

Autotrophic Growth of *Limonium* spp. 'Ocean Blue' Plantlets *In Vitro* as Affected by PPF, NAEH and CO₂ Concentration

Gi Won Jeong¹ · Byoung Ryong Jeong^{1,2*}

¹Division of Applied Life Science, Graduate School, Gyeongsang National Univ., Jinju 660-701, Korea

²Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National Univ., Jinju 660-700, Korea

Abstract

Growth and development of *Limonium* spp. 'Ocean Blue' plantlets were studied under, three levels of photosynthetic photon flux (PPF), 70, 150 and 220 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, two levels of CO₂ concentration, 500 and 1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$, and two levels of number of air exchanges per hour (NAEH), 0.1 h⁻¹ and 2.8 h⁻¹. Explants were obtained from photomixotrophically-micropropagated plantlets. Four explants per vessel were cultured under cool-white fluorescent lamps for 16 h · d⁻¹ at 25±1°C and 70~80% relative humidity. In treatments of 2.8 h⁻¹ NAEH, a 10 mm round hole made on the vessel cap was sealed with a microporous filter and two CO₂ concentrations in the culture rooms were provided from a liquefied CO₂ tank. Fresh and dry weights, height, length of the longest root, number of leaves, and leaf area significantly increased with increasing PPF and especially, CO₂ concentration. Growth was enhanced by a 2.8 h⁻¹ NAEH. Overall, treatment with a 220 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPF and a 1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ CO₂ resulted in the most vigorous growth of *Limonium* spp. 'Ocean Blue' plantlets.

Key words: culture environment, light intensity, micropropagation, ventilation

*Corresponding author

서 언

스타티스는 식물학상 갯질경이과(Plumbaginaceae) 리모니움(*Limonium*)속에 속한다. 원산지는 유럽, 중동, 아프리카, 남미, 중국, 시베리아 등으로 비교적 널리 분포되어 있고, 원종은 약 200여종이 있으며 대부분 다년생이고 일년생은 적다. 최근에는 중간교잡에 의해 많은 품종이 육성되어 재배되고 있으며 이러한 중간잡종을 하이브리드(hybrid) 스타티스라 한다. 스타티스는 절화 및 안개초를 대신한 배경화와 건조화로 많이 쓰이며 재배면적도 점차 증가하는 추세에 있다. 이처럼 급격한 증가를 보이고 있는 것은 최근 시장에서 인기를 끌고 있는 미스티 블루(Misty Blue)를 중심으로 한 중간 교배종의 재배면적의 증가가 큰 영향을 미쳤기 때문이다.

스타티스는 주로 종자나 기외 분주를 통해 번식이 되고 있다. 그러나 이러한 번식법은 세대를 이어가면서 그 품종특성을 잃어버리는 경우가 많다. 특히 본 실험에 사용된 '오션 블루'는 중간잡종으로서 종자번식이

힘들어 우량묘의 급속 대량증식을 위한 조직배양기술이 이용되고 있다. 종래의 미세번식은 배양기내의 절편체 또는 소식물체를 주로 유기물(당, 비타민 및 생장 조절물질 등)을 첨가하여 생장을 유도하는 광혼합영양 배양으로 생장에 필요한 탄소원으로 배지 내에 당을 첨가한다. 이로 인해 미생물에 의한 높은 오염률, 높은 생산비, 낮은 성장율과 순화율 등의 많은 문제점(Jeong 등, 1995; Kozai, 1992a,b)을 가지고 있다.

광합성 색소를 갖는 소식물체는 배양기내의 광합성 유효광자속(photosynthetic photon flux)과 CO₂ 가스 농도가 일정치 이상으로 유지되면 유기물이 첨가되지 않은 배지에서도 탄소동화작용에 의해 정상적으로 증식, 성장 및 발근한다고 알려져 있다(Kozai와 Iwanami, 1988). 자기영양배양법을 도입하면 당의 첨가로 야기되는 생물학적 오염발생과 배양체의 유전적 변이를 줄일 수 있고, 상대습도를 낮추어 줌으로 배양체 순화시 생존율의 증대와 정식후 정상적인 생육이 가능하다.

따라서 본 실험은 기내에서 배양용기 내외의 공기와 가스 순환을 원활히 하는 자기영양배양법을 도입하여

종래의 광합성영양배양으로 발생하는 높은 오염율, 낮은 생장을 및 순화율 등의 문제점을 극복하고 동시에 발근 단계에서의 순화가 용이한 스타티스 소식물체 생산을 위한 적정 환경을 규명하기 위해 실시하였다.

재료 및 방법

1. 배양조건

공시식물로는 스타티스(*Limonium* spp. Ocean Blue)를 사용하였다. MS 배지에서 광합성영양배양을 통하여 증식된 스타티스 식물체에서 2-3장의 잎을 가진 줄기 절편체를 채취하여 배양용기당 4개씩 치상하였다. 배양용기로는 $3.7 \times 10^{-4} \text{ m}^3$ 의 GA₇ Magenta box (Sigma, USA)를 사용하였으며, 환기횟수를 0.1 h^{-1} 에서 2.8 h^{-1} 로 향상시키기 위하여 배양용기의 뚜껑에 직경 10 mm의 구멍을 뚫어 통기성의 microporous filter(공경 $0.5 \mu\text{m}$, 직경 18 mm, Millipore사, Japan)를 부착하였다. 환기횟수는 Fujiwara 등(1987)의 방식에 의해 산출하였다.

배지는 MS(Murashige and Skoog, 1962) 기본배지를 이용하였고, 배지의 pH는 고압증기멸균 전에 pH 5.7로 조절하여 배양용기당 50mL씩을 분주하였다. 배양절편체는 온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 70-80%인 배양실에서 명기 $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 의 조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 cool-white 형광램프(모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람)를 이용하여 70 또는 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 광을 공급하였다. 배양실내 CO_2 가스를

Table 1. Levels of CO_2 concentration, photosynthetic photon flux (PPF), and number of air exchanges per hour (NAEH) used in the experiment.

CO_2 ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$)	NAEH (h^{-1})	PPF ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
500	0.1	70
		150
		220
	2.8	70
		150
		220
1000	0.1	70
		150
		220
	2.8	70
		150
		220

공급하기 위하여 순환통로에 CO_2 가스 공급구를 설치하여 액체 CO_2 가스를 명기 동안에만 $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 로 공급해 주었다. 실험구는 완전임의배치 4반복으로 하였다.

2. 생장량 측정

배양기로부터 배양된 소식물체를 꺼내 생체중, 건물중, 초장, 근장, 신초수, 엽수, 엽면적 및 엽록소 농도를 측정하였다. 생체중과 건물중을 이용하여 % dry matter와 지상부와 지하부의 건물중비(이하, T/R ratio)를 산출하였다.

건물중은 생체중을 측정한 후에 60°C dry oven에서 72시간 건조한 직후에 측정하였다. 총엽록소 농도는 각 실험구에서 식물체의 잎을 채취하여 80%(v/v) 아세톤으로 추출하고 분광광도계(Uvikon 922, Kotron Instruments, Italy)를 이용하여 측정하였다.

측정된 결과는 SAS(Statistical Analysis System, v. 6.12, Cary, NC, USA)프로그램을 이용하여 통계분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 초장과 최대근장

초장은 CO_2 농도와 PPF의 증가량에 대해서는 거의 영향을 받지 않았다(Table 2). 그러나, 환기횟수를 0.1 h^{-1} 에서 2.8 h^{-1} 로 높일 때 크게 증가하였다. 최대근장은 CO_2 농도가 높을수록, PPF가 증가될수록, 환기횟수를 높일 때 증가하였다(Table 2). 이 결과는 스타티스의 초장이 CO_2 농도가 증가하여도 초장에 영향을 미치지 않았으며, 환기횟수를 높였을 때 초장이 길어진다는 이(1998)의 결과와 같았으며, *spathiphyllum*의 초장과 최대근장이 PPF보다 환기횟수의 영향을 더 많이 받는다는 Kim(2001)의 결과와도 일치한다. 이는 환기횟수(NAEH)를 증가시켜서 배양용기 내외의 공기와 가스순환을 원활히 하고, 배양용기 내의 CO_2 농도를 높이며, 상대습도를 낮추어 식물체의 광합성에 유리한 환경을 만들어준 것이 소식물체의 생육에 긍정적 영향을 준 것이라고 생각된다.

2. 엽수, % dry matter와 T/R ratio

엽수는 환기횟수가 0.1 h^{-1} 에서 2.8 h^{-1} 로 많아질 때

스타티스 ‘오션 블루’의 자가영양배양시 광도, 환기횟수 및 CO₂ 농도가 소식물체의 기내 생육에 미치는 영향

Table 2. Height and root length of *Limonium* spp. ‘Ocean Blue’ plantlets cultured *in vitro* for 41 days as affected by CO₂, NAEH and PPF.

CO ₂ (μmol · mol ⁻¹)	NAEH ^z (h ⁻¹)	PPF ^y (μmol · m ⁻² · s ⁻¹)	Height (cm)	Root length (cm)
500	0.1	70	2.28	0.00
		150	1.95	0.00
		220	2.01	0.00
	2.8	70	3.33	1.08
		150	4.17	2.50
		220	3.86	2.46
1000	0.1	70	2.15	0.72
		150	1.77	1.95
		220	1.64	1.48
	2.8	70	3.24	2.30
		150	4.44	2.04
		220	4.94	2.42
Significance			ns ^x	**
CO ₂ (A) NAEH (B)			**	**
PPF (C)			ns	*
A × B			ns	**
A × C			ns	ns
B × C			**	ns
A × B × C			ns	*

^zNAEH: Number of air exchanges per hour of the culture vessel.

^yPPF: Photosynthetic photon flux.

^xns, *, **: Non significant, and significant at 5% and 1% levels, respectively.

Table 3. Number of leaves, % dry matter and T/R ratio of *Limonium* spp. ‘Ocean Blue’ plantlets cultured *in vitro* for 41 days as affected by CO₂, NAEH and PPF.

CO ₂ (μmol · mol ⁻¹)	NAEH ^z (h ⁻¹)	PPF ^y (μmol · m ⁻² · s ⁻¹)	No. of leaves	Dry matter (%)	T/R ratio
500	0.1	70	10.3	5.30	— ^w
		150	9.5	5.52	—
		220	10.8	6.92	—
	2.8	70	13.0	5.07	—
		150	15.8	7.41	50.63
		220	15.0	7.44	57.32
1000	0.1	70	11.0	5.01	53.50
		150	10.3	5.96	41.52
		220	11.3	5.17	28.83
	2.8	70	10.3	6.29	71.62
		150	13.0	9.50	22.68
		220	16.3	9.98	24.49
Significance			ns ^x	*	*
CO ₂ (A)			**	**	ns
NAEH (B)			ns	**	*
PPF (C)			ns	**	ns
A × B			ns	**	ns
A × C			ns	**	ns
B × C			ns	**	ns
A × B × C			ns	ns	ns

^zNAEH: Number of air exchanges per hour of the culture vessel.

^yPPF: Photosynthetic photon flux.

^xns, *, **: Non significant, and significant at 5% and 1% levels, respectively.

^w—, No measurement.

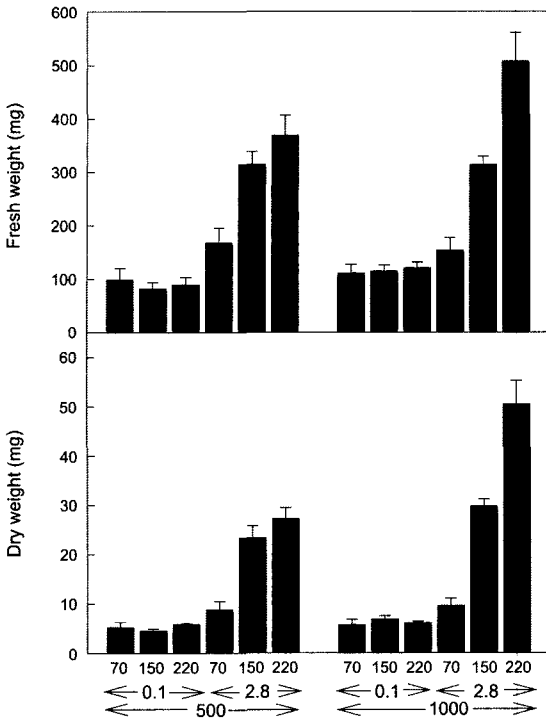


Fig. 1. Fresh and dry weights of *Limonium* spp. 'Ocean Blue' plantlets cultured *in vitro* for 41 days as affected by PPF ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), NAEH (h^{-1}) and CO_2 concentration ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$).

증가하였으나, CO_2 농도와 PPF의 증가량에 대해서는 차이를 보이지 않았다. CO_2 농도, PPF, 환기횟수 상호처리간에는 유의차가 없었다(Table 3과 Fig. 1). CO_2 농도가 $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 으로 공급될 경우에 PPF에 따른 큰 차이를 볼 수 있었는데, 이는엽수가 고농도의 CO_2 농도에서만 PPF에 영향을 받았다는 것을 나타낸다. 건물중은 CO_2 농도가 낮은구 보다는 높은구에서, PPF가 낮은구 보다는 높은구에서, 그리고 환기횟수가 낮은구에서보다 높은구에서 증가되었으며, 특히 환기횟수의 영향은 매우 뚜렷하였다(Table 3). T/R율은 CO_2 가스 무침기구 보다는 침기구에서, PPF가 낮은구 보다는 높은구에서 증가되었으며, 환기횟수의 영향은 없었다(Table 3).

3. 생체중과 건물중

기내에서 환기횟수와 PPF 및 CO_2 농도에 영향을 받은 41일 동안 배양된 스타티스 '오션 블루' 초식물체의 생체중과 건물중은 Fig. 1에 나타나 있다.

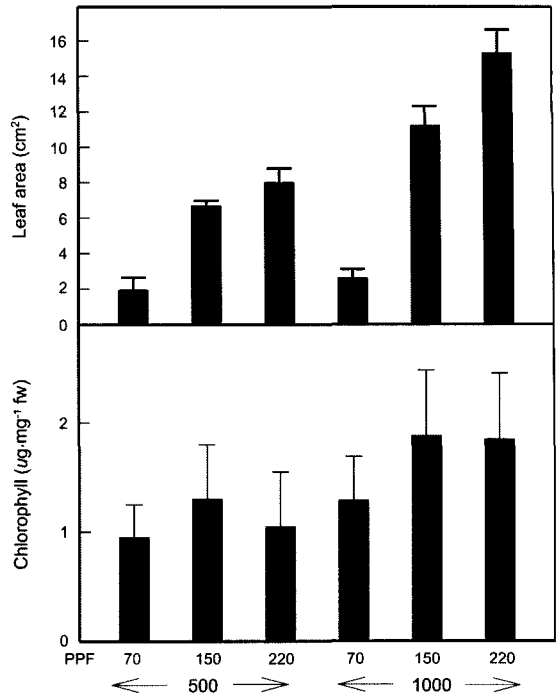


Fig. 2. Leaf area and chlorophyll concentration of *Limonium* spp. 'Ocean Blue' plantlets cultured *in vitro* for 41 days as affected by PPF ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) and CO_2 concentration ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$).

생체중과 건물중은 모두 CO_2 가스를 공급할수록, PPF가 증가될수록 높았으며, 특히 환기횟수를 높인 처리구에서 컸다. PPF가 $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 경우 CO_2 농도가 증가되더라도 별다른 효과가 없었다. 이는 기내에서 $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 가 초식물체가 성장하기에 낮은 광이라는 것을 보여준다. 따라서 자가영양배양시에는 PPF의 수준을 높여주는 것이 스타티스 초식물체의 성장을 향상시킬 수 있었다. 이 실험에서는 PPF $220 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 정도의 수준에서 생체중이 가장 높았다. CO_2 가스를 공급해주면 배양식물의 생체중과 건물중이 증가한다는 Kirdmanee(1995a,b)와 유사한 결과를 보였으나, 이(1998)는 유기물을 첨가한 배지에 광도를 높이고 CO_2 가스를 공급해 주었을 때 생체중과 건물중이 낮았다고 보고하였다.

환기횟수를 증진시켰을 때의 성장촉진 효과에서 딸기(Kozai와 Sekimoto, 1988), 카네이션(Kozai와 Iwanami, 1988), 감자(Cournac 등, 1992; Fujiwara 등, 1992), 카네이션과 딸기(정 등, 1996), 스타티스(이, 1998) 등

스타티스 ‘오션 블루’의 자가영양배양시 광도, 환기횟수 및 CO₂ 농도가 소식물체의 기내 생육에 미치는 영향

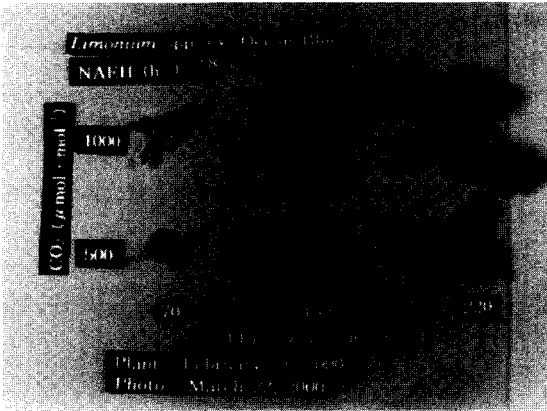


Fig. 3. *Limonium* spp. ‘Ocean Blue’ plantlets at the end of 41 days of *in vitro* culture under environment of various PPF and CO₂ combinations.

의 작물에서도 비슷한 경향을 보였다.

건물중은 고농도의 CO₂를 공급시에 증가되는 경향을 보였다. NAEH, PPF와 CO₂ 상호작용의 효과는 더욱 뚜렷하였다. 이 결과로 미루어 볼 때, NAEH가 2.8 h⁻¹, PPF가 220 μmol·m⁻²·s⁻¹, CO₂ 농도가 1000 μmol·mol⁻¹일 때 생체중은 507.42 mg이고 건물중은 50.40 mg으로 가장 높았다.

4. 엽록소 농도와 엽면적

엽면적은 PPF가 증가되고, CO₂ 농도가 높아질수록 증가되었으며(Fig. 3), 특히 CO₂ 농도에 따라 큰 차이를 보였는데, CO₂가 1000 μmol·mol⁻¹이고, PPF가 220 μmol·m⁻²·s⁻¹인 경우 엽면적이 가장 크게 나타났다.

총엽록소농도는 처리간에 많은 차이를 보이지 않았다. 이는 배양 기간에 계속적인 CO₂ 공급으로 인하여 기공의 증산저항이 커지고, 증산량이 감소되어 오히려 광합성율이 떨어지는 현상을 초래한 결과로 보여진다(이와 이, 1994).

기내에서 배양된 소식물체는 미세환경의 변화로 인하여 소식물체의 기공 기능이 감소되므로, 순화시에 현실적인 CO₂의 농도에서 충분한 광합성을 하지 못한다(Desjardins 등, 1987, 1988, 1990). Grout와 Millam(1985)은 기내에서 배양된 딸기묘를 온실로 이식하면 대부분의 잎들이 빠른속도로 떨어지게 되며 남아있는 잎들도 탄소고정능력이 증가를 보이지 않는데, 이는 기내 배양시 광합성에 필요한 기구의 발달이 미진하였음

을 보여준다.

Literatures cited

1. Cournac, L., I. Cirier, and P. Chagvardieff. 1992. Improvement of photoautotrophic *Solanum tuberosum* plantlet culture by light and CO₂: Differential development of photosynthetic characteristics and varietal constraints. *Acta Hort.* 319:53-58.
2. Desjardins, Y., A. Gosselin, and S. Yelle. 1987. Acclimatization of *in vitro* strawberry plantlets in CO₂ enriched environments and supplemental lighting. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112:846-851.
3. Desjardins, Y., F. Laforge, C. Lussier, and A. Gosselin. 1988. Effect of CO₂ enrichment and high photosynthetic photon flux on the development of autotrophy and growth of tissue cultured strawberry, raspberry and asparagus plants. *Acta Hort.* 230:45-53.
4. Desjardins, Y., A. Gosselin, and M. Lamarre. 1990. Growth of transplants and *in vitro*-cultured clones of asparagus in response to CO₂ enrichment and supplemental lighting. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115:364-368.
5. Fujiwara, K., T. Kozai, and I. Watanabe. 1987. Fundamental studies on environments in plant tissue culture vessels. *J. Agr. Meteorol.* 43:21-30.
6. Fujiwara, K., S. Kira, and T. Kozai. 1992. Time course of CO₂ exchange of potato cultures *in vitro* with different sucrose concentrations in the culture medium. *J. Agr. Meteorol.* 48:49-56.
7. Grout, B.W. and S. Millam. 1985. Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. *Ann. Bot.* 55:129-131.
8. Jeong, B.R., K. Fujiwara, and T. Kozai. 1995. Carbon dioxide enrichment in autotrophic micropropagation: Methods and Advantages. *HortTechnology* 3:332-334.
9. 정병룡, 이은주, 김수정, 황승재. 1996. 발근단계에서의 기내 영양체계와 기외 순화방법이 카네이션과 딸기 배양묘의 생육에 미치는 영향. *한국식물조직배양학회 발표요지*. pp. 37-38.
10. Kim, J.S. and B.R. Jeong. 2001. Growth, photosynthetic rate and stomatal function of *Spathiphyllum* *in vitro* as affected by PPF and NAEH. *J. Kor. Hort. Sci.* 42:351-352.
11. Kirdmanee, C., Y. Kitaya, and T. Kozai. 1995a. Effects of CO₂ enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro*: Anatomical comparisons. *Acta Hort.* 393:111-118.
12. Kirdmanee, C., Y. Kitaya, and T. Kozai. 1995b. Effects of CO₂ enrichment and supporting material on growth, photosynthesis and water potential of *Eucalyptus* shoots/plantlets cultured photoautotrophically *in vitro*. *Environ Control Biol.* 33:133-141.

13. Kozai, T. and Y. Iwanami. 1988. Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the propagation stage. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 57:279-288.
14. Kozai, T. and K. Sekimoto, 1988. Effects of the number of air changes per hour of the closed vessel and the photosynthetic photon flux on the carbon dioxide concentration inside the vessel and the growth of strawberry plantlets in vitro. *Environ. Control Biol.* 26:21-29.
15. Kozai, T., S. Kushihashi, C. Kubota, and K. Fujiwara, 1992a. Effect of the difference in air temperature between photoperiod and dark period on morphogenesis and growth of potato plantlets in vitro under photoautotrophic and CO₂ enriched conditions. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 61:93-98.
16. Kozai, T., K. Fujiwara, M. Hauashi, and J. Aitken-Christe, 1992b. The in vitro environment and its control in micropropagation. pp. 247-282. In: *Transplant Production System* (K. Kurata and T. Kozai, Eds). Kluwer Academic Publishers.
17. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
18. 이용범, 이병일. 1994. CO₂ 장기 사용이 토마토의 엽온, 확산저항 및 광합성에 미치는 영향. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 35:421-428.
19. 이은주. 1998. Study of the Autotrophic Culture of *Limonium* spp. cv. Misty Blue. 경상대학교 석사학위논문. p. 26-27.

스타티스 ‘오션 블루’의 자가영양배양시 광도, 환기횟수 및 CO₂ 농도가 소식물체의 기내 생육에 미치는 영향

정기원¹ · 정병룡^{1,2*}

¹경상대학교 응용생명과학부, ²경상대학교 농업생명과학연구원

적 요

자가영양배양시 광도, 환기횟수 및 CO₂ 농도가 스타티스 ‘Ocean Blue’ 소식물체의 생장에 미치는 영향을 조사하였다. MS 배지에서 광혼합영양배양을 통하여 증식된 스타티스 식물체에서 2~3장의 잎을 가진 줄기 절편체를 채취하여 배양용기당 4개씩 치상하였다. 절편체는 온도 25±1°C. 상대습도 70~80%인 배양실에서 cool-white 형광램프로 명기동안 70, 150, 또는 220 μmol·m⁻²·s⁻¹의 광을 공급하면서 41일 동안 배양하였다. MS 기본배지를 사용하였으며, sucrose와 vitamin은 첨가하지 않았다. 광도가 높아질수록 생체중, 건물중 및 엽면적이 증가하였다. CO₂ 농도를 높여준 경우 초장, 생체중, 건물중 및 엽면적이 증가하였다. 뿌리길이와 엽록소 농도는 광도나 CO₂의 영향을 받지 않았다. 배양용기 내의 환기횟수를 높이고, 고광도의 CO₂를 공급할수록, 그리고 PPF를 증가시킬수록 스타티스 소식물체의 자가영양배양에서의 생육이 촉진되었다.

주제어 : 미세증식, 배양환경, 광도, 통기