 이용하기도 한다. 온실묘를 제외한 배양묘 중에서 자가영양묘는 가장 많은 양의 탄수화물을 가지고 있었는데 이는 자가영양묘가 다른 배양묘보다 호흡 등의 대사활동과 세포 및 기관형성에 유리하게 작용할 것으로 생각되어지며 온실묘를 비롯한 3종의 배양묘가 함유하고 있는 유리당의 종류 중에서 가장 많았던 것은 glucose이고 타가영양묘만이 sucrose보다 fructose가 많았는데 이러한 결과가 배양환경에 따른 차이인지는 더욱더 세밀히 연구가 이루어져야 할 것으로 생각되었다.

기내환경을 달리하여 배양한 식물체의 표피세포, 기공조직과 탄수화물 함량을 비교해 보았을 때 자가영양묘는 다른 배양묘에 비하여 안정적인 기공형태와 식물체내에 가장 많은 양의 탄수화물을 가지고 있었으며 특히 기공 형태는 온실묘와 가장 유사하였던 점으로 보아 기외이식 후의 생존율과 정식후 활착 및 초기생장에 촉진적으로 반응할 것으로 판단되어진다.

적 요

배양환경을 달리하여 생산한 3가지의 유묘 (타가영양묘, 혼합영양묘, 자가영양묘)를 대상으로 잎의 형태적 특성 및 탄수화물 함량 등을 비교 분석한 결과, 온실묘, 자가영양묘와 혼합영양묘는 하표피층에 왁스의 결정형이 관찰되었으나 타가영

Table 3. Carbohydrate and free sugar content of propagules grown by means of different culture conditions in *Gerbera* 'Beauty'.

Culture conditions	Carbohydrate (%/g · f.w.)	Glucose (mg/g · f.w.)	Fructose (mg/g · f.w.)	Sucrose (mg/g · f.w.)
Heterotrophic[z]	4.3	921.3	155.6	118.8
Mixotrophic[y]	5.8	1,740.6	220.0	472.5
Photoautotrophic[x]	6.2	1,958.8	399.4	497.5
Green house[w]	6.7	2,950.0	874.4	972.5

[zyxw]See foot note of Table 2.

양묘에서는 관찰되지 않았다. 기공수와 크기에 있어서는 타가영양묘가 자가영양묘에 비하여 기공이 크고 많았다. 특히, 자가영양묘의 기공형태와 크기는 온실에서 자란 유묘와 거의 동사하였다. 식물체의 탄수화물함량은 자가영양묘가 혼합영양과 타가영양묘에 비하여 많았으며 유리당도 역시 자가영양묘가 가장 많았고 모든 배양묘에서 glucose의 함량이 가장 많았다.

사사 - 본 연구는 농림수산기술개발사업에 의하여 수행된 1996년에서 2000년까지의 연구결과 중 일부임.

인용문헌

郭炳華, 任綱彬, 孫膺龍, 金容旭 (1984) 三訂 植物生理學. 鄕文社. pp 29-30

Ando T (1978) Gaseous environment in the airtight culture vessel containing orchids. Abst. Annual Autumn Meet. Jap Soc Hort Sci pp 368-369

Chaplin MF and Kennedy JF (1986) Carbohydrate analysis. Apractical Approach. JRI. Press, Oxford and Washington, D. C. pp 2

Fujiwara K, Kozai T and Watanabe I (1987) Fundamental studies on environment in plant tissue culture vessels (3). J Agric Meteorol **43**:21-30

Grout BW and Aston H (1977) Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. Hort Res **17**:1-7

Infante R, Magnanini E and Righetti B (1989) The role of light and CO_2 in optimizing the conditions for shoot proliferation of *Actinidia deliciosa in vitro*. Physiol Plant **77**:191-195

Jeong BR, Im MY and Hwang SJ (1999) Development of a mechanizable micropropagation method for strawberry plants. J Kor Soc Hort Sci **40**:297-302

Kim HS, Lee EM, Lee MA, Woo IS, Moon CS, Lee YB and Kim SY (1999) Production of high quality plantlets by photoautotrophic culture for aeroponics in potato. J Kor Soc Hort Sci **40**:26-30

Kozai T, Kazuhiro FW and Ichiro WT (1986) Fundamental studies on environments in plant tissue culture vessels (2). Effect of stoppers and vessels on gas exchange rates between inside and outside of vessels closed with stoppers. J Agr Met **42**:119-127

Kozai T and Kitaya Y (1993) Environmental control for production of quality plantlets *in vitro* at low costs on a large scale. In : Soh, Liu W.Y., Komamine, J.R. (eds), Advances in Developmental Biology and Biotechnology of Higher Plants. pp 71-100

Lee EJ and Jeong BR (1999) Growth of *Limonium* 'Misty Blue' as affected by culture environment in vitro and level of shading during ex vitro acclimatization. J Kor Soc Hort Sci **40**:623-626

Murashige T, Serpa M and Jones JB (1974) Clonal multiplication of gerbera through tissue culture. HortSci **9**:175-180

Paek KY and Jun ES (1995) Stomatal density, size and morphological characteristics in orchids. J Kor Soc Hort Sci **36**:851-862

Paek KY and Hahn EJ (2000) Cytokinins, auxin and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoot-tip cultures of lisianthus [*EUSTOMA GRANDIFLORUM* (RAF.) SHINN]. In Vitro Cell Dev Biol Plant **36**:128-132

Sutter E and Langhans RW (1979) Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. J Amer Soc Hort Sci **104**:493-496

(접수일자 2001년 2월 27일)