

광독립영양 기내 미세증식 시스템에서 생육단계별 환경조절을 통한 감자의 기내 및 기외 생육과 에너지 효율 향상

오명민¹ · 이 훈² · 손정익^{2*}

¹캔자스주립대 원예학과, ²서울대학교 식물생산과학부 및 농업생명과학연구원

Improvement of Growth of Potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Dejima) Plants at *In Vitro* and *Ex Vitro* and Energy Efficiency by Environmental Control with Growth Stage in Photoautotrophic Micropropagation System

Myung-Min Oh¹, Hoon Lee², and Jung Eek Son^{2*}

¹Department of Horticultural Science, Kansas State University, Manhattan, KS 66503, USA

²Department of Plant Science and Research Institute for Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul 151-921, Republic of Korea

Abstract. This study was conducted to evaluate the effect of optimized environment conditions with growth stage in photoautotrophic micropropagation on the growth of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Dejima) plantlets and energy efficiency. Optimum environment conditions at each stage were decided in our previous study. For the evaluation of optimized environment control, potato plantlets were cultured under four different conditions: photoautotrophic optimum conditions of photosynthetic photon flux density (PPFD) and CO₂ levels with growth stage (POG), photoautotrophic constant condition with average PPFD and CO₂ levels (PCA), photoautotrophic constant condition with maximum PPFD and CO₂ levels (PCM), and photomixotrophic conventional condition with 3% sucrose (PMC) as control. As a result, environment control with growth stage (POG) significantly promoted all the growth characteristics such as the number of nodes and unfolded leaves, shoot height, shoot diameter, and fresh and dry weights of potato grown *in vitro*. In addition, based on dry weight consumed electricity and CO₂ were the lowest in POG suggesting the highest energy efficiency among the treatments. After transferring potato plantlets to greenhouse, the plantlets under POG showed vigorous growth, which was pretty similar with those under PMC. The accumulations of dry matter in POG were 4.7 times *in vitro* and 3.8 times in greenhouse as much as those in the conventional control (PCM). Thus, we concluded that *in vitro* environment control with growth stage induced vigorous growth of potato plantlets both *in vitro* and in greenhouse with less energy consumption.

Key words : CO₂, photoautotrophic, photomixotrophic, PPFD

서 언

전세계 중요한 식량 자원 중 하나로서 감자는 번식의 특성상 바이러스나 병원체에 쉽게 노출되기 때문에, 그로 인한 생산량 감소가 큰 문제로 대두되었다 (Weidemann, 1988). 조직 배양 기술은 무균의 묘를

생산 가능케 함으로, 감자를 이용한 관련 연구들이 활발히 이뤄졌다(Amirouche 등, 1985; Karp 등, 1989). 특히 최근 조직배양 기술을 기반으로 한 대량 번식 방법은 무균의 건강한 묘 생산을 가능케 하였다(Kozai 등, 1997a; Zobayed 등, 2004).

기존 대부분의 미세증식에 관한 연구는 배양되는 용기의 물리적 환경 요소나 특성 보다는, 배지의 화학적 구성 성분이나 특성을 중심으로 이루어졌다(Kozai 등, 1997b). 왜냐하면 대부분의 과학자들은 기내에 배양될

*Corresponding author: sjeenv@sun.ac.kr, saka131@hanmail.net
Received February 10, 2009; Revised March 10, 2009
Accepted March 17, 2009

외식체는 온전한 식물체와는 달리 부가적인 에너지원(당)을 배지를 통해 공급해 주어야 한다고 생각했기 때문이다. 하지만 엽록체를 갖은 식물체는 외식체라 할지라도 광합성을 통해 독립적으로 양분을 만들 수 있다는 사실이 밝혀지면서(Kozai 등, 1988; Pruski 등, 2002), 배양기 내의 환경 조절에도 관심이 모아지기 시작했다. 또한 밀폐된 공간에서 한정된 탄소원을 사용했던 기존의 배양방법은 비정상적인 식물 생육을 유도함으로써, 균일한 묘의 생산을 어렵게 했다(Aitken-Christie 등, 1995; Jeong 등, 1995).

기존의 수많은 연구들은 광독립 영양변식을 통한 대량 증식 체계에 여러 가지 환경 요소들(온도, 광, CO₂, 환기 등)이 식물체의 생육에 커다란 영향을 미친다는 사실을 보고하였다(Kitaya 등, 2005; Kozai 등, 1997a; Zobayed 등, 2004; Son 등, 2009). 한편, 미세증식을 이용한 대량 번식방법이 실제 산업에 이용되기 위해서는 경제적인 측면을 고려할 수 밖에 없다(Kozai, 1991a; Seabrook, 2005). 하지만 아직까지는 에너지 효율적인 측면에서 이 한계를 극복할 수 있는 뚜렷한 대안을 찾지 못한 실정이다.

이전에 수행된 연구(Son 등, 2009)에서, 우리는 기존 미세증식 배양의 확실적인 환경 조건 대신, 감자의 미세증식 과정을 3단계로 나누고, 각 생육 단계에 적합한 환경 조건을 결정하였다. 따라서 본 연구에서는 이런 단계별 환경 조절이 기존의 미세증식방법과 비교했을 때 생육증진과 에너지절감에 어떠한 효과가 있는지 확인해 보았다.

재료 및 방법

1. 식물재료 및 배양조건

감자(*Solanum tuberosum* L. cv. Dejima)는 파이토젤(2 g·L⁻¹)이 함유된 MS배지(Murashige와 Skoog, 1962)에서 광혼합 영양 상태 (30 g·L⁻¹의 당 포함)로 30일간 계대배양 하였다. 그 후 잎이 달린 외마디 감자 외식체를 줄기 끝으로부터 3번째나 5번째 마디에서 채취하여 이를 370 mL의 마젠타 용기(GA 7, Sigma Co Ltd., USA)에서 배양하였다. 밀폐된 배양용기 뚜껑 위의 3개의 구멍(직경 10 mm)에 설치된 미세필터(Milliseal, Millipore: pore size 0.5 mm, Japan)를 통하여 기체가 이동 가능하였으며, 환기수는 Kozai 등

(1986)에서 기술한 방법처럼 6.2 h⁻¹이었다. 광의 반사나 흡수에 의한 광원 손실을 우려해서 OPP 필름을 배양용기 뚜껑으로 사용하였다. 폴리우레탄 큐브(90 cm³)를 지지 재료로 사용하였으며, 대조군(3% 당 함유 MS배지 사용)을 제외한 처리군의 경우 비타민과 당이 포함되지 않은 MS배지(M0221, Duchefa Co Ltd., Netherlands)를 사용하여 광독립 영양 조건에서 감자 소식물체를 배양하였다.

2. 생육단계별 환경 조절을 통한 생육과 제어 효율(기내)

4개의 아크릴 챔버(40×60×30 cm)로 구성된 미세 증식 시스템은 서울대 실험 농장에 위치한 컨테이너(6×3×2.5 m)에 설치되었다. 시스템 제어와 데이터 수집을 위해서 데이터 수집기(CR10X, Campbell Co Ltd., USA), 멀티플렉서(AM416, Campbell Co Ltd., USA), 그리고 제어기(SDM-CD16AC, Campbell Co Ltd., USA)가 설치되었다. 비분산 적외선 CO₂ 분석기(WMA-3, PP systems Co Ltd., UK)를 통해서 챔버에서 유출되는 공기의 CO₂ 농도를 측정하고, CO₂ 가스는 유입관을 통해서 공급되었다. 정확한 CO₂ 제어를 위해서 비례 제어 방식을 사용하였고, 1000 μmol·mol⁻¹ 기준 CO₂ 제어편차는 39 μmol·mol⁻¹였다. 또한 균일한 PPF의 분산을 위해서 직선형 형광 램프를 사용하였고, 160 μmol·m⁻²·s⁻¹ 기준 PPF 편차는 4.5 μmol·m⁻²·s⁻¹였다.

이전 실험에서 결정된 생육 단계별 최적 환경조건이 감자 소식물체의 생육과 에너지 절감에 미치는 영향을 알아보기 위한 4가지 처리는 다음과 같았다: 생육 단계별 최적 환경 조건을 사용한 광독립 영양배양(photoautotrophic optimum condition with growth stage(POG)), 생육 단계별 평균 광합성 광량자속 밀도(photosynthetic photon flux density(PPFD))와 CO₂ 농도를 사용한 광독립 영양배양(photoautotrophic constant condition with average PPF and CO₂ of POG(PCA)), 생육 단계별 최대 PPF와 CO₂ 농도를 사용한 광독립 영양배양(photoautotrophic constant condition with maximum PPF and CO₂ of POG(PCM)) 그리고 3%의 당을 포함한 광혼합 영양배양(photomixotrophic conventional condition with 3% sucrose(PMC))(Table 1). 기내 배양 20일 후에 각 처

Table 1. Description of treatments for evaluation of optimized environment control.

Treatment ^z	PPFD (mol·m ⁻² ·s ⁻¹)	CO ₂ (mol·mol ⁻¹)
POG	1 st	80
	2 nd	160
	3 rd	320
PCA	191	1020
PCM	320	1800
PMC	80	350

^zPOG=Photoautotrophic optimum conditions of PPFD and CO₂ levels with growth stages; PCA=Photoautotrophic constant condition with average PPFD and CO₂ levels; PCM =Photoautotrophic constant condition with maximum PPFD and CO₂ levels; and PMC=Photomixotrophic conventional condition (with 3% sucrose).

리당 20개의 소식물체는 측정 사용되었다. 측정 항목은 마디 수, 전개된 엽수, 지상부 직경 및 초장, 생체중, 건물중이었다. 처리간 에너지 효율을 비교하고자 사용전력(watt-hour(Wh))과 CO₂ 소비량을 기록하였다. 이를 이용하여 단위 건물중 당 소비전력 및 사용된 CO₂의 양을 계산하였다.

3. 생육단계별 환경 조절을 통한 생육(기외)

기내에서 20일간 배양된 감자 소식물체는 순화과정 없이 서울대 부속 농장에 위치한 유리 온실로 옮겨져 22일간 재배되었다. 광독립 영양배양 환경에서 자란 소식물체들(POG, PCA, PCM)은 그대로 피트모스 배지에 옮겨졌으며, 광혼합 영양배양에서 자란 소식물체들(PMC)은 파이토젤을 수도물로 제거한 뒤 배지에 옮겨졌다. 일본 원에 시험장 양액(1.2 m·Scm⁻¹)을 하루 4

회(회당 70 mL) 점적 관수 방법으로 배지에 공급하였다. 처리당 20개체를 사용하여 전개 엽수와 줄기 직경을 이식 후 15일까지 측정하였고, 추가적으로 마디 수, 전개 엽수, 초장, 줄기 직경, 건물중을 22일째 측정하였다. 실험기간 동안 적산일사량은 2.6 molday⁻¹였으며, 평균온도는 21.5±4°C로 유지 되었다.

결과 및 고찰

1. 생육단계별 환경 조절을 통한 생육과 제어 효율(기내)

생육 단계별 환경 조절은 다른 처리와 비교했을 때 감자 소식물체의 생육에 유의적 차이를 유도하였다(Table 2). 전체적으로 광독립 영양배양(POG, PCA, PCM)이 광혼합 영양배양(PMC)보다 월등히 우량한 감자 묘를 생산하였다. 이 결과는 기존 다른 실험 결과들과 일치하였다(Kozai 등, 1991b; Zobayed 등, 1999; Xiao와 Kozai, 2004). 광독립 영양배양 처리 중에서 POG는 PCA보다 모든 측정항목에서 유의적으로 높은 수치를 보였다. 또한 가장 높은 PPFD와 CO₂ 농도를 유지한 PCM과 비교했을 때 POG는 줄기 직경을 제외하곤 모든 생육에서 유의적 차이가 없었다. 이 결과는 생육 단계별로 PPFD와 CO₂ 농도를 잘 조절한다면, 많은 에너지를 소모하지 않고도 식물체의 생육을 증대시킬 수 있음을 의미한다. 실제로 소비된 전력량과 CO₂ 양을 분석해 본 결과 예상대로 PCM에서 재배 기간 동안 가장 많은 전력량과 CO₂ 가 소비되었다(Fig. 1). 또한 배양방식 특성상 PMC가 가장 낮은 소비 전력과 CO₂ 소비량을 기록했지만(Fig. 1A), 단위 건물중 당 소비 전력과 CO₂ 소비량을 기준으로 비교했을

Table 2. Growth characteristics of potato plantlets under POG, PCA, PCM, and PMC treatments at the end of the *in vitro* culture.

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

^zPOG=Photoautotrophic optimum conditions of PPFD and CO₂ levels with growth stages; PCA=Photoautotrophic constant condition with average PPFD and CO₂ levels; PCM=Photoautotrophic constant condition with maximum PPFD and CO₂ levels; and PMC=Photomixotrophic conventional condition (with 3% sucrose).

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

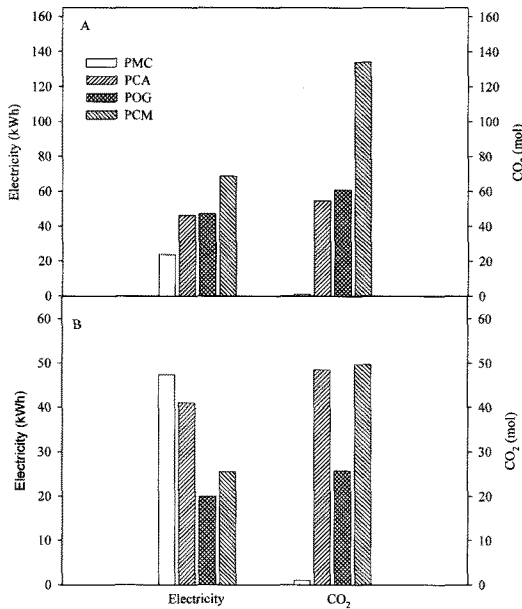


Fig. 1. Consumed electricity for lighting and CO₂ (A) and consumed electricity for lighting and CO₂ per dry weight (B) under POG, PCA, PCM, and PMC treatments. POG=Photoautotrophic optimum conditions of PPFD and CO₂ levels with growth stages; PCA=Photoautotrophic constant condition with average PPFD and CO₂ levels; PCM=Photoautotrophic constant condition with maximum PPFD and CO₂ levels; and PMC=Photomixotrophic conventional condition (with 3% sucrose).

때, POG가 단연 가장 경제적인 배양방법으로 나타났다(Fig. 1B). PCM에 재배된 감자 소식물체의 경우 재배 전기간 동안 강광에 노출되어 그로 인한 스트레스 증상들을 전개된 잎들에서 쉽게 발견할 수 있었다. 이는 가시광선과 더불어 인공광에 포함된 자외선의 영향으로 판단된다(Niyogi, 1999; Smimoff, 1998). 따라서 기내환경에서 각각의 생육 단계가 요구하는 PPFD와 CO₂ 농도 조절은 감자 소식물체를 광독립 영양배양법으로 대량 증식하는데 매우 효과적이었다.

2. 생육단계별 환경 조절을 통한 생육(기외)

기외 이식 후에 약 3주간 감자 소식물체의 생육을 관찰했다(Table 3). 기내 배양에서도 가장 좋은 생육을 보였던 PCM이 기외에서도 왕성한 생육을 나타냈다. POG역시 마디수나 초장에서 PCM에서 자란 감자 묘와 유의적 차이 없이 비교적 좋은 생장률을 보였다. PCA경우 POG와 유의적 차이는 없었으나, 전체적으로 모든 항목에서 POG보다 낮은 수치를 기록했다. 기내

Table 3. Growth characteristics of potato plants after 22 days of transplanting to greenhouse.

Treatment ^z	No. of nodes	Shoot height (cm)	Dry weight (mg/plantlet)
POG	13.13 a ^y	28.70 ab	229.13 b
PCA	11.73 a	26.54 b	160.91 b
PCM	12.80 a	31.36 a	364.40 a
PMC	9.33 b	17.35 c	59.53 c

^zPOG=Photoautotrophic optimum condition with growth stages; PCA=Photoautotrophic constant condition with average PPFD and CO₂ of POG; PCM=Photoautotrophic constant condition with maximum PPFD and CO₂ of POG; PMC= Photomixotrophic conventional condition (with 3% sucrose).
^yMean separation within columns by LSD test at 5% level.

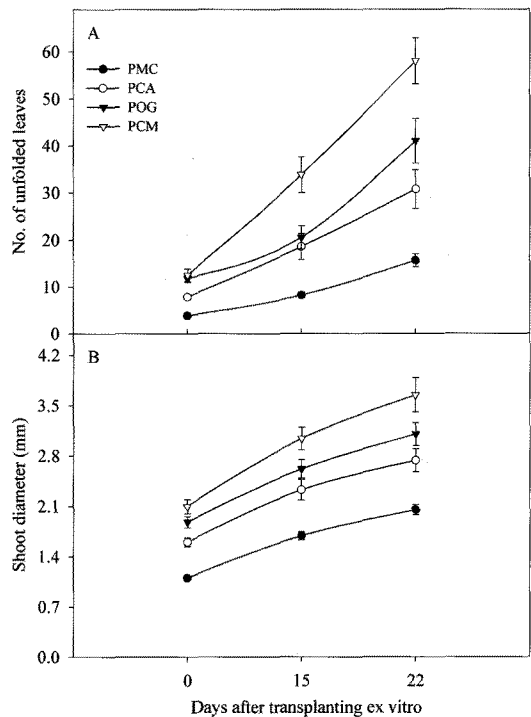


Fig. 2. Changes of unfolded leaves (A) and shoot diameter (B) with time courses after transplanting to greenhouse. Vertical bars represent SE of the means. POG= Photoautotrophic optimum conditions of PPFD and CO₂ levels with growth stages; PCA=Photoautotrophic constant condition with average PPFD and CO₂ levels; PCM= Photoautotrophic constant condition with maximum PPFD and CO₂ levels; and PMC=Photomixotrophic conventional condition (with 3% sucrose).

에서 가장 빈약한 생장을 보였던 PMC는 기외 환경에도 가장 부진한 생육을 보였다. POG에서 자란 감자

는 PMC에서 자란 감자에 비해 거의 이식전과 이식 후 20일째 각각 4.7배와 3.8배 높은 건물중을 기록하였다. PMC에서 자란 감자는 전개 엽수와 줄기 직경에서도 다른 처리들에서 자란 감자에 비해 지속적으로 현저히 저조한 수치를 보였다(Fig. 2). 이런 현상의 원인은 서론에서 언급한 바와 같이 광혼합 영양 기내 환경특성에 따른 저조한 생육 뿐만 아니라(Aitken-Christie 등, 1995; Jeong 등, 1995), 광혼합 영양 기내환경과는 다른 기외 환경에 갑자기 노출됨에 따른 스트레스도 또 하나의 중요한 원인으로 생각될 수 있다(Oh 등, 2009; Pospisilova 등, 1999). 감자 소식물체의 초기의 생장은 최종 이용물인 감자의 괴경형성을 결정하는 주요한 요소인 광합성속도에 지대한 영향을 미친다는 점에서 아주 중요하다. 따라서 생육 단계에 따라서 적절한 환경 조절을 통해 감자 소식물체의 초기 생장을 최대한 이끌어 내는 것이 필요하다. 더불어 실제적이고 경제적인 측면까지 생각한다면, POG와 같은 생육 단계별 환경 조절을 통한 광독립 영양 미세 증식 방법은 앞으로 식물 조직 배양분야에서 이용될 수 있는 잠재력 있는 기술로 생각된다.

적 요

이전 실험에서 결정된 생육 단계별 최적 환경조건을 평가하기 위한 4가지 처리는 다음과 같았다: 생육 단계별 최적 환경 조건을 사용한 광독립 영양배양(photoautotrophic optimum condition with growth stage (POG)), 생육 단계별 평균 광합성 광량자속 밀도(photosynthetic photon flux density(PPFD))와 CO₂ 농도를 사용한 광독립 영양배양(photoautotrophic constant condition with average PPF and CO₂ of POG(PCA)), 생육 단계별 최대 PPF and CO₂ 농도를 사용한 광독립 영양배양(photoautotrophic constant condition with maximum PPF and CO₂ of POG (PCM)) 그리고 대조군으로 3%의 당을 포함한 광혼합 영양배양(photomixotrophic conventional condition with 3% sucrose(PMC)). 실험 결과 각 생육 단계별 환경 제어(POG)는 기내에서 배양된 감자 소식물체의 모든 생육 관련 항목에서 유의적 증진을 유도하였다. 또한 단위 건물중 당 소비된 전력과 CO₂는 모든 처리 중 POG에서 가장 낮았다. 기외 이식 이후에도 POG에서

생산된 감자 묘는 PMC에서 자란 감자 묘와 전체적으로 큰 차이 없이 왕성한 생육을 유지하였다. 특히 POG는 기존 광혼합 영양방식(PCM)과 비교했을 때 기외 이식전과 이식 후 20일째 각각 4.7배와 3.8배 높은 건물중을 기록하였다. 따라서 POG와 같은 생육 단계별 환경 조절을 통한 광독립 영양 미세 증식 방법은 에너지 절감 효과와 함께 무균의 건강한 감자 묘의 생산에 효과적이었다.

주제어 : 광독립 영양, 광합성 광량자속 밀도, 광혼합 영양, 이산화탄소

사 사

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

1. Aitken-Christie J., T. Kozai, and M.A.L. Smith, 1995. Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture. (500p). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
2. Amirouche, L., T. Stuchbury, and S. Matthews. 1985. Comparisons of cultivar performance on different nutrient media in a routine method for potato micropropagation. Potato Res. 28:469-477.
3. Jeong, B.R., K. Fujiwara, and T. Kozai. 1995. Environmental control and photoautotrophic micropropagation. p. 123-170. In: Janick, J. (ed.). Horticultural Reviews. Vol 17. AVI Publishing Co. Inc, Westport.
4. Karp, A., M.G.K. Jones, D. Foulger, N. Fish, and S.W.J. Bright. 1989. Variability in potato tissue culture. Amer. J. Potato Res. 66:669-684.
5. Kitaya, Y., Y. Ohmura, C. Kubota, and T. Kozai. 2005. Manipulation of the culture environment on *in vitro* air movement and its impact on plantlets photosynthesis. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 83: 251-257.
6. Kozai, T., K. Fujiwara, and I. Watanabe. 1986. Fundamental studies of environments in plant tissue vessels (2). Effects of stoppers and vessels on gas exchange rates between inside and outside of vessels closed with stoppers. J. Agric. Meteorol. 42:119-127.
7. Kozai, T., Y. Koyama, and I. Watanabe. 1988. Multiplication of potato plantlets *in vitro* with sugar-free medium under high photosynthetic photon flux. Acta Hort. (Wageningen) 230:121-127.
8. Kozai, T. 1991a. Micropropagation under photoau-

- trophic conditions. P.C. p. 447-469. In: Debergh and R.H. Zimmerman (eds.). Micropropagation: technique and application, Academic Press.
9. Kozai, T., K. Iwabuchi, K. Watanabe, and I. Watanabe. 1991b. 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.
 10. Kozai, T., C. Kubota, and B. R. Jeong. 1997a. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 51:49-56.
 11. Kozai, T., N.T. Quynh, and C. Kubota. 1997b. Environmental control and its effects in transplant production under artificial light. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 38:194-199.
 12. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
 13. Niyogi, K.K. 1999. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:333-359.
 14. Oh, M.-M., H. N. Trick, and C. B. Rajashekar. 2009. Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. *J. Plant Physiol.* 166:180-191.
 15. Pospisilova, J., I. Ticha, P. Kadlec, D. Haisel, and S. Plzakova. 1999. Acclimatization of micropropagated plant to *ex vitro* conditions. *Biol. Planta* 42:481-497.
 16. Pruski, K, T. Astatkie, M. Mirza, and J. Nowak. 2002. Photoautotrophic micropropagation of Russet Burbank potato. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 69:197-200.
 17. Seabrook, J.E.A. 2005. Light Effects on the Growth and Morphogenesis of Potato (*Solanum tuberosum*) *In Vitro*: A Review. *Amer. J. Potato Res.* 82:353-367.
 18. Smirnoff, N. 1998. Plant resistance to environmental stress. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:214-219.
 19. Son, J.E., H. Lee, and M.-M. Oh. 2009. Growth of potato plantlet (*Solanum tuberosum* L. cv. Dejima) in photoautotrophic micropropagation system at different light intensities and CO₂ concentrations and decision of optimum environment conditions with growth stage by modelling. *J. Bio-environ. Control* 18 (in press).
 20. Weidemann, H.L. 1988. Importance and control of potato virus yN (pvyy) in seed potato production. *Potato Res.* 31:85-94.
 21. Xiao, Y. and T. Kozai. 2004. Commercial application of a photoautotrophic micropropagation system using large vessels with forced ventilation: plant growth and production cost. *HortScience* 39:1387-1391.
 22. Zabayed, S.M.A., F. Afreen-Zabayed, C. Kubota, and T. Kozai. 1999. Stomatal characteristics and leaf anatomy of potato plantlets cultured in vitro under photoautotrophic and photomixotrophic conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 35:183-188.