



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

博士學位論文

조직배양을 이용한 멸종위기식물
흰뺨딸기(*Fragaria nipponica* Makino)의
대량증식 방법연구

A Study on the Mass Propagation of Endangered Plant
Fragaria nipponica Using Plant Tissue Culture

濟州大學校 大學院

農學科

金 兌 根

2018年 2月

조직배양을 이용한 멸종위기식물
흰맛딸기(*Fragaria nipponica* Makino)의
대량증식 방법연구

指導教授 宋 昌 吉

金 兌 根

이 論文을 農學 博士學位 論文으로 提出함

2017年 12月

金兌根의 農學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長 (印)

委 員 (印)

委 員 (印)

委 員 (印)

委 員 (印)

濟州大學校 大學院

2017年 12月

목 차

List of Tables	iv
List of Figures	vi
ABSTRACT	vii
I. 서 언	1
II. 연구 사	4
III. 재료 및 방법	11
1. 자생지 환경 조사	11
1) 자생지 온·습도	11
2) 자생지 토양환경 조사	11
(1) 토양 물리성 분석	13
(2) 토양 화학성 분석	13
3) 자생지 조사	14
2. 흰뚨딸기의 총 페놀, 플라보노이드 및 DPPH Radical 소거활성	15
1) 추출물의 제조	15
2) 총 폴리페놀 함량 측정	15
3) 총 플라보노이드 함량 측정	15
4) DPPH Radical 소거활성 측정	16
3. 흰뚨딸기의 기내 배양을 위한 기초연구	16
1) 흰뚨딸기의 종자 발아 조사	16
2) 효율적인 기내배양을 위한 배지의 적정 조건	17

4. 배양 방법별 흰뚨딸기의 기내 증식	18
5. Bioreactor를 이용한 흰뚨딸기의 기내 대량증식	19
1) Bioreactor 배양 조건	19
2) 질소질	19
3) Sucrose	20
4) BA	20
5) 공기주입량	20
6) 배양기간	21
IV. 결과 및 고찰	22
1. 자생지 환경 조사	22
1) 자생지 온·습도	22
2) 자생지 토양환경 조사	28
(1) 토양의 물리적 특성	28
(2) 토양의 화학적 특성	31
3) 자생지 식생 조사	34
4) 엽록소 함량 조사	40
2. 흰뚨딸기의 총 폴리페놀, 플라보노이드 및 DPPH radical 소거활성	42
1) 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량	42
2) DPPH radical 소거활성	43
3. 흰뚨딸기의 기내 배양을 위한 기초연구	45
1) 흰뚨딸기의 종자 발아 조사	45
2) 효율적인 기내배양을 위한 배지의 적정 조건	46
(1) 배지 종류	46
(2) 배지 농도	49
(3) Sucrose	51

4. 배양 방법별 흰뚨딸기의 기내 증식	54
5. Bioreactor를 이용한 흰뚨딸기의 기내 대량증식	58
1) 질소질	58
2) Sucrose	61
3) BA	64
4) 공기주입량	67
5) 배양기간	70
V. 종합고찰	72
VI. 적요	80
VII. 인용문헌	82
감사의 글	102

List of Tables

Table 1.	Elevation and coordinates of soil sampling plots	13
Table 2.	Comparison of the nitrate contents in MS, Gamborg B5, and White culture mediums	18
Table 3.	Comparison of the nitrate contents of MS culture medium according to nitrate concentration	20
Table 4.	Air temperature(°C) and humidity(%) at the elevation of 1,600 m of Mt. Halla	26
Table 5.	Air temperature(°C) and humidity(%) at the elevation of 1,800 m of Mt. Halla	27
Table 6.	Physical properties of the soil around <i>F. nipponica</i>	30
Table 7.	Chemical properties of the soil around <i>F. nipponica</i>	33
Table 8.	Number of yearly climbers of Mt. Halla	39
Table 9.	Comparison of the SPAD-502 value of <i>F. nipponica</i> in height by altitude and date	42
Table 10.	Total phenol and flavonoid contents of methanol extracts of <i>F. nipponica</i>	43
Table 11.	Number of seeds per <i>F. nipponica</i> fruit and their diameter and length	45

Tabel 12. Germination ratio and MGT(Mean germination time) of <i>F. nipponca</i>	46
Table 13. Growth characteristics of <i>F. nipponica</i> as affected by different media types	48
Table 14. Growth characteristics of <i>F. nipponica</i> as affected by MS medium concentration	50
Table 15. Growth characteristics of <i>F. nipponica</i> as affected by sucrose concentration	53
Table 16. Growth characteristics of <i>F. nipponica</i> as affected by culture method	56
Table 17. Growth characteristics of <i>F. nipponica</i> as affected by MS medium concentration in bioreactor	60
Table 18. Growth characteristics of <i>F. nipponica</i> as affected by sucrose concentration in bioreactor	63
Table 19. Growth characteristics of <i>F. nipponica</i> as affected by BA concentration in bioreactor	65
Table 20. Growth characteristics of <i>F. nipponica</i> as affected by aeration rate in bioreactor	69
Table 21. Growth characteristics of <i>F. nipponica</i> as affected by culture period in bioreactor	71

List of Figures

Fig. 1. Areas of Mt. Halla soil sampling	12
Fig. 2. Schematic diagram of bioreactor culture system	19
Fig. 3. Average air temperature(°C) of surveyed at four Mt. Halla from 2013 to 2017	24
Fig. 4. Average humidity(%) of Mt. Halla from 2013 to 2017	25
Fig. 5. Soil series of Mt. Halla	34
Fig. 6. <i>F. nipponica</i> . investigation areas(●) on a map	36
Fig. 7. Flower and fruit of <i>F. nipponica</i>	36
Fig. 8. Number of species and species diversity index	38
Fig. 9. <i>F. nipponica</i> natural habitat of Mt. Halla trails.	39
Fig. 10. Comparison of the SPAD-502 value of <i>F. nipponica</i> according to elevation(June and July average).	41
Fig. 11. DPPH radical scavenging activities of organic solvent extract from <i>F. nipponica</i>	44
Fig. 12. Growth of <i>F. nipponica</i> as affected by culture method	57
Fig. 13. Growth of <i>F. nipponica</i> as affected by BA concentration in bioreactor	66

ABSTRACT

The study was implemented in the absence of a study on the endangered plant species of *Fragaria nipponica* Makino with the understanding of the urgent need for the protection of the *F. nipponica* species vulnerable to many visitors to Mount Halla, suppression of *Sasa palmata* (Bean) E.G.Camus, climate change, etc. The purpose of this study is to provide the basic data for inheritance preservation, natural habitat restoration and rendering to resources.

From January, 2013 to September, 2017, the temperature and humidity of each elevation of 1,500m, 1,600m, 1,700m, and 1,800m of Mt. Halla were investigated. As a result, from December to February, all of the altitudes were found to keep below-zero temperatures; and from April, every area kept above-zero temperatures. The aboveground part of *F. nipponica* started to appear, and flower and bear fruit from June to fruit in July until the average temperature was the highest at 17.5°C.

Soil chemical property was implemented for the soil of the natural *F. nipponica* habitat and that of the adjacent non-habitat area. As a result, the soil pH was the highest at pH 5.24 in the Gwaneumsa *F. nipponica* habitat and electrical conductivity was the highest at 1.08 ms/cm in the Eorimok *F. nipponica* habitat region. Organic content in the Eorimok *F. nipponica* habitat was 24.5%, the highest. The Seongpanak *F. nipponica* habitat had the available phosphate content of 28.1mg/kg, approximately 2 times or more higher than that in other regions. The total nitrogen content in the Eorimok *F. nipponica* non-habitat was 0.45%. The replaceable K in the Eorimok *F. nipponica* habitat was 0.24 cmol⁺/kg. The Seongpanak non-habitat was found to have 1.32 of Ca and 0.09 cmol⁺/kg of Mg, the highest. Na of the

Seongpanak habitat was 0.025 cmol⁺/kg, the highest among them.

As a result of Pearson correlation analysis according to SPAD value and altitude, it was found that the altitude and SPAD-502 values had a negative correlation ($r=-0.272$, $p<0.01$) at 1% significance level, indicating that the chlorophyll of *F. nipponica* was closely related with date and altitude.

F. nipponica's runners were collected and their total polyphenol and flavonoid contents were measured. As a result, the total polyphenol content was 70.75 mg·GAE/g, and total flavonoid was 5.93 mg·QE/g. *F. nipponica*'s DPPH radical scavenging activity was measured. It was found that at the concentration level of 500 $\mu\text{l/ml}$ or higher, the DPPH radical scavenging activity was similar to that of the synthetic anti-oxidizer,

After the preconditioning of *F. nipponica* seeds, a total of 96.1% germinated until the 43 day from sowing. In 10 days after sowing, 45.3%; 20 days, 87.3%; and 30 days, 93.4%. The average number of days until germination was 12.81 days.

To find out the optimal culture medium for *in vitro* culture, MS culture medium, Gamborg B5 culture medium and White culture medium were experimented. The MS culture medium showed a lower D/F rate but its plant length, root length, etc. were relatively higher and its amount of growth such as leaf length and leaf width were the largest. The MS culture medium experiment results showed that, the higher the MS culture medium concentration, the fewer the number of roots; the root length was the longest at the base level concentration and grew shorter; and at the MS culture medium base level concentration of 1 time, the D/F ratio was 21.43%, higher than those at other levels of concentration. The sucrose concentration experiment found that the plant length, theca diameter, number of stems and number of leaves showed no big difference according to concentration levels. But the D/F ratio analysis showed that it was 21.43%, the highest at the sucrose 3% concentration level and the theca diameter was the thickest. This

seems to be the most appropriate concentration level for vernalization.

The growth and development characteristics of seedlings germinated under *in vitro* condition were compared according to culture method. It was found that the bioreactor culture had the D/F ratio of 23.63%, higher than other culture methods. So the soil purification of plantlets is expected to be efficient compared with that in other culture methods. At the MS medium culture 1-fold concentration level, the D/F ratio was also found the highest at 1-fold level. The sucrose concentration experiment found that the 3% sucrose had the D/F ratio of 23.63%, indicating that most of the growth amount was larger than that at other concentration levels. As a result of BA concentration level-specific processing, shoot generation was 290% at 0.2 ppm, the largest and the best for shoot generation. This level seems effective for the mass proliferation of *F. nipponica*.

In regard to bioreactor optimal aeration injection amount, the D/F ratio at 0.2 vvm was 23.63%, the highest. The longer the culture period in bioreactor, the larger the growth amount and the D/F ratio also jumped from 8.22% on the 2 week to 23.63% on the 6 week.

Fragaria nipponica Makino also showed germination ratio as high as 96.1% through seed germination. But, for the tissue culture planting production for future mass production, it seems appropriate for short-term mass production to utilize 1-fold MS culture medium at sucrose 3% and BA 0.2ppm; inject 0.2 vvm aeration; and culture for 6 weeks.

I. 서 언

한라산은 북방계 극지고산식물의 세계적 남방 한계선으로서 생물 지리적으로 매우 중요한 지역이다(공, 1988). 하지만 고산식물은 분포 범위가 좁고 이동할 수 있는 범위가 제한되어 있어서 지구 온난화 등의 환경변화는 그 분포에 중요한 요인으로 작용하여 멸종을 야기할 수도 있다(공, 1998). 이러한 환경에서 생육하고 있는 흰뺨딸기는 기후변화와 식생변화 등에 의해 자생지가 위협받고 있다.

국내 장미과의 딸기속은 흰뺨딸기(*Fragaria nipponica* Makino)와 딸딸기(*F. yezoensis* H. Hara) 2종이 자생하며(이, 1996; 이, 2014), 산림청 국립수목원(2008)은 흰뺨딸기를 국가단위 멸종위기종(Critically endangered species, CR)으로 선정하였고, 제주도 고산지역에 매우 드물게 자라며, 개체수도 매우 적어 자생지 확인 및 유전자원의 현지 내·외 보전이 필요하다고 하였다. 흰뺨딸기는 현재 인위적인 요인과 자연적인 요인이 복합적으로 작용하여 자생지가 위협받고 있다.

자생지 위협의 인위적인 요인으로 탐방객의 급증이 탐방로 주변 식생을 위협하고 있는데, 흰뺨딸기가 자생하는 한라산은 1970년 3월 24일에 국립공원으로 지정되었으며, 2007년에는 유네스코 세계자연유산으로 등재되었다. 국립공원 무료입장이 실시된 2007년 이후 탐방객이 급증하여 연간 100만명 이상이 방문하고 있다. 이러한 단기간에 걸친 탐방객의 급증은 백록담 화구륜 일대와 주요 탐방로를 따라 심각하게 훼손되고 있는데, 조사결과에 의하면 총 침식량은 약 62,000m³에 달한다(우, 1986; 오와 허, 1992; 오, 1996).

자연적인 요인 중 생태적 관점에서 김(2009)은 한라산 아고산대에 분포하는 제주조릿대의 군반 면적에 대한 연간변화를 분석한 결과, 매년 제주조릿대의 군반 크기가 점차 증가하여 한라산에서 제주조릿대의 우점도가 매우 높은 주요 하층식생으로 자리 잡고 있다고 하였고 또한 제주조릿대의 밀도 증가에 따른 피압, 기온, 습도, 토양 등 생육환경의 변화와 제주조릿대가 하부 식생에 대해 allelopathy 효과를 보임으로 한라산에서 제주조릿대가 우점하는 주요 요인으로

보고하였다. 이러한 한라산 제주조릿대의 군반 면적 증가는 고산지대 나지에 분포하는 흰뺨딸기의 자생지를 위협하고 있다.

IPCC 제4차 보고서에 따르면 지구의 온도가 1.5~2.5℃ 상승하면 동·식물의 20~30%가 멸종하고 지리적 분포 범위가 크게 변하는 등 생물다양성과 생태계에 되돌릴 수 없는 영향을 미치게 된다(국립기상연구소, 2009). 기후변화에 따른 기온 상승과 강수량 변화는 현재의 자연환경에 적응해온 생물과 생태계에 다양한 영향을 미치게 되며, 앞으로 100년 동안 중위도 지방에서 평균기온이 1℃ 상승하면 기후대는 북으로 약 150 km, 산의 위쪽으로 150 m 이동하여야 한다(공 등, 2014). 이러한 식생의 이동은 해발 1,950m인 한라산 정상 부근에 자생하는 암매와 해발 1,800m에 자생하는 흰뺨딸기의 경우 더 이상 이동할 곳이 없어지게 된다. 특히, 지구 온난화는 극지와 고산 등 한랭한 기후에 적응하여 살아온 생물들에게 기온 상승은 결정적인 피해를 준다(공 등, 2011).

우리나라의 고산 또는 아고산에 분포하는 식물은 과거 기후변화에 따라 북방에서 한반도로 이동해온 빙하기의 잔존종(殘存種) 또는 유존종(遺存種)으로서 신생대 제4기 플라이스토세(Pleistocene) 빙하기때 북방에서 도래했던 빙하기의 유존종으로 자연환경 변천사를 복원하는데 귀중한 자연 유산이며, 서식지가 파괴되면 복원 및 복구가 힘들뿐 아니라 멸종의 위험성을 가지고 있다(공, 2005; 공 등, 2014).

흰뺨딸기는 *Fragaria*속의 2배체 식물($2n=2x=14$)(Scott, 1951; Staudt and Olbricht, 2008; Yang and Davis, 2017)로서 교잡 육종을 하면 8배체인 재배종 딸기에 비해 안정적인 생산이 가능할 것으로 생각되며, 식물조직배양은 식물의 세포 및 기관을 연중 균일하게 대량생산하는 가장 보편적인 방법이며(Lee et al., 2008), 희귀 및 멸종위기식물에 대한 번식방법 연구도 꾸준히 보고되고 있다. 국내에서는 미선나무(문 등, 1999), 피뿌리풀(한 등, 2004), 개느삼(문과 김, 2008), 자란(배 등, 2012), 주걱비름(고 등, 2013), 둥근잎평의비름(배 등, 2014) 등의 기내번식 연구가 수행되었으며, 외국에서도 조직배양을 이용한 희귀 및 멸종위기 식물의 번식연구가 계속되고 있다(Lee, 1985; Rai, 2002; Gomes et al., 2003; Faisal et al., 2007).

대부분의 조직배양에 이용되고 있는 고체배양은 많은 수의 배양용기와 노동력

이 필요하고 그 결과 낮은 증식효율과 높은 생산비용이 중요한 문제로 대두되고 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 로봇식 배양, 광독립영양 배양 및 bioreactor 기술을 이용하기 시작하였다(Takayama, 1991). 특히, 기존 조직배양의 단점을 보완한 bioreactor 배양은 액체배지에 bioreactor 내부로 적정수준의 공기를 꾸준히 공급하며 세포, 조직, 기관 및 식물체를 배양하는 방식으로 배양체의 성장량을 크게 촉진시킬 수 있으며 대량화가 가능하다(Paek et al., 2001). 최근 약용식물의 세포, 체세포배, 부정근 등의 식물조직을 bioreactor를 이용하여 생리 활성물질을 생산하려는 연구가 활발하게 진행되고 있으나, 성공적인 bioreactor 배양을 위해서는 대상 식물의 종류, 배양체의 형태, 배양 목적 등에 따라 다양한 배양환경의 최적화가 필요하다(Murthy et al., 2008).

따라서 본 연구는 국내 흰땃딸기에 대한 연구가 전무한 실정이고, 제주조릿대의 피압, 기후변화 등에 취약한 흰땃딸기에 대한 현지의 보존의 한 방법으로 조직배양을 이용하여 본 연구를 수행하게 되었다.

II. 연구사

국내에서는 흰땃딸기에 대한 연구가 전무한 실정이며, 외국의 경우 일본 자생 흰땃딸기를 대상으로 종 분류에 대한 논문과 Genome 관련 논문 이외에는 없는 실정이다(Staudt and Olbricht, 2008; Laura et al., 2014; Hirakawa et al., 2014; Njuguna, 2010; Njuguna et al., 2013; Njuguna et al., 2011; Sargent et al., 2016; Yang and Davis, 2017).

흰땃딸기는 멸종위기식물(Critically endangered, CR)로 지정되어 있으며(수목원·정원의 조성 및 진흥에 관한 법률 시행규칙 별표 1의3), 환경부 국외반출 승인대상 생물자원으로 지정되어 있다. 국외반출 승인대상 생물자원은 생물다양성의 보전을 위하여 보호할 가치가 높은 생물자원으로 환경부장관이 관계 중앙행정기관의 장과 협의하여 지정·고시한 1,971종을 말하며, 식물은 596종이 포함되어 있다(환경부, 2012a).

산림청 국립수목원(2008)은 야생멸종(Extinct in the wild, EW) 4종, 멸종위기종(Critically endangered species, CR) 144종, 위기종(Endangered species, EN) 122종, 취약종(Vulnerable species, VU) 119종, 약관심종(Least concerned, LC) 70종, 자료부족종(Data deficient, DD) 122종을 선정하였으며, 이중 흰땃딸기를 국가단위 멸종위기종으로 선정하였고, 제주도 고산지에 매우 드물게 자라며, 개체수도 매우 적어 자생지 확인 및 유전자원의 현지 내·외 보전이 필요하다고 하였다. 국립생물자원관(2012)은 흰땃딸기를 관심대상(Least concern, LC)종으로 선정하였으며, 선정 이유로 강원과 제주에 분포하는 것으로 알려져 있으나 강원에서 확인되지 않았고, 제주 한라산 등 고산지대에서 자라고 있으며 제주도 식물만을 대상으로 평가하여 멸종위기 평가에서 누락되었다고 하였다.

그리고 환경부(2012b)는 흰땃딸기를 식물구계학적 특정 식물종 V등급으로 지정하였는데, 식물구계학적 특정식물종은 한반도에서 자생하는 관속식물로 멸종위기에 처해 있거나 급속히 감소될 우려가 있어 우선적으로 보전대상이 되는 식물을 말한다. 식물구계학적 특정식물이란 식물상을 통해 한반도의 다양한 자연환경

을 이해할 수 있는 자료라 할 수 있다(환경부, 2007). 이들은 5개의 등급으로 구분되는데, V등급의 식물군은 고립 혹은 불연속적으로 분포하는 특성을 가지고 있는 식물, IV등급의 식물군은 4개의 아구(제주아구, 남해안아구, 남부아구, 중부아구) 중 1개의 아구에만 분포하는 특성을 가진 식물, III등급의 식물군은 4개의 아구중 2개의 아구에 분포하는 특성을 가진 식물, II등급의 식물군은 백두대간을 중심으로 1,000m 이상되는 지역에 분포하는 특성을 가진 식물, I등급의 식물군은 4개의 아구 중 3개의 아구에 걸쳐 분포하는 특성을 가진 식물로 보존 우선순위를 평가한 것이다(Kim, 2000).

자생지 위협의 인위적인 요인으로 흰뺨딸기가 자생하는 한라산은 국립공원으로 승격된 1970년대부터 탐방객이 지속적으로 증가하기 시작하여 1994년에는 처음으로 연인원 50만명을 넘겼으며, 국립공원 무료입장이 실시된 2007년에는 804,887명으로 증가하여 2010년부터 2016년까지 연간 100만명 이상을 기록하였다. 단기간에 걸친 탐방객의 급증은 백록담 화구륜 일대와 주요 탐방로를 따라 심각한 훼손을 초래하는 실정이다(우, 1986; 오와 허, 1992; 오, 1996).

흰뺨딸기는 *Fragaria* 속의 2배체 식물로 교잡 육종을 하면 8배체인 재배종 딸기에 비해 안정적인 생산이 가능할 것으로 생각되며, 재배종 딸기 (*Fragaria*×*ananassa*)는 장미과의 딸기속으로 8배체($2n=8x=56$)에 속하며, 상업적으로 재배되는 딸기 품종은 한정되어 있다. 딸기 야생종은 열대지역부터 한대지역까지 넓게 분포되어 있으나 재배역사는 다른 원예작물에 비해 비교적 짧은 편이다. 현재 재배종 딸기는 18세기 유럽에서 미국 원종인 *F. virginiana*와 *F. chiloensis*를 교배해서 만들어진 것이며, 기원이 짧고, 미국에서 육종된 재배종을 가지고 육종가들은 다양한 새로운 품종을 만들어 내고 있으며 실질적으로 재배가 가능한 대부분의 지역에서 재배되고 있다.

딸기는 전 세계적으로 생산량이 급증하고 있음에도 불구하고 환경스트레스, 과실의 품질과 전처리과정 등 많은 문제가 발생하고 있다. 재배종 딸기 육종은 8배체와 종의 높은 이형접합성에 의해 제한되어 왔다. 게다가 상업적으로 재배되는 딸기는 기본적인 germplasm이 매우 좁으며, 현재 재배종의 유전자 대부분은 몇몇 핵과 세포질적 원천에서 유래된 것이다(Sjulin and Dale, 1987; Dale and Sjulin, 1990). 이러한 이유로 재배종 딸기의 germplasm 확장을 위하여 야생종이

육종에 이용되어야 하며(Faedi et al., 2002; Hancock et al., 2002; Marta et al., 2004), 재배시기 및 지역에 따른 다양한 품종이 육성되어야 할 것이다. 하지만, 아직 흰맛딸기를 이용한 배수성 육종과 교잡 육종에 의한 품종개량 연구가 미흡하여 추후 이에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

식물조직배양은 식물의 세포 및 기관을 연중 균일하게 대량생산하는 가장 보편적인 방법이며, 멸종위기식물의 종 보존을 위해서 많은 연구자들이 식물조직배양을 이용하고 있다(문 등, 1999; 한 등, 2004; 문과 김, 2008; 배 등, 2012; 고 등, 2013; 배 등, 2014; Lee, 1985; Rai, 2002; Gomes et al., 2003; Faisal et al., 2007).

대부분의 조직배양은 고체배양에 의해 증식되며, 제한적인 공간과 조절된 환경에서 자라기 때문에 무엇보다도 배지의 구성성분이 기내 식물체의 생육에 큰 영향을 미친다. 비교적 광범위하게 적용되는 배지가 몇 가지 개발되어 있으므로 이들 중 알맞은 배지를 선택하고 기내 생육에 가장 효율적인 농도를 밝혀내는 것이 중요하며, 배지에 첨가되어 식물 생장에 영향을 미치는 화학적인 요인은 식물 성장조절물질의 종류와 농도, 무기염류의 종류와 농도, 질소원의 비율 및 탄소원의 농도 등 여러 가지가 있다(Paek et al., 2001; Rout et al., 2000).

Zeng et al.(1998)은 석곡(*Dendrobium candidum*)의 배 배양과 증식에 적합한 배지를 구명하기 위하여 MS(Murashige and Skoog, 1962), SH(Schenk and Hildebrandt, 1972), VW(Vacin and Went, 1949), KC(Knudson, 1946)와 수정한 N6(Chu, 1978) 배지로 달리하여 배양한 결과 수정한 N6 배지에 NAA 0.2 mg/L⁻¹와 sucrose 2%가 첨가된 배지에서 배양체의 생장이 가장 우수하였고, Zhou et al.(2005)은 석곡의 부정근 유도 및 증식에 B5(Gamborg et al., 1968) 배지가 가장 우수하였다고 하였다. MS 배지의 기본 농도를 달리하여 약용식물의 부정근을 배양한 결과 *Echinacea angustifolia* 부정근은 1/2배 MS 무기물 농도에서 부정근의 생장과 생리활성물질의 축적이 효과적이었으나(Wu et al., 2006) *Panax ginseng*의 부정근은 기본 1배 MS배지에서 최대의 biomass를 이룬 반면 낮은 농도의 무기물 농도(1/2배 MS와 2/3배 MS)에서 부정근의 생장과 ginsenoside의 생산이 가장 효과적이었다고 보고하였다(Yu et al., 2000).

조직배양 용 배지의 주성분은 거의 대부분이 암모니아태나 질산태로 공급되는

무기질소이며 이들 질소원은 식물세포 내에서 복합 유기물질을 합성하는데 이용된다(Bray, 1983). 대부분의 식물들은 식물체 내에서 이용할 수 있는 형태인 암모니아태 질소와 질산태 질소의 형태로 흡수·이용되는데(Marschner, 1995) 이 두 가지 형태의 질소원 비율에 따라 세포 증식이나 부정배 형성, 화아분화 및 생리활성물질 합성 등이 영향을 받으므로 식물종에 따라 적합한 비율조절이 필요하다고 하였다(George, 1993; Zhang et al., 1996a).

Eleutherococcus koreanum 부정근(Lee and Paek, 2011)과 인삼(*Panax ginseng*) 부정근(Yu et al., 2000)의 경우 배지 내 암모니아태 질소와 질산태 질소의 비율이 각각 5:25와 10:20이었을 때 성장량이 가장 높았으나, 생리활성물질 함량은 배지 내 암모니아태 질소의 비율이 증가할수록 감소하였다고 하였다. 이에 비해 가시오갈피(*Eleutherococcus senticosus*) 세포(Ahn et al., 2003) 배양 시 chlorogenic acid 함량은 배지 내 암모니아태 질소의 비율이 증가할수록 감소하였고 lignan류의 eleutheroside E 함량은 암모니아태 질소와 질산태 질소의 비율이 1:1일 때 가장 높았다고 보고되었다. Kim(2002)은 인삼 부정근 배양에서 부정근의 생장은 총 질소량의 영향을 받기보다는 질소원과 농도의 영향을 더 받는다고 하였다.

배지 내 여러 영양소 중 식물의 에너지원으로 사용되는 탄소원은 sucrose, glucose, fructose, lactose, maltose, galactose 및 전분이 이용되고 있는데, 각 식물의 종에 따라 차이는 있으나 대부분의 경우 sucrose가 가장 효과적인 탄소원으로 알려져 있다(Wu and Zhong, 1999). 이는 탄소원과 에너지 공급원으로 사용될 뿐만 아니라 배양조직으로부터 기관형성과 호흡 등 대사작용에도 영향을 미치며 배지 내 삼투압 조절제로도 이용되고 있다(Lee et al., 2006; Zhang et al., 1996b).

Nakayama et al.(1991)은 감자 조직배양시 배양재료로 잎이 부착된 단일마디를 3% 당을 첨가한 것과 첨가하지 않은 MS배지에 탄산가스 농도를 500~1000 $\mu\text{mol}/\text{mol}^{-1}$ 로 조절한 용기에 3일 동안 배양한 후 잎의 건물중 당 전체 동화율을 측정해보면 당이 첨가된 배지보다 무첨가 배지에서 8~10배 증가한다고 하였다. 또한 Capellades et al.(1991)은 장미에서, Watanabe et al.(1990)은 스파티필름에서, Tanaka et al.(1990)은 국화에서, 그리고 Tani et al.(1991)은 알팔파의 조직배

양시에도 배지에 당 농도를 증가시키면 전체 광합성률은 감소한다고 보고한바 있다.

기존의 고체배양은 많은 수의 배양용기와 노동력이 필요하고 그 결과 낮은 증식효율과 높은 생산비용이 중요한 문제로 대두되고 있다. 이러한 문제점을 극복하기 여러 종류의 배양 기술을 이용하기 시작하였으며, bioreactor 기술은 노동력을 감소시키고 생산비용을 낮추는 등 식물체의 기내 대량증식의 산업화를 위한 실용적인 체계를 발전시키기에 효과적인 방법이다.

식물의 세포나 조직을 배양할 목적으로 미생물 발효기를 변형하여 식물의 세포나 조직을 대량으로 배양할 수 있는 bioreactor가 개발되었다(Paek et al., 2001; Martin, 1980; Wagner and Vogelmann, 1977; Wang and Staba, 1963). 기존의 식물조직배양 기술은 자동화가 불가능하고 배양용기의 용적 활용도가 낮아 조직배양 최종 산물 가격의 40~60%가 인건비이다(Chu, 1995). 이에 비해 bioreactor 배양 시스템은 액체배지를 이용하며 bioreactor 내부로 적정수준의 공기를 인위적으로 꾸준히 공급 가능하여 bioreactor 전체 용적의 90% 이상을 활용할 수 있다. 또한 공기공급량, 접종밀도, 배지조성, 배양방식 그리고 산도, 온도 등 배양환경의 최적화와 자동화가 가능하며 대규모화를 통하여 인건비와 생산비를 절감하면서 일시적으로 대량생산이 가능하여 주목 받고 있는 배양시스템이다 (Paek et al., 2001).

식물생산에 bioreactor를 적용한 예는 베고니아의 대량증식에서 최초로 보고되었고(Takayama and Misawa, 1981), 최근에는 다양한 목적으로 원예식물과 약용식물의 세포와 기관 배양에 적용되고 있다. 그 예로 *Lilium Oriental* Hybrid 'Casablanca' 종구(Lian et al., 2003), *Alocasia amazonica* 신초(Jo et al., 2006), *Panax ginseng* 세포(Thanh et al., 2005; Thanh et al., 2006) 및 부정근(Kim et al., 2004a; Kim et al., 2004b), 가시오갈피 체세포 배(Shohael et al., 2005) 배양 등이 있다. 최근 bioreactor를 이용한 부정근 배양시스템은 인삼을 모델로 하여 국내에서도 그 산업화 가능성이 제시되었다(Hahn et al., 2003; Kim, 2002; Yu et al., 2000; Seon et al., 1999). 특히, Takayama and Akita(2005)는 식물체 증식에 있어서 bioreactor 기술의 실용적인 가능성을 제시하여 현재의 bioreactor 배양기술이 조직배양체의 산업화가 될 수 있는 기반을 마련하였다.

Bioreactor를 이용한 이차대사산물 생산과 관련하여 산업적 생산이 가장 먼저 이루어진 분야는 세포 현탁배양으로서 미생물 배양과 비슷한 이유로 bioreactor의 운용이 쉽다는 장점이 있다. *Thalictrum minus*와 *Coptis japonica*로부터 약리성 alkaloid물질인 berberine(Verpoorte et al., 1999), *Lithospermum erythrorhizon*으로부터 염료 및 피부치료제인 shikonin의 생산(Fujita et al., 1981)은 산업화된 대표적인 사례이며, 국내에서는 (주)삼양제넥스에서는 주목 세포의 bioreactor 배양으로부터 항생제인 taxol의 산업적 대량생산을 성공한 바 있다(Choi et al., 2001). 그러나 성공적인 bioreactor 배양을 위해서는 대상 식물의 종류, 배양체의 형태, 배양 목적 등에 따라 다양한 배양환경의 최적화가 필요하다(Murthy et al., 2008).

Bioreactor 배양은 기존의 소규모 배양환경을 개선하고 배양기의 용적을 확대하여 한번에 대량으로 배양체를 생산할 수 있어 각광 받고 있는 배양방법으로(Nhut et al., 2004; Rao and Ravishankar, 2002) 공기공급, 배양밀도, 배지조성, 배양방식 등 배양환경의 최적화와 자동화가 가능해 식물 세포나 기관의 배양 효율을 크게 높일 수 있다(Paek et al., 2001).

딸기 기내배양에 bioreactor를 이용한 것은 호르몬을 첨가한 배지에서 신초를 유도(Takayama and Akita, 1998)하거나 잎 절편체를 호르몬이 첨가된 배지에 넣어 신초를 증식(Hanhineva et al., 2005)하는 등 겨우 몇 편에 불과하다. 딸기는 조직배양 시 호르몬 종류 및 농도, 계대배양 횟수에 따라 변이가 나타날 수 있으므로(Faedi et al., 2002) 호르몬 사용을 최소화하여 신초를 대량증식시키는 것은 매우 중요한 일이다.

딸기의 bioreactor 배양 시 기내 유식물체의 생육은 여러 가지 배지조건에 따라 다르게 나타난다. 특히 질소질의 종류 및 농도는 딸기 유식물체의 신초 길이 및 뿌리생육에 영향을 미치며(Leifert et al., 1992; Williams et al., 1985; Woodward et al., 2006), sucrose는 식물체의 성장과 분화에 영향을 미치고(Aloni, 1980; Bofunia and Przywara, 1999; Gibson, 2000; Leva et al., 1990; Steinitz, 1999), 삼투압과 수분포텐셜에 영향을 미쳐 유식물체의 양·수분 흡수에 관여한다(Lipavska and Vreugdenhil, 1996). 또한 배지 pH는 식물의 양분 흡수와 효소 및 호르몬 활동(Bhatia and Ashwath, 2005; Gaspar et al., 1987; Hussey,

1986), 그리고 세포분화와 신초생장 등의 세포질적 활동을 조절한다(Brown et al., 1979). 그러므로 딸기 조직배양에 bioreactor 배양을 효과적으로 이용하기 위해 배지조건 확립은 반드시 필요하다.

딸기 기내배양 시 호르몬을 첨가하지 않고 고체배지에 배양할 경우 증식효율이 매우 낮아 생산비용이 많이 드는 단점을 가지고 있어 딸기 bioreactor 배양시 대부분 호르몬을 첨가하여 다량의 신초발생을 유도하였다(Hanhineva and Karenlampi, 2007; Takayama et al., 1985). 그러나 대부분의 딸기인 경우 배수성 ($2n=8x=56$)이 높아 호르몬을 사용하면 변이개체가 발생할 확률이 높기 때문에 대량증식 시 호르몬 사용에 유의해야 하며, 김 등(2015)은 딸기 재배품종인 ‘고하’에 대한 체세포영양계 변이 발생을 알아보기 위해 실험한 결과 BA 0.5 ppm 이하에서는 3년 내에 유전적 변이가 전혀 나타나지 않았으며, 1.0 ppm 이상에서는 3년차에 2.0%의 변이개체를 확인하였다고 보고하였다. Galis et al.(1995)은 N⁶-benzyladenine(BA)을 10 mg/L⁻¹ 처리할 경우 무처리구에 비해 괴경형성이 10~20일 앞당겨졌지만, 외부에서 처리하는 cytokinin의 농도가 높아질 경우 오히려 외식체의 생장을 심하게 억제하는 원인을 제공한다고 하였다. 즉, 감자 마디 배양에서 cytokinin의 처리로 괴경형성이 유도되지만, 농도에 따라 그 영향이 달라질 수 있다고 주장하였다. Stapfer and Heuser(1984)는 periwinkle의 경정절편 배양에서 shoot 증식을 위해서는 kinetin이나 2iP보다는 BA가 더 효과적이라고 보고하였고, Yoeum et al.(2000)은 Buffalo gourd의 기내 shoot 증식 및 생장에 미치는 cytokinin의 효과를 조사한 결과 BA 첨가배지에서는 다수의 shoot를 얻을 수 있는 반면, kinetin과 2iP 첨가배지에서는 shoot 증식 효과가 미비하였고, Kusey et al.(1980)과 Han et al.(1991)은 안개초 배양과 *Delphinium*의 경정배양에서 BA가 kinetin 및 2iP보다 shoot의 증식과 생체중의 증가에 더욱 효과적이었다.

배지 내 산소 용해도가 낮고, 식물체가 산소를 빠르게 소모하므로 bioreactor 배양 시 공기를 지속적으로 공급해주는 것이 매우 중요하다. 공기를 주입하면 배지가 순환하면서 산소, 이산화탄소, 에틸렌 등이 공급되기 때문에(Scragg, 1992; Doran, 1993), 공기주입은 식물생장과 밀접한 관계에 있다. 그리고 식물 세포와 미생물세포의 대사율이 다르므로(Cazzulino et al., 1991) bioreactor를 이용한 식물체 증식 시 적정량의 공기를 주입하는 것이 매우 중요하다.

Ⅲ. 재료 및 방법

1. 자생지 환경 조사

멸종위기식물 흰뺨딸기의 기내배양을 위한 기초자료로 활용하기 위하여 자생지 환경 특성을 알아보기 위하여 자생지 온도와 습도를 조사하였으며, 흰뺨딸기 자생지와 비자생지의 토양 환경을 알아보기 위하여 토양 물리성과 화학성에 대하여 조사하였고, 흰뺨딸기의 분포와 식생조사는 한라산 어리목, 성판악, 관음사 탐방로 주변에 대하여 현지조사를 하였다.

1) 자생지 온·습도 조사

흰뺨딸기의 자생지 환경 조사를 위해 HOBO[®] Pro v2를 이용하여 2013년 1월에서 2017년 09월까지 흰뺨딸기가 자생하는 한라산 성판악 탐방로 해발 1,800 m와 어리목 탐방로 해발 1,600 m에서 1시간에 한번씩 온·습도 데이터를 수집하여 월별 온·습도의 평균을 산출하였고, 성판악 탐방로 진달래밭 대피소(해발 1,500 m)와 어리목 탐방로 윗세오름 대피소(해발 1,700 m)는 기상청 국가기후데이터센터 자료의 온도 데이터를 활용하였다(<http://sts.kma.go.kr>).

2) 자생지 토양환경 조사

토양시료는 흰뺨딸기 자생지와 비자생지(대조구)로 구분하여 토양시료를 채취하였다. 어리목의 흰뺨딸기 자생지의 토양은 훼손지를 복구한 녹화마대가 있는 지역이었으며, 비자생지의 토양은 제주조릿대가 없는 지역으로 다른 식생도 별로 없는 곳이었다. 성판악의 흰뺨딸기 자생지의 토양은 김의털 등 사초과가 많은 지역이었으며, 비자생지의 토양은 어리목의 비자생지와 마찬가지로 다른 식생이 별로 없는 곳이었다. 관음사의 흰뺨딸기 자생지의 토양은 다른 자생지와는 다르게 유기물 층이 많은 지역이었으며, 비자생지 또한 유기물 층이 많은 곳이었다(Fig. 1, Table 1).

물리성을 측정하기 위한 토양시료는 100 cm³ 스테인레스 원통을 이용하여 표토를 core sampler로 채취하였으며 수분이 날아가지 않도록 밀봉을 한 후 제주대학교 토양환경실험실에서 분석하였다. 화학성을 측정하기 위한 토양시료는 물리성 시료를 채취한 지점에서 Z자 형태로 토양시료 채취지점을 선정하여 낙엽층을 제거한 후에 표토(0~15 cm)를 5군데 채취하고 섞어서 토양 1점으로 정하였다.

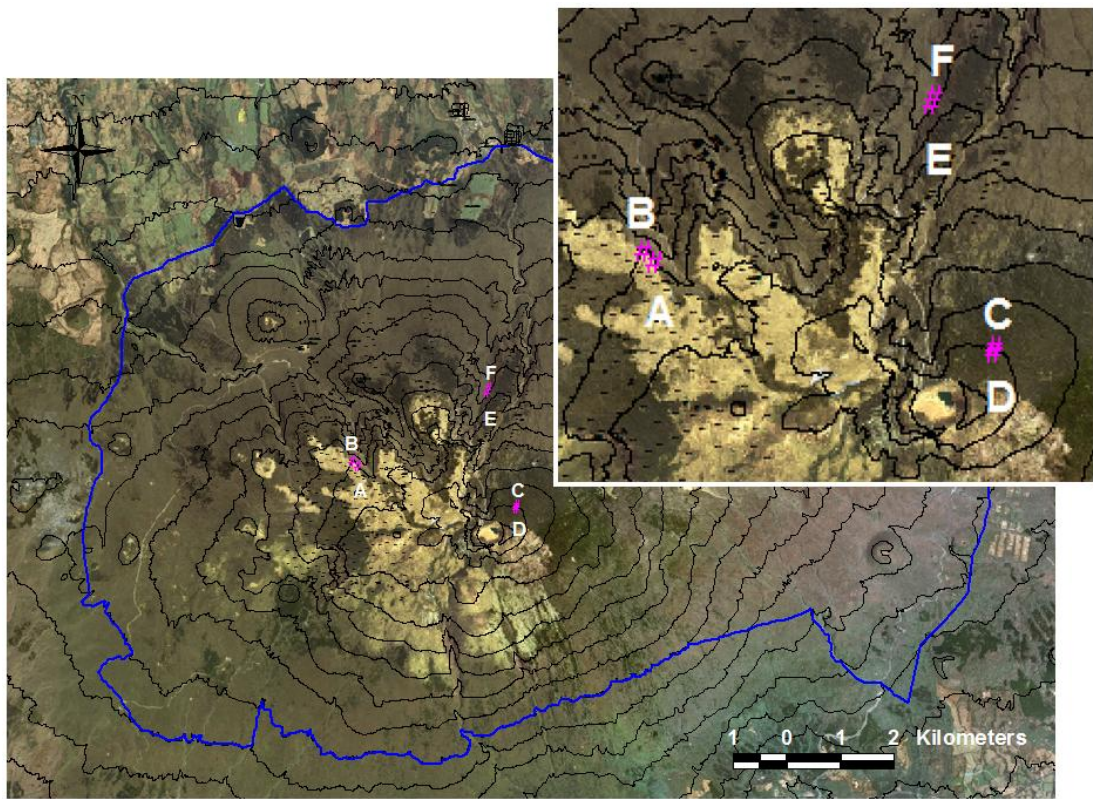


Fig. 1. Areas of Mt. Halla soil sampling.

—, Hallasan national park; #, Soil sampling plots; A, Eorimok habitat; B, Eorimok non-habitat; C, Seongpanak habitat; D, Seongpanak non-habitat; E, Gwaneumsa habitat; F, Gwaneumsa non-habitat

Table 1. Elevation and coordinates of soil sampling plots

Soil sampling plots	Elevation (m)	Coordinate	
		Longitude	Latitude
A Eorimok habitat	1,568	126° 30 ' 29.7 "	33° 22 ' 08.07 "
B Eorimok non-habitat	1,568	126° 30 ' 25.9 "	33° 22 ' 11.4 "
C Seongpanak habitat	1,811	126° 32 ' 23.6 "	33° 21 ' 45.0 "
D Seongpanak non-habitat	1,811	126° 32 ' 23.7 "	33° 21 ' 43.9 "
E Gwaneumsa habitat	1,397	126° 32 ' 02.3 "	33° 22 ' 53.3 "
F Gwaneumsa non-habitat	1,397	126° 32 ' 03.4 "	33° 22 ' 55.1 "

(1) 토양 물리성 분석

토양의 이화학적 성질은 농촌진흥청 분석법(NIAST, 2000)에 준하여 분석하였다. 용적밀도는 core method, 입자밀도는 pycnometer method를 응용하여 측정하였다. 공극률은 용적밀도와 입자밀도를 이용하여 계산하였으며, 투수계수 측정은 100 cm의 core sampler로 투수속도 측정기(DAIKI Co. Ltd.)를 사용하여 변수위 측정법(falling head method)으로 측정하였다. 토양삼상분포는 core의 총 용량인 100 cm에서 공극률을 뺀 값을 토양의 고상으로 하여 기상과 고상의 비를 나타내었다. 입도분석은 풍건토양 10 g을 평량하여 500 ml Tall beaker에 담고, Tall beaker에 증류수를 300 ml씩 가하고 30% 과산화수소를 25 ml씩 가 한 뒤 90℃로 가열된 전열판 위에서 가열하면서 유기물을 분해하였다. 과산화수소 분해가 끝나면 원심분리 병에 분산제 5% Sodium hexametaphosphate 10 ml를 가한 후 약 18시간 정도를 진탕시키면서 완전히 분산시켰다. 이 후 Pipette법과 체분석을 이용하여 측정하였다.

(2) 토양 화학성 분석

토양의 화학적 성질 조사를 위한 토양 시료는 채취한 시료를 풍건시킨 후 2 mm 체에 통과된 것을 분석시료로 하여 다음과 같이 분석하였다. 토양 pH는 토양과 증류수의 비를 1:5로 하여 토양 5 g에 증류수 25 ml를 첨가한 다음 진탕하여 pH meter(inoLab pH 730, Germany)를 이용하여 측정하였다. 전기전도도는 pH

를 측정하고 남은 여액을 Conductivity Meter(CM-11P TOA Electronics Ltd., Japan)를 이용하여 측정하였다. 토양 유기물함량은 Walkley and Black법으로 분석하였고, 유효인산은 Lancaster법으로 분광광도계(Genesis-5, USA)를 이용하여 분석하였다. 질소함량은 토양시료를 황산으로 분해한 다음 Kjeldahl법으로 자동 질소분석장치(Kjeltec analyzer unit, Foss, USA)를 이용하여 분석하였다. 교환성 양이온은 1N ammonium acetate(pH 7.0)용액을 토양과 침출액의 비를 1:10으로 하여 토양 5 g에 1N ammonium acetate용액 50 ml를 가하여 30분간 진탕한 다음 여과하여 얻어진 여액을 ICP-OES(JY 138 Ultrace, Jobin Yvon)를 이용하여 분석하였다. 양이온교환용량은 1 N-NH₄OAc(pH 7.0)로 포화하고 80% ethyl alcohol로 세척한 후 토양을 Kjeldahl 증류장치에 의해 NH₄⁺ 함량을 정량하여 산출하였다. 교환성양이온은 1N ammonium acetate(pH 7.0) 용액 50 ml을 가하여 30분간 진탕한 다음 여과하여 얻어진 여액을 ICP-OES(JY 138 Ultrace, Jobin Yvon)를 이용하여 분석하였다.

3) 자생지 조사

흰뚨딸기의 자생지 식생의 변화를 알아보기 위해 2016년 6월부터 2017년 9월 까지 한라산 어리목, 성판악, 관음사 탐방로 주변에서 현지조사를 실시하였으며, 자생지가 확인된 서식지는 휴대용 GPS(Garmin 60CSx)를 이용하여 위치를 확인하였으며, 30개체 이상 자생한 지역을 선정하여 조사하였다. 방형구(1×1m)내에 분포하는 각각의 식물 종수와 개체수를 조사하였으며, 이때 조사된 자료를 가지고 Shannon-Wiener(1963)의 $H' = -\sum(n_i/N)\ln(n_i/N)$ 공식을 이용하여 종 다양성 지수를 산출하였다. 여기서 n_i 는 각 종의 개체수, N은 관찰된 총 개체수를 의미한다.

흰뚨딸기의 엽록소 함량을 조사하기 위하여 휴대용 엽록소 측정기인 Minolta chlorophyll meter SPAD-502를 이용하여 개화기와 결실기인 6~7월에 성판악 탐방로에서 고도별로 12~13시 사이에 10반복 1회 평균값으로 10회 측정하여 조사하였다.

2. 흰땃딸기의 총 페놀, 플라보노이드 및 DPPH Radical 소거활성

흰땃딸기의 향후 이용가능성을 알아보기 위해 총 폴리페놀과 플라보노이드 등의 함량과 DPPH radical 소거활성을 조사하였다.

1) 추출물의 제조

실험에 이용한 흰땃딸기는 제주대학교 유리온실에서 증식된 포복경을 채취하여 60°C 건조기에서 24시간 건조 후 사용하였다. 시료를 약자사발을 이용하여 분쇄하고 상온에서 시료와 70% 메탄올을 이용하여 1:15의 비율로 48시간 침지하여 추출하였다. 얻어진 추출물을 감압농축기(Heidolph,, Laborota 4000 efficient, Germany)로 농축하여 메탄올로 10,000 ppm 희석하여 실험에 사용하였다.

2) 총 폴리페놀 함량 측정

흰땃딸기 추출물의 페놀함량은 Folin-Denis 방법을 변형하여 측정하였다 (Singleton et al., 1999). 추출물 100 μ l와 증류수 500 μ l를 혼합한 뒤 phenol reagent 50 μ l를 가하여 5분간 반응시켜 20% sodium carbonate 300 μ l를 첨가한 후 상온에서 20분간 반응 시킨 후 multi-micro plate reader(Spectra Max i3X, CA, USA)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 메탄올 추출물로부터 페놀함량의 산출은 gallic acid로 표준검량곡선을 작성하여 GAE(gallic acid equivalent, mg·GAE/mg)로 환산하여 나타내었다.

3) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Kim et al.(2012)의 방법을 변형하여 측정하였다. 추출물 100 μ l에 80% 에탄올 200 μ l을 혼합한 후 추출물 1M potassium acetate 100 μ l, 10% Aluminium nitrate 100 μ l 그리고 80% 에탄올 600 μ l를 순서대로 첨가한 후 상온에서 40분간 반응시켰다. 그 이후 multi-micro plate reader를 이용하여 417 nm에서 흡광도를 측정하였다. 메탄올 추출물에 존재하는 플라보노이드의 산출은 표준물질인 quercetin을 이용하여 표준검량곡선을 작성하여 QE(quercetin equivalent, mg·QE/mg)로 표시하였다.

4) DPPH Radical 소거활성 측정

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거활성은 Blois(1958)의 방법을 변형하여 측정하였다. 메탄올 추출물의 DPPH 활성 저해율을 측정하기 위하여 sample 20 μl 에 0.15 mM DPPH 용액을 180 μl 가하여 암실에서 30분간 반응시킨 후 multi-micro plate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조구로 합성 항산화제인 BHT를 이용하였다. DPPH free radical 소거능은 아래의 계산식으로 계산하였으며 모든 실험은 동일 농도 아래 3회 실시하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = [1 - (A - B) / C] \times 100$$

A, absorbance of the sample; B, absorbance of the blank; C, absorbance of the control

3. 흰뚝딸기의 기내 배양을 위한 기초연구

흰뚝딸기의 유전적 다양성을 유지하기 위해 종자 발아를 통하여 기내 배양 유식물체를 얻고 성공적인 기내배양을 위하여 배지종류와 배지의 적정 염농도 및 sucrose 농도 등의 시험을 수행하였다.

1) 흰뚝딸기의 종자 발아 조사

흰뚝딸기의 기내배양을 위한 종자발아 실험을 하기위해 2017년 7월에 한라산 성판악 탐방로와 관음사 탐방로에서 3주에 걸쳐 흰뚝딸기 열매를 채취하여 과육을 분리하여 종자 정선 후 4°C에 냉장 보관하여 사용하였으며, 김 등(2012b)은 딸기 종자는 경실종자로서 종피가 두껍고 표피에 왁스층으로 덮여있어 수분 흡수가 느려 발아율이 낮아 발아세가 불량하며, 발아율을 높이기 위하여 NaOCl 2% 농도로 20°C 항온 암조건에서 4~8시간 동안 200 rpm으로 회전 진탕하는 것이 발아율 향상에 좋다고 보고하였다. 이에 소량의 흰뚝딸기 종자 발아율을 높이기 위하여 NaOCl 2% 농도로 20°C 항온 암조건에서 4시간 동안 200 rpm으로 회전 진탕하였으며, 시험관에 0.8% plant agar를 부어 1립씩 과중하여 25°C 암조건에서 발아율과 평균발아일수(Mean germination time, MGT)를 조사하였다.

$$\text{MGT} = \frac{\sum(\text{치상후 조사일수} \times \text{조사당일 발아수})}{\text{총 발아수}}$$

2) 효율적인 기내배양을 위한 배지의 적정 조건

흰뚨딸기의 기내배양시 적정조건을 찾기 위해 배지종류와 배지의 적정 염농도 및 sucrose 농도 등의 시험을 수행하기 위해 발아한 흰뚨딸기 중 본엽이 2장 이상인 유식물을 대상으로 어린 잎 1매를 남기고 모든 잎과 뿌리를 제거한 후 사용하였다.

배지 종류별로는 MS배지(Murashige and Skoog, 1962), Gamborg B5배지(Gamborg et al., 1968), White배지(White, 1963)를 이용하여 각 1배 농도로 처리하였고(Table 2), 농도별 실험은 MS배지를 1/2배, 1배, 2배 3처리를 하였으며, 3% sucrose를 첨가하여 완전히 녹인 후 pH 5.6으로 조정하고 0.8% plant agar를 첨가하여 고체배지를 만들어 사용하였다. sucrose 농도 실험은 기본 MS배지에 1%, 3%, 5%로 처리하였다. 각각의 배지는 250 ml 삼각플라스크에 약 50 ml씩 분주하여 121℃에서 15분간 고압멸균하여 사용하였으며, 모든 실험은 삼각플라스크 당 1개체를 치상하여 25±1℃, 일장 16/8시간(명/암) 배양조건에서 6주간 배양하였으며, 각 처리당 12개체를 추출하여 신초 길이, 관부직경, 줄기수, 엽수, 엽장, 엽폭, 뿌리수, 뿌리길이를 조사하였고 생체중, 건물중을 측정하여 D/F율을 산출하였다.

Table 2. Comparison of the nitrate contents in MS, Gamborg B5, and White culture mediums

Media	Composition(mg/L ⁻¹)				
	NH ₄ NO ₃	KNO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	Total
MS	1,650	1,900	-	-	3,550
Gamborg B5	-	2,528	134	-	2,662
White	-	80	-	300	380

4. 배양 방법별 흰뚨팥기의 기내 증식

흰뚨팥기의 적정 기내배양 방법을 찾기 위하여 고체, 액체, bioreactor 배양 실험으로 발아한 흰뚨팥기 중 본엽이 2장 이상인 유식물을 대상으로 어린 잎 1매를 남기고 모든 잎과 뿌리를 제거한 후 사용하였다.

배지는 MS 무기염에 3% sucrose를 첨가하여 pH 5.6으로 조정하였으며, 고체 배양은 0.8% plant agar를 첨가하였고, 액체배양과 bioreactor 배양은 첨가하지 않았다. 고체와 액체배양은 250 ml 삼각플라스크, bioreactor 배양은 balloon type의 bioreactor(2,000 ml, Bio Pia)를 사용하였으며, 고체 및 액체배양은 약 50 ml씩, bioreactor 배양은 1,500 ml의 배지를 분주한 후 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 고체 및 액체배양은 1개씩, bioreactor 배양은 12개체를 치상하였다. 액체배양은 20 rpm의 속도로 회전하는 교반기에서 배양하였으며, bioreactor 배양은 0.2 vvm(air volume/medium volume/min)으로 공기를 지속적으로 주입하였으며, 25±1℃, 일장 16/8시간(명/암) 배양조건에서 6주간 배양하여 각 처리당 12개체를 추출하여 신초 길이, 관부직경, 줄기수, 엽수, 엽장, 엽폭, 뿌리수, 뿌리 길이를 조사하였고 생체중, 건물중을 측정하여 D/F율을 산출하였으며, 신초의 발생수를 조사하여 신초발생율로 산출하였다.

5. Bioreactor를 이용한 흰뚨딸기의 기내 대량증식

Bioreactor를 이용하여 흰뚨딸기의 대량증식을 위해 배지의 적정 염농도 및 sucrose 농도, 적정 공기주입량 등의 시험을 수행하였다.

1) Bioreactor 배양 조건

balloon type의 bioreactor(2,000 ml, Bio Pia)를 이용하여 0.2 vvm(air volume/medium volume/min)으로 공기를 지속적으로 주입하였으며, $25\pm 1^\circ\text{C}$, 일장 16/8 시간(명/암) 배양조건에서 6주간 배양하여 각 12개체를 무작위로 추출하여 조사하였다(Fig. 2).

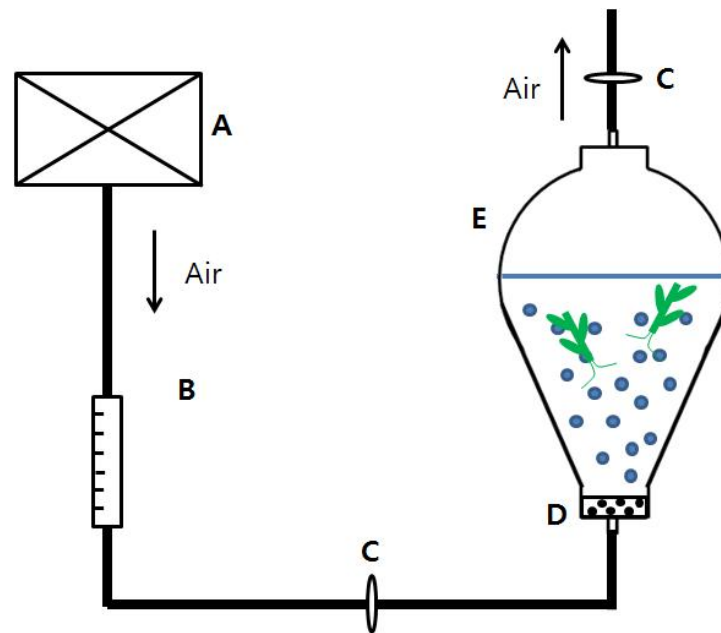


Fig. 2. Schematic diagram of bioreactor culture system.

A, air pump; B, air flow meter; C, 0.2 μm membrane filter; D, sparger; E, bioreactor.

2) 질소질

실험에 사용된 배지는 MS 무기염을 기본으로 사용하였으며, 처리방법에 따라 질소질을 가감하였다. 처리별 질소질 종류 및 농도는 Table 3과 같다. 모든 배지

는 3% sucrose를 첨가하였으며, pH 5.6으로 조정 한 뒤 121℃, 1.5기압의 고압 멸균기에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

Table 3. Comparison of the nitrate contents of MS culture medium according to nitrate concentration

Nitrate concentration	NH ₄ NO ₃ (mg/L ⁻¹)	KNO ₃ (mg/L ⁻¹)	Total(mg/L ⁻¹)
1/2×	825	950	1,775
1×	1,650	1,900	3,550
2×	3,300	3,800	7,100

3) Sucrose

실험에 사용된 배지는 MS 무기염을 기본으로 사용하였으며, sucrose 농도에 따라 1%, 3%, 5%를 첨가하였으며 배지를 pH 5.6으로 조정 한 뒤 121℃, 1.5기압의 고압 멸균기에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

4) BA

실험에 사용된 배지는 MS 무기염에 sucrose 3%를 첨가하였으며, 배지에 BA를 각 0.1, 0.2 및 0.4 ppm으로 조정하여 121℃, 1.5기압의 고압 멸균기에서 15분간 멸균한 후 사용하였다.

5) 공기주입량

Bioreactor 배양 시 적정 공기주입량을 알아보기 위해 각 처리별로 0.1, 0.2, 0.4 vvm으로 공기를 주입하였다. 배지는 MS 무기염을 기본으로 하여 3% sucrose를 첨가하였으며, pH 5.6으로 조정 한 뒤 121℃, 1.5기압의 고압 멸균기에서 15분간 멸균한 후 사용하였다.

6) 배양기간

Bioreactor 배양 시 적정 배양기간을 알아보기 위해 각 처리별로 2주, 4주 및 6주간 배양하였다. 배지는 MS 무기염을 기본으로 하여 3% sucrose를 첨가하였으며, pH 5.6으로 조정 한 뒤 121℃, 1.5기압의 고압 멸균기에서 15분간 멸균한 후 사용하였다. 각 배양기간 별로 생육조사를 실시하였다.

IV. 결과 및 고찰

1. 자생지 환경 조사

1) 자생지 온·습도

12~2월은 모든 고도에서 영하의 기온을 유지하였으며(Fig. 3), 1500 m~1800 m의 연평균 기온은 6.4°C이며, 7월 평균 기온이 17.5°C로 가장 높았으며, 연평균 기온은 가장 낮은 지대인 1,500 m에서 7.3°C로 가장 높게 조사되었다. 일 최고 온도는 2013년 8월 8일 진달래밭 대피소(1,500 m)가 27°C로 가장 높았으며, 일 최저 온도는 2015년 1월 23일과 2016년 1월 24일 윗세오름 대피소(1,700 m)가 -18.5°C로 가장 낮았다. 10월 하순부터는 일 최저온도가 영하권으로 접어들기 시작하였다.

습도인 경우도 눈이 덮여있는 겨울철을 제외하면 7월이 94.2%로 가장 높았으며, 연평균 습도는 1,600 m에서 84.8%로 가장 높게 조사되었는데(Fig. 3, Fig. 4), 이는 한라산의 높은 적설량으로 인하여 흉고 높이에 설치되어 있는 HOBO® Pro v2가 눈에 덮여 있어 습도가 높게 조사된 것으로 생각된다.

흰뺨딱기가 자생하는 한라산국립공원 어리목 해발 1,600 m 지점의 2013년 1월 1일에서 2017년 9월 30일까지의 평균온도와 습도는 Table 4와 같다. 평균온도는 2013년 6.0°C, 2014년 5.9°C, 2015년 6.5°C, 2016년 7.1°C 및 2017년 7.4°C였다. 평균온도가 가장 높은 시기는 7월과 8월로 각각 17.2°C와 16.6°C였다. 반면에 12월, 1월, 2월 및 3월은 영하의 온도를 보였으며, 연중 평균온도가 가장 낮은 시기는 1월로 -5.6°C였다. 평균습도는 2013년 84.2%, 2014년 88.6%, 2015년 84.5%, 2016년 83.3% 및 2017년 83.7%였다. 평균습도가 높은 시기는 1월과 7월로 각각 93.0%와 93.4%였으며, 5월에 72.0%의 평균습도를 보여 가장 낮았다.

흰뺨딱기가 자생하는 한라산국립공원 성판악 해발 1,800 m 지점의 2013년 1월 1일에서 2017년 9월 30일까지의 평균온도와 습도는 Table 5와 같다. 평균온도는 2013년 4.6°C, 2014년 4.3°C, 2015년 6.3°C, 2016년 6.0°C 및 2017년 6.7°C였다.

평균온도가 가장 높은 시기는 7월과 8월로 각각 16.7℃와 16.0℃였다. 반면에 12월, 1월, 2월 및 3월은 영하의 온도를 보였으며, 연중 평균온도가 가장 낮은 시기는 1월로 -6.8℃였다. 평균습도는 2013년 86.5%, 2014년 83.8%, 2015년 86.1%, 2016년 86.0% 및 2017년 80.1%였다. 평균습도가 높은 시기는 1월과 2월로 각각 95.6%와 95.7%였으며, 10월에 62.6%의 평균습도를 보여 가장 낮았다.

최근 30년(1971~2000년)의 기상관측 자료에 의하면 제주와 서귀포의 연평균 기온의 평년값은 각각 15.8℃, 16.6℃이며, 연강수량의 평년값은 1,497 mm와 1,923 mm였다(기상청). 그러나 어리목과 성판악의 흰땃밭기 자생지는 제주도의 산간지역에 속하며 다양한 기후 특성을 지닌다고 할 수 있다. 최근 4년(2013~2016년) 간의 기상청 연보 자료에 의하면 어리목 탐방로 해발 1,700 m에 위치한 윗세오름과 성판악 탐방로 해발 1,500 m에 위치한 진달래밭 대피소 자동기상관측장비인 AWS로 측정된 연평균기온은 각각 6.5℃와 7.4℃였다. 따라서 본 연구지역은 제주의 연평균기온보다 약 2배정도 낮은 기상환경 특성을 갖고 있었다.

해발고도 1,500 m 이상의 고지대에 국한하여 분포하는 종은 지구 온난화가 진행될 때 수평과 수직적으로 분포역이 축소되고 기온 상승 때문에 생리적으로 피해를 받을 가능성이 높다(공 등, 2014).

고산식물은 -6℃까지 광합성을 할 수 있고 15℃ 내외에서 광합성이 가장 활발한 것으로 알려졌다. 따라서 기온이 얼마나 높이 올라가고, 높은 온도가 얼마 동안 지속되는지는 고산대와 아고산대에서 식물의 분포에 매우 중요하다(공, 2007). 식물종은 기온이 상승하게 되면 생육에 적합한 온도를 찾아 보다 높은 고도로 이동하게 되는데 식물종이 분포하고 있는 각 산지의 최대 해발고도에서 적합한 생육 온도를 초과할 경우 해당 식물종은 사멸하게 된다(이, 2011).

과거 빙하기(glacial period)에는 자연적인 현상으로 기후변화가 서서히 진행되어 식물은 기후변화 속도에 적응하여 분포지를 옮길 수 있었다. 그러나 오늘날 인위적인 간섭에 의하여 기온이 가파르게 상승할 경우 식물은 기후변화의 속도를 따를 수 없기 때문에 식물종이 기온 상승 속도에 적응하지 못하고 쇠퇴할 가능성이 높다(공 등, 2014).

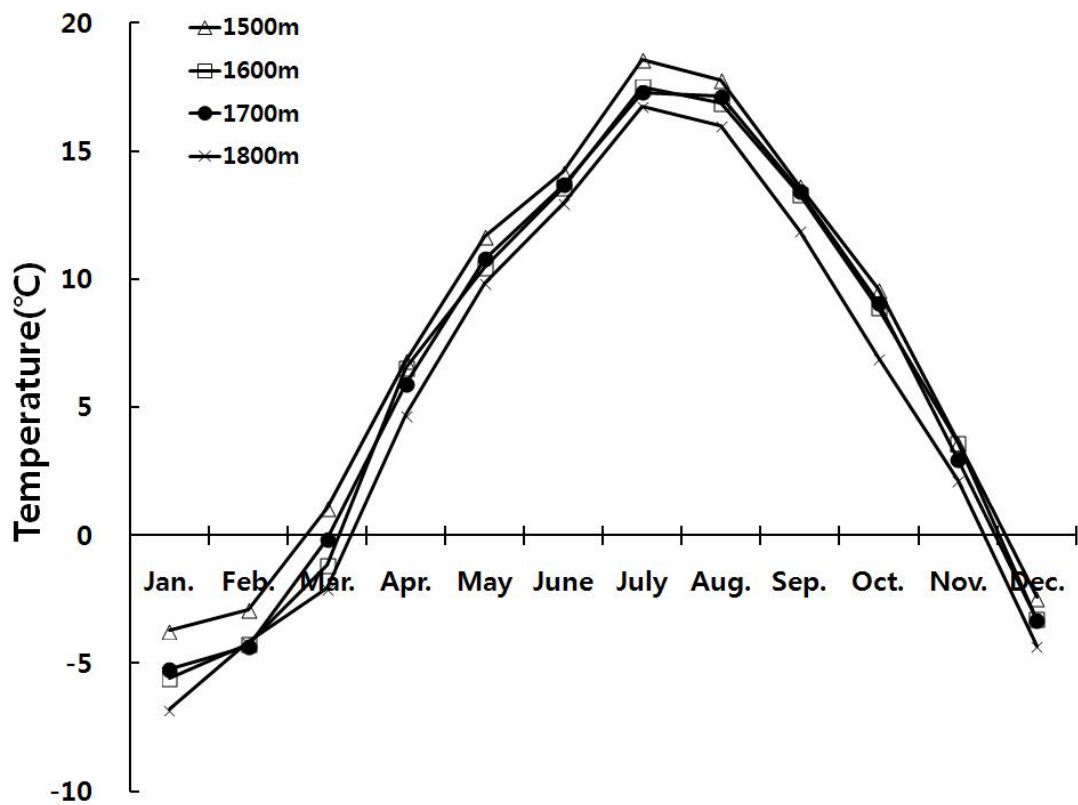


Fig. 3. Average air temperature(°C) surveyed at four Mt. Halla from 2013 to 2017.

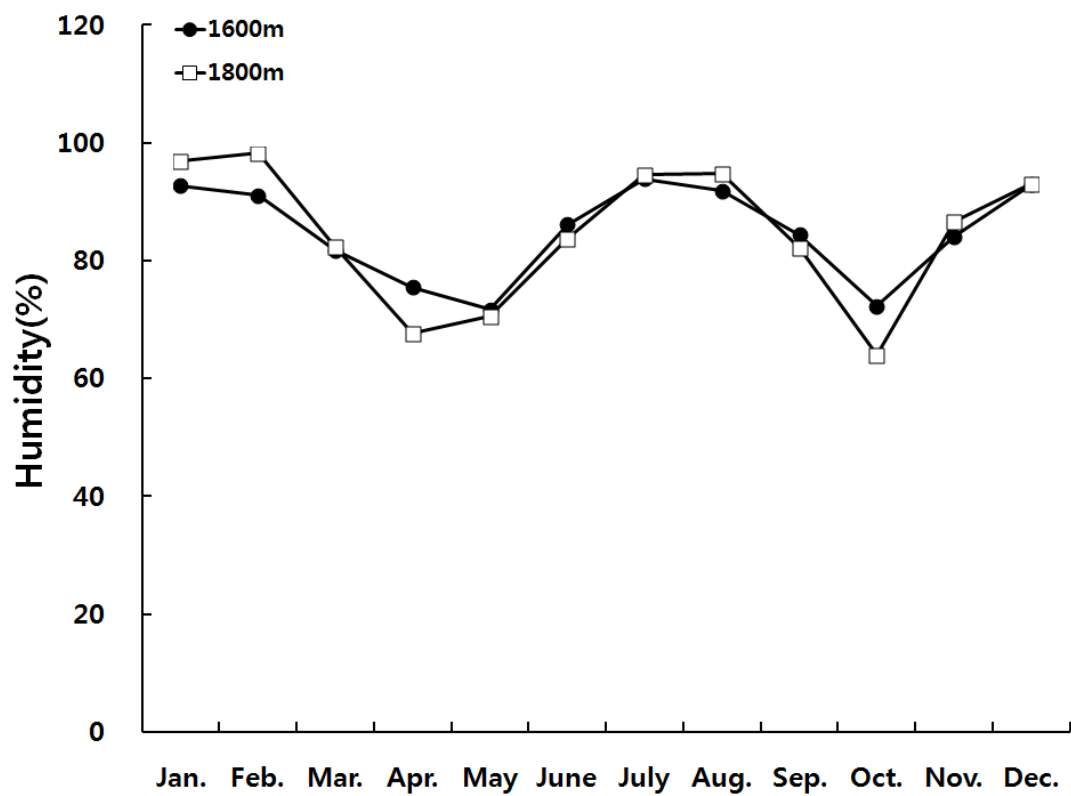


Fig. 4. Average humidity(%) of Mt. Halla from 2013 to 2017.

Table 4. Air temperature(°C) and humidity(%) at the elevation of 1,600 m of Mt. Halla

	2013		2014		2015		2016		2017	
	Temp.	Humi.	Temp.	Humi.	Temp.	Humi.	Temp.	Humi.	Temp.	Humi.
Jan.	-7	90.1	-4.2	97.3	-5.2	93.3	-5.8	91.3	-5.8	91.3
Feb.	-3.7	73.5	-2.8	98.6	-3.8	94.6	-5.5	94.2	-5.5	94.2
Mar.	-1.3	84.1	-1.8	86.1	-0.8	82.1	-0.1	80.6	-1.9	76.1
Apr.	6.3	78.9	5.8	80.9	6.8	76.9	7.9	65.7	5.9	74.8
May	10.2	72.0	9.7	74.0	10.7	70.0	11.7	71.8	10.0	70.7
June	13.3	87.4	12.5	91.4	14.1	83.4	14.4	88.9	13.5	79.4
July	16.8	93.8	16.8	96.0	16.8	91.6	18.4	92.3	18.7	95.4
Aug.	16.4	92.7	16.2	97.1	16.5	88.3	17.4	90.6	17.9	90.7
Sep.	13.0	82.9	13.2	84.6	12.7	81.2	14.1	92.9	13.5	80.4
Oct.	8.1	72.3	8.5	77.1	7.7	67.5	11.2	72.0	-	-
Nov.	3.8	86.0	2.6	80.4	5.0	91.5	3.0	78.3	-	-
Dec.	-3.9	96.9	-5.8	99.7	-2.0	94.0	-1.5	81.1	-	-
Average	6.0	84.2	5.9	88.6	6.5	84.5	7.1	83.3	7.4	83.7

Table 5. Air temperature(°C) and humidity(%) at the elevation of 1,800 m of Mt. Halla

	2013		2014		2015		2016		2017	
	Temp.	Humi.	Temp.	Humi.	Temp.	Humi.	Temp.	Humi.	Temp.	Humi.
Jan.	-7.0	98.6	-10.8	95.2	-4	98.2	-6.5	91.0	-5.7	94.8
Feb.	-3.8	99.7	-4	98.3	-1.0	99.0	-6.4	86.5	-5.6	94.9
Mar.	-1.7	95.5	-5.2	72.4	0.2	80.1	-0.7	90.1	-3.0	83.5
Apr.	3.8	69.7	1.9	64.1	6.1	69.1	7.0	66.5	4.7	66.4
May	9.2	68.8	9.8	76.0	9.6	77.0	10.8	75.5	9.8	53.8
June	12.1	86.6	13.6	86.0	13.0	86.9	13.5	90.9	12.6	72.6
July	16.2	93.9	16.4	95.5	15.8	96.0	17.5	95.6	17.8	91.5
Aug.	15.7	99.3	15.2	94.5	15.6	96.4	16.4	95.9	17.1	87.7
Sep.	10.4	86.9	12.2	82.6	11.3	83.0	13.0	96.9	12.5	75.8
Oct.	5.9	61.3	7.6	58.5	7.0	68.0	7.2	62.6	-	-
Nov.	-0.3	84.5	1.9	86.7	4.2	87.7	2.7	86.3	-	-
Dec.	-5.4	93.3	-7.0	96.3	-2.8	91.3	-2.1	93.6	-	-
Average	4.6	86.5	4.3	83.8	6.3	86.1	6.0	86.0	6.7	80.1

2) 자생지 토양환경 조사

(1) 토양의 물리적 특성

흰뚨딸기 자생지와 비자생지 토양의 물리성 분석 결과는 Table 6과 같다. 흰뚨딸기 자생지의 용적밀도는 0.54~0.96 g/cm³ 범위를 보였는데, 평균 용적밀도는 자생지에서 0.74 g/cm³였으며, 비자생지에서 0.60 g/cm³로 비자생지보다 자생지에서 용적밀도가 다소 높았다. 이는 토양침식이나 답압의 영향이 거의 없었기 때문이라고 생각된다. 토양분류학에서는 용적밀도가 매우 낮은 것이 화산회토의 대표적인 특성 중 하나라고 하였으며, 용적밀도가 0.90 g/cm³ 보다 낮은 토양을 Andisols로 분류하고 있다.

흰뚨딸기 자생지의 입자밀도는 2.18~2.33 g/cm³ 범위였다. 평균 입자밀도는 자생지에서 2.26 g/cm³였으며, 비자생지에서 2.20 g/cm³로 자생지와 비자생지의 입자밀도는 거의 차이가 없었다. 이와 같은 수치는 정 등(2002)이 보고한 제주지역 산림토양의 평균 입자밀도 2.42 g/cm³ 보다 조금 낮은 경향을 보였다.

토양삼상 분포는 고상 23~42%, 액상 28~65% 및 기상 5~49% 범위였다. 평균적으로 자생지에서는 고상 33%, 액상 46% 및 기상 22%였으며, 비자생지에서는 고상 27%, 액상 51% 및 기상 22%로 자생지와 비자생지 간에 큰 차이는 없었다. 공극률은 일반토양에서는 대체적으로 50% 내외이지만, 조사지에서는 58~77% 범위를 나타내어 물의 하향 침투가 빠르게 일어날 수 있는 환경이라고 생각된다.

조사지 토양의 투수계수는 시간당 물의 이동 거리를 나타낸 것으로 시간당 투수되는 거리(cm/h)로 나타내었다. Table 6과 같이 조사지의 투수계수는 0.1~269.8 cm/h 범위로 편차가 매우 컸다. 어리목 탐방로 1,600m에서 조사한 흰뚨딸기 자생지는 투수계수는 0.7 cm/h, 비자생지는 0.1 cm/h로 편차가 적었던, 반면에 성관악 탐방로 1,800 m 위치의 흰뚨딸기 자생지는 0.5 cm/h, 비자생지는 30.6 cm/h였으며, 관음사 탐방로 1,400 m 위치의 흰뚨딸기 자생지는 188.5 cm/h, 비자생지는 269.8 cm/h로 편차가 매우 컸다. 어리목 탐방로(1,600 m)의 평균 투수계수는 0.4 cm/h이고, 성관악 탐방로(1,800 m)는 15.5 cm/h이며, 관음사 탐방로(1,400 m)인 경우는 229.1 cm/h로써 해발고도에 따른 경향은 보이지 않으나 탐방객이 많이 몰리는 어리목 탐방로>성관악 탐방로>관음사 탐방로의 순으로 투수계수가 큰

경향을 보였다.

이러한 결과로 보아 어리목 코스를 이용한 탐방객이 많아서 사람에 의한 답압이 성판악 코스와 관음사 코스보다 많음을 알 수 있었다. 탐방객의 급증으로 발생하는 탐방로 훼손 가운데 가장 전형적인 유형은 탐방로에 형성된 난투수층(難透水層)에 기인하는 탐방로의 노폭 확대이다. 일반적으로 탐방로 노면은 탐방객의 답압으로 인하여 압밀되기 쉬우므로 토양공극률과 강우 침투율이 낮은 난투수층이 노면에 출현한다(Weaver and Dale, 1978; 서 등, 1994; 김과 박, 1998; 大貫 등 1999; 김, 2003). 난투수층이 직접 식물뿌리의 생육과 침입을 방해할 수도 있으며(윤, 1977; 日本材料學會, 1981), 예를 들어 뿌리호흡이 어려워진 탐방로 주변 식물이 고사될 수 있다(Ito et al., 2002). 또한 이러한 결과로 보아 사람에 의한 답압이 자생식물 서식지 훼손으로 연결되고 있음을 간접적으로 알 수 있었다.

Table 6. Physical properties of the soil around *F. nipponica*

Site	Habitat status	Bulk density	Particle density	Porosity (%)	Hydraulic conductivity
		(g/cm ³)	(g/cm ³)		(cm/h)
E*	Habitat	0.96	2.28	58	0.7
	Non	0.56	2.15	74	0.1
	Average	0.76	2.22	66	0.4
S	Habitat	0.71	2.18	67	0.5
	Non	0.69	2.18	68	30.6
	Average	0.70	2.18	68	15.5
G	Habitat	0.54	2.33	77	188.5
	Non	0.54	2.27	76	269.8
	Average	0.54	2.30	76	229.1

Site	Habitat status	Soil phases		
		Solid	Liquid	Gaseous
E*	Habitat	42	53	5
	Non	26	65	9
	Average	34	59	7
S	Habitat	33	56	12
	Non	32	50	19
	Average	32	53	15
G	Habitat	23	28	49
	Non	24	39	37
	Average	24	33	43

*E, Eorimok trail 1,600m; S, Seongpanak trail 1,800m; G, Gwaneumsa trail 1,400m.

(2) 토양의 화학적 특성

흰뚨밭기의 자생지 토양과 인근 비자생지 토양에 대하여 토양화학성 분석결과를 Table 7에 표시하였으며, 농촌진흥청 재배품종 시설밭기의 적정 토양화학성과 한라산 표토의 평균(고와 강, 2012)과 비교하였다. Arcview GIS 3.3을 이용하여 토양 채취지역의 토양통을 확인한 결과 군산통(A, E, F 지역)과 토산통(B, C, D 지역)으로 확인되었다(Fig. 5).

토양 pH는 토양의 중요한 화학적 성질의 하나로서 토양과 식물의 생육을 진단하는데 필요한 성분이다. pH는 관음사 흰뚨밭기 자생지에서 pH 5.24로 가장 높았으며, 한라산국립공원 탐방로 표토의 평균 pH 4.8보다 높게 나타났다. 하지만 재배품종 밭기의 적정 pH인 6.0~7.0 보다 낮았다(Table 7).

전기전도도는 용액 중 전해질 이온의 세기를 나타내며 이온의 종류에 따라 다르지만 대체적으로 염류농도에 비례한다. 따라서 전기전도도가 높으면 이온이 집적된 것을 의미하며 이는 염류집적을 나타낸다. 전기전도도는 어리목 흰뚨밭기 자생지역이 1.08 ms/cm로 가장 높았다. 한라산국립공원 탐방로 표토의 평균 0.59 ms/cm 보다 높게 나타났지만 재배품종 밭기 적정 농도는 2 ms/cm 이하였다(Table 7).

제주도 토양은 화산 폭발시 분출된 화산재와 동식물의 유체로부터 유래된 유기물이 결합하여 일반적으로 육지부 토양에 비하여 유기물함량이 높다. 특히 한라산국립공원은 제주도 연평균 강수량보다도 많고 기온도 낮아 유기물 분해가 잘 이루어지지 않고 집적될 수 있는 환경을 갖고 있다(현, 2006). 유기물함량은 어리목 흰뚨밭기 자생지역에서 24.52%로 가장 높았으며, 한라산국립공원 탐방로 표토의 평균 21.45%보다 높게 나타났으며, 재배품종 밭기의 적정유기물 함량 2.5~3.0% 보다 10배 이상 높았다(Table 7).

유효인산은 토양에 흡착된 인산을 약산으로 용출시킨 인산을 의미한다. 인산은 화산재가 함유된 화산회성 토양에서 강하게 흡착하여 고정시키는 능력이 매우 크다. 따라서 화산회토양은 유효인산함량이 매우 낮아 토양비옥도가 낮은 원인으로 알려져 있으며 식물이 성장하는데 제한요소로 작용하는데, 성판악 흰뚨밭기의 자생지인 경우 유효인산 함량이 28.1 mg/kg로 다른 지역에 비해 약 2배 이상 높게 나타났으며, 한라산국립공원 탐방로 평균 유효인산 함량은 9.7 mg/kg 보

다 약 3배 높게 나타났지만 재배품종 딸기의 적정 유효인산 350~500 mg/kg에 비해 함량이 매우 부족하였다(Table 7).

총 질소 함량은 어리목 흰땃딸기 비자생지에서 0.45%로 한라산국립공원 탐방로 평균 총 질소 함량 1.16%보다 약 3배정도 낮게 나타났다. 흰땃딸기 자생지와 비자생지의 총 질소는 0.27%와 0.38%로 비자생지에서 함량이 다소 높았다. 일반적으로 유기물함량이 많을수록 질소함량이 많아지는데 유기물이 화산재에서 유래된 Al과 결합하면 용탈에 대한 저항성이 있기 때문에 화산재가 많이 집적된 토양에서 질소함량도 높게 나타난다(Table 7).

교환성 K는 어리목 흰땃딸기 자생지에서 0.24 cmol^+/kg 으로 가장 높았으며, 교환성 Ca과 Mg은 성판악 흰땃딸기 비자생지에서 각각 1.32 cmol^+/kg 과 0.09 cmol^+/kg 로 가장 높았다. 교환성 Na는 모든 조사지에서 0.02 cmol^+/kg 로 함량이 매우 낮았다. 고와 강(2012)에 의하면 한라산국립공원 탐방로 평균 교환성 K 0.25 cmol^+/kg , Ca 0.69 cmol^+/kg , Mg 0.19 cmol^+/kg 및 Na 0.06 cmol^+/kg 으로 보고한바 있다. 농촌진흥청은 재배품종 딸기의 적정 토양화학성으로 K 0.7~0.8, Ca 5.0~6.0, Mg 1.5~2.0 cmol^+/kg 으로 보고하였다(Table 7).

고와 강(2012)은 양이온교환용량은 토양비옥도를 나타내는 하나의 지표인자이다. 양이온교환용량이 클수록 양분보유능이 커지고 토양의 완충능이 커지며 양분을 보관하여 식물이 필요시에 공급할 수 있는 능력이 더 커지는 특성을 갖고 있으므로 곳자왈 식생의 효율적 관리나 보호를 위한 중요한 지표이며, 제주도 화산회토는 난분해성 유기물의 집적으로 유기물 함량이 매우 높고 양이온교환용량도 매우 높다고 보고하였다. Shin(1978)은 제주도 화산회토가 양이온교환용량은 높으나 염기 용탈이 일어나는 토양특성으로 교환성양이온 함량도 낮다고 보고한바 있다. 양이온교환용량은 어리목 흰땃딸기 자생지에서 33 cmol^+/kg 으로 가장 높았으며, 평균적으로 자생지와 비자생지는 각각 22.52 cmol^+/kg 과 22.55 cmol^+/kg 으로 차이가 없었다(Table 7). 한라산국립공원 탐방로 표토의 평균 CEC는 20.98 cmol^+/kg 으로 보고하였다(고와 강, 2012).

Table 7. Chemical properties of the soil around *F. nipponica*

Site	Habitat status	pH	EC (ms/cm)	OM (%)	P ₂ O ₅ (mg/kg)	T-N (%)
E*	Habitat	4.34e	1.08a	24.52a	14.2b	0.35c
	Non	4.92b	0.20d	12.58c	4.3d	0.45a
	Average	4.63	0.64	18.55	9.3	0.59
S	Habitat	4.74c	0.46b	9.05d	28.1a	0.26e
	Non	4.73c	0.41c	14.24b	10.3c	0.38b
	Average	4.73	0.44	11.65	19.2	0.32
G	Habitat	5.24a	0.08f	6.46e	10.0c	0.21f
	Non	4.56d	0.14e	13.33bc	1.4e	0.32d
	Average	4.90	0.11	9.90	5.7	0.27
O		6.0~7.0	2 Below	2.5~3.0	350~500	-

Site	Habitat status	Exchangeable cations (cmol ⁺ /kg)				
		K	Ca	Mg	Na	CEC
E*	Habitat	0.24a	0.67b	0.05b	0.021b	33.00a
	Non	0.11d	0.32c	0.02c	0.019c	21.80c
	Average	0.17	0.49	0.04	0.020	27.40
S	Habitat	0.17b	0.68b	0.06b	0.023a	18.49d
	Non	0.18b	1.32a	0.09a	0.021b	23.36b
	Average	0.18	1.00	0.08	0.022	20.92
G	Habitat	0.14c	0.60b	0.06b	0.025a	16.06e
	Non	0.11d	0.21c	0.02c	0.020c	22.51bc
	Average	0.12	0.40	0.04	0.022	19.28
O		0.7~0.8	5.0~6.0	1.5~2.0	-	-

The different letters in column indicate significantly difference at $p < 0.01$ by Duncan's multiple range test.

*E, Eorimok trail 1,600m; S, Seongpanak trail 1,800m; G, Gwaneumsa trail 1,400m; O, Optimum level of chemical propertieson(Rural development administration)

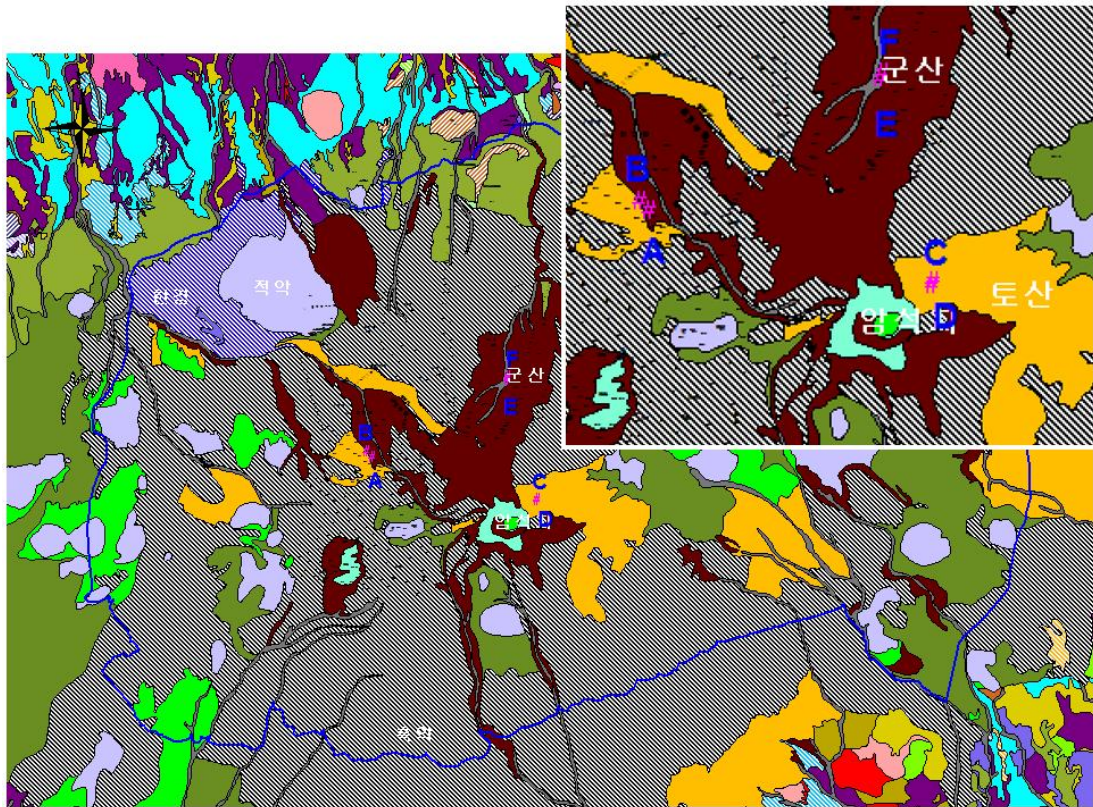


Fig. 5. Soil series of Mt. Halla.

3) 자생지 식생 조사

흰뚨딸기(*Fragaria nipponica* Makino)의 자생지 식생을 알아보기 위해 2016년 6월부터 2017년 9월까지 한라산 어리목, 성관악, 관음사 탐방로 주변에서 현지조사를 실시한 결과 136개 위치의 자생지를 확인하였으며, 조사구역 중 가장 낮은 곳은 관음사 탐방로 1,397 m였고, 가장 높은 곳은 성관악 탐방로 1,810 m였다. 어리목 탐방로인 경우 흰뚨딸기는 독립개체 형태로 분포하고 있다. 30개체 이상 자생하는 지역은 성관악 3곳, 관음사 1곳을 확인하였으며(Fig. 2), 그 지역을 조사구로 선정하여 방형구(1×1) 조사를 실시한 결과 2017년에는 4월 10일경에 지상부가 출현하여 포복경 번식을 한 후 6월 10일경부터 개화하여 6월 25일경 열매 결실을 시작하여 7월 23일까지 약 1개월 동안 열매를 확인하였다(Fig. 6).

고(2000)는 백록담 일대 초본성 고산식물은 종자가 성숙하는데 1개월 정도 소요되어 짧은 기간의 종자 발달 시기를 갖는다고 보고하였는데 흰뚨딸기도 일반

적인 초본성 고산식물의 종자 성숙기간과 비슷한 1개월 정도의 기간 동안 열매를 확인할 수 있었다. 개화를 하지 않은 개체의 경우는 계속하여 포복경 번식을 하였으며, 2016년에는 개화는 확인하였으나 열매는 확인하지 못하였고, 2017년에는 성판악 탐방로에서만 열매를 확인하여 흰땃딸기가 5월에 개화한다는 문헌들과 차이를 보였다(이, 1996; 이, 2014). 고(2000)는 한라산의 초본성 고산식물 중에서 설앵초가 가장 빠른 개화로 5월 하순에 개화하여 6월 20일경에 만개했다고 보고하여 본 연구의 흰땃딸기와 비슷한 시기에 개화하는 것으로 생각되었으며, 이러한 기존의 고산식물에 대한 연구결과와 본 연구결과를 비교해 보면 흰땃딸기는 한라산에서 빠른 개화를 하는 식물에 속하는 것으로 생각된다.

고(2000)는 한라산 고산식물의 생장은 전체적으로 4월 초순부터 시작되어 8월 중순까지 이루어졌으며, 잎의 주요 성장 시기는 6월에 집중적으로 이루어지며, 종에 따라 다소 차이는 있으나 잎의 성장일수는 주로 30~60일 사이로 나타나 비교적 짧은 성장시기를 갖고 있다고 하였다. 또한 초본인 구름떡쑥(*Anaphalis sinica* var. *morii*), 섬바위장대(*Arabis serrata* var. *hallaisanensis*), 한라개승마(*Aruncus aethusifolius*)가 가장 이른 시기인 4월 초순에 신초가 출현하여 7월 중순까지 생장이 이루어져 흰땃딸기와 비슷한 시기에 신초가 출현하였으며, 구름떡쑥, 한라솜다리(*Leontopodium hallasanense*), 섬바위장대, 한라개승마, 두메대극(*Euphorbia fauriei*) 등이 6월에 개화하여 흰땃딸기와 비슷한 시기에 개화하는 것으로 보고하였다.

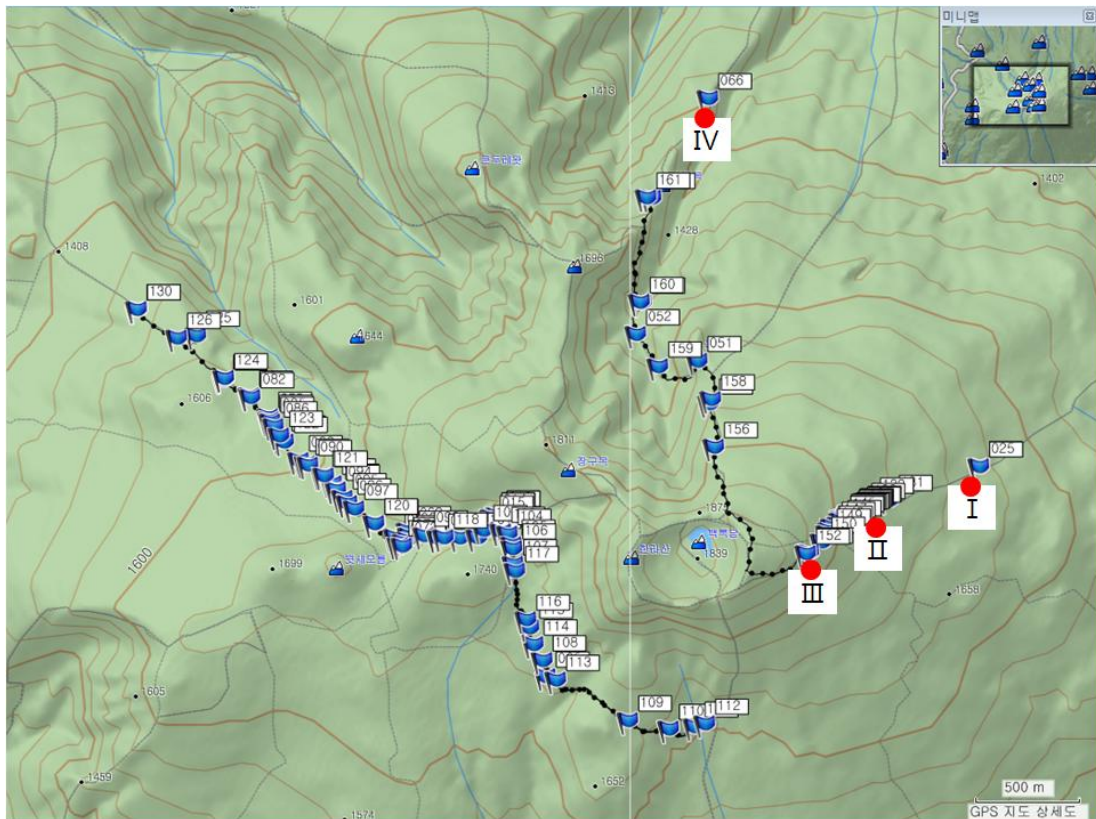


Fig. 6. *F. nipponica* investigation areas(●) on a map.

I, Seongpanak 1; II, Seongpanak 2; III, Seongpanak 3; IV, Gwaneumsa.



< Flower(2017.06.11) >

< Fruit(2017.07.09) >

Fig. 7. Flower and fruit of *F. nipponica*.

방형구(1×1) 조사를 실시한 결과 성판악 1 조사구 해발 1,682 m로 김의털, 계박취나물 등 총 11종이 분포하였고, 성판악 2 조사구는 해발 1,776 m로 제주양지꽃, 평의밥 등 9종, 성판악 3 조사구는 해발 1,810 m로 최고 고도였으며, 호장근, 뱀툼 등 9종, 관음사 조사구는 해발 1,397 m로 최저 고도였으며, 산수국, 호장근 등 10종이 분포하였다(Fig. 8).

1974년부터 2005년 한라산국립공원 한라산 탐방객은 총 10,163,133명이며, 그 중 탐방객 비율은 어리목이 47.4%, 영실 32.2%, 성판악 17.6%, 관음사 2.8%로 관음사의 탐방객은 미비하였다(제주도, 2006). 이에 따라 관음사 탐방로 중간에 자생하는 흰뺨딸기의 경우 자생지 훼손이 다른 지역에 비해 덜한 것으로 생각된다. 하지만, 최근 2014년에서 2016년의 총 탐방객은 경우 총 3,487,831명으로 급증하였는데, 탐방로별 탐방객이 차지하는 비율은 어리목 탐방로가 36%, 성판악 탐방로가 33%, 영실 탐방로가 27%, 관음사 탐방로가 4%, 돈내코 탐방로가 1%로 이전에 비해 성판악에 대한 탐방객이 급증하였고 관음사 또한 탐방객이 증가하는 추세이다(공공데이터포털, Table 8). 조사지인 성판악 탐방로의 자생지인 경우 탐방로에 목재데크 시설이 설치되어 있으며, 흰뺨딸기의 자생지 역시 탐방로 밖에 위치하며 탐방객이 탐방로 밖으로 출입하기 힘든 여건이어서 탐방객에 의한 자생지 훼손은 낮을 것으로 생각되며, 2017년에도 지속적으로 설치되고 있는 것을 확인하였다. 어리목의 경우 탐방객이 언제든지 탐방로 외부로 출입이 가능한 조건이며, 관음사인 경우 목재 데크시설을 확충하고 있지만 왕관릉에서 정상까지의 부분을 중점으로 설치하여 주로 왕관릉 아래쪽에 분포하는 흰뺨딸기는 탐방객의 답압에 의한 인위적인 자생지 훼손이 발생할 수 있을 것으로 생각된다(Fig. 9).

흰뺨딸기 자생지의 생태적인 위협요인으로는 한라산에서 우점하고 있는 제주조릿대가 가장 심각하다. 김과 정(2017)은 한라산 천연보호구역 내 해발 1,400 m 이상 지역은 21.55 km²로 이중 제주조릿대가 분포하는 면적은 19.03 km²로 확인되어 전체면적의 약 88.3%를 점유하며, 분포 특성으로 한라산 분화구 주변, 계곡 기저부 및 암반지역, 습지, 인공시설물 구역을 제외한 거의 전 지역에 분포한다고 보고하여 흰뺨딸기의 서식처는 점차 줄어드는 상황이다.

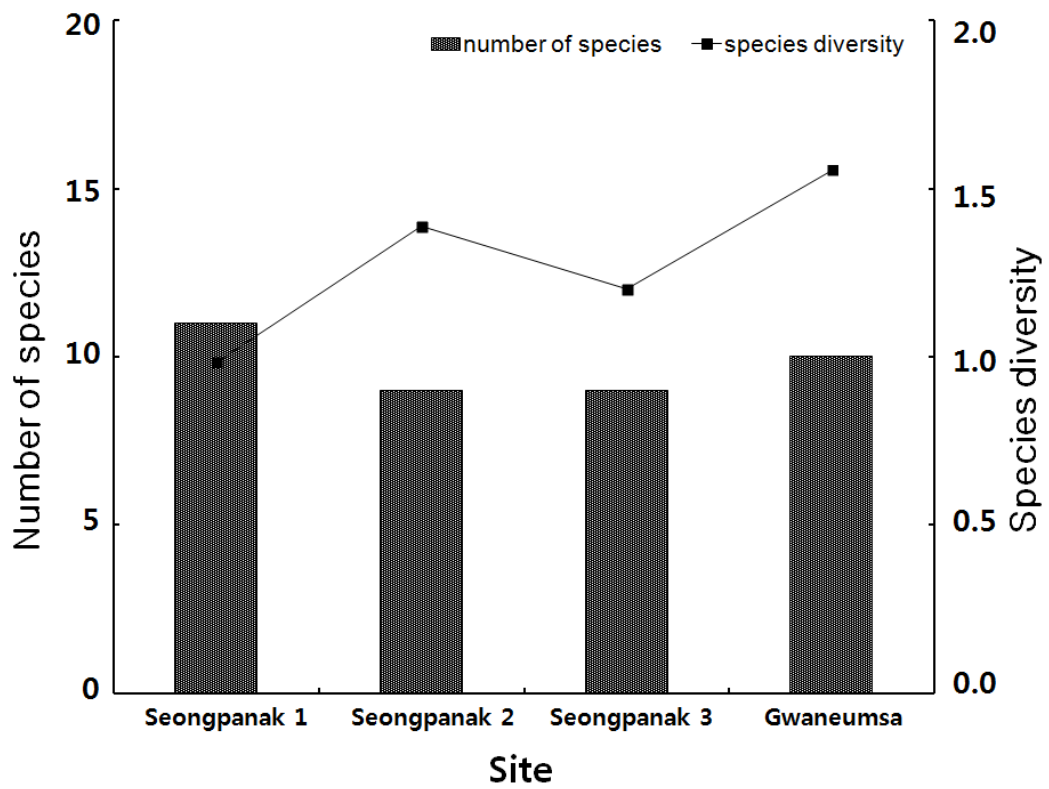


Fig. 8. Number of species and species diversity index.

Table 8. Number of yearly climbers of Mt. Halla

trail \ year	Eorimok (person)	Yeongsil (person)	Seongpanak (person)	Gwaneumsa (person)	Donnaeko (person)
2014	393,959	272,719	418,273	67,685	13,566
2015	409,712	311,099	462,227	65,689	7,004
2016	381,035	284,188	350,548	43,160	6,967
ratio(%)	36 (1,184,706)	27 (868,006)	33 (1,231,048)	4 (176,534)	1 (27,537)
Total (person)	3,487,831				



< Seongpanak trail >



< Gwaneumsa trail >



< Eorimok trail >

Fig. 9. *F. nipponica* natural habitat of Mt. Halla trails.

4) 엽록소 함량 조사

흰뚨딸기의 한라산 자생지를 고도별로 엽록소함량을 SPAD 값으로 조사한 결과 해발 1,776 m가 30.2로 가장 높은 수치를 나타냈으나 해발 1,682 m가 29.0으로 큰 차이를 보이지 않았으며, 해발 고도가 가장 높은 해발 1,810 m는 24.4로 엽록소 함량이 가장 낮게 조사되었다(Fig. 10).

Table 9.에서 보면 전체적으로 개화하여 열매가 성숙해가면서 엽록소 함량은 줄어들었는데, 윤(1992)과 Nafziger and Koller(1976) 그리고 Neales and Incoll(1968)의 연구결과와 비슷한 경향이였다. 흰뚨딸기의 영양생장이 활발하게 진행되면서 잎에 축적된 동화산물이 잎에서 꽃과 열매로 이동하면서 줄어드는 것으로 생각되는데, 윤 (1992)은 딸기 품종인 ‘보교조생’의 생육 단계별 광합성 특성을 조사한 결과 개화와 결실을 하면서 잎의 동화산물이 꽃과 열매로 이동하면서 엽록소 함량이 줄어들고, 과실을 수확한 후에는 과실의 비대에 이용되던 동화산물이 엽으로 다시 전류됨으로서 광합성 활성이 다시 촉진되었다고 보고하였고, Nafziger and Koller(1976)과 Neales and Incoll(1968)는 생육말기의 작물에서는 잎의 생장이 둔화되고 엽육세포의 크기와 수가 점차 증가하고, 엽록체구조에 상당한 양의 전분이 축적됨으로서 여러가지 메카니즘을 통하여 광합성의 활성을 방해하기 때문에 감소한다고 보고하여 이러한 결과를 뒷받침한다.

그러나 가장 열매가 성숙한 시기인 7월 9일에는 1,682 m인 경우 유일하게 엽록소 함량이 증가하였는데, 이는 개화는 하였지만 열매가 결실하지 않아 열매로 가야할 동화산물이 잎으로 축적된 현상으로 생각된다.

그리고 SPAD 값과 고도별로 Pearson 상관관계 분석 결과 1% 유의수준에서 부의상관($r=-0.272$, $p<0.01$) 관계로 분석되어 흰뚨딸기의 엽록소는 날짜와 고도별로 밀접한 관련이 있는 것으로 분석되었다.

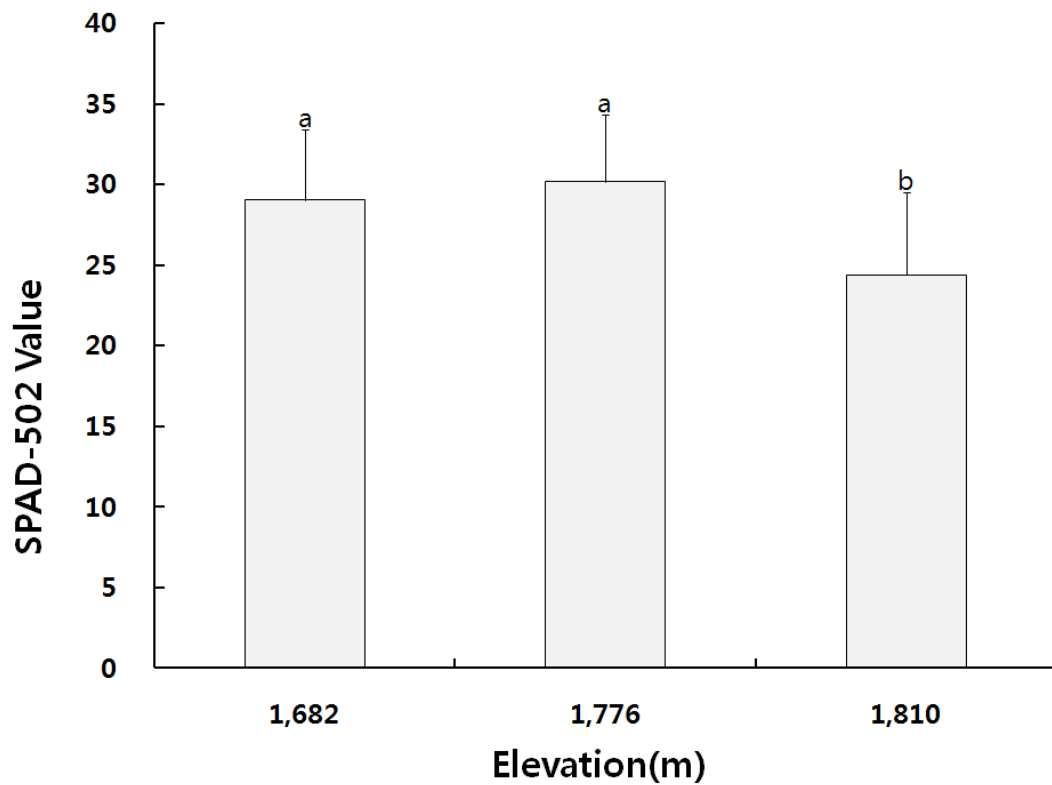


Fig. 10. Comparison of the SPAD value of *F. nipponica* according to elevation(June and July average).

The different letters in column indicate significantly difference at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 9. Comparison of the SPAD-502 value of *F. nipponica* in height by altitude and date

	Elevation(m)			Average
	1,682	1,776	1,810	
2017.06.18	28.2±4.2a	32.3±3.3a	26.6±5.2a	29.0
2017.06.25	28.4±4.5a	31.6±3.0a	25.6±3.7b	28.5
2017.07.09	30.5±4.4a	26.6±4.0a	21.0±4.9b	26.1
Average	29.0	30.2	24.4	

The different letters in column indicate significantly difference at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

2. 흰땃딸기의 총 폴리페놀, 플라보노이드 및 DPPH radical 소거활성

흰땃딸기의 향후 이용가능성을 알아보기 위해 기능성 성분인 총 폴리페놀과 플라보노이드 등의 함량과 DPPH radical 소거활성을 조사하였다.

1) 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

흰땃딸기의 향후 이용가능성을 확인하기 위하여 기능성 물질인 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 조사하였는데, 한라산에서 자생하는 흰땃딸기의 열매시료를 구할 수 없어서 식물체를 분석하기 위해 흰땃딸기의 포복경을 채취하여 분석에 이용하였다. 분석 결과는 Table 10에서 보는 바와 같다.

Hannum(2004)에 의하면 딸기는 맛과 향, 외관이 좋으며, 엘라그 산(폴리페놀)과 플라보노이드와 같은 항산화물질을 다량 함유하고 있다고 하였는데, 폴리페놀 화합물에 대해서 Kim(2010)은 항산화, 항암, 충치 예방 등의 기능적 활성을 가진다고 하였고, 플라보노이드 성분에 대해서 Kim et al.(2012)은 항산화를 비롯하여 여러 생리활성 기능을 가지고 있는 것으로 보고한 바 있다.

추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과값은 시료 1 g에 대한 mg · gallic acid equivalents(GAE)로 나타냈으며, 추출물의 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과값은 시료 1 g에 대한 총 플라보노이드는 시료 1g에 대한 mg · quercetin

acid equivalent per sample(QE)로 나타내었는데, 흰뺨딸기 포복경을 분석한 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 총 폴리페놀함량은 70.75 mg·GAE/g, 총 플라보노이드는 5.93 mg·QE/g으로 조사되었다.

김 등(2012a)이 자생식물 26종에 대하여 총 폴리페놀 및 플라보노이드를 측정 한 결과와 비교해보면 산딸나무의 폴리페놀함량이 70.39 mg·GAE/g을 보여 흰뺨 딸기의 분석결과와 비슷한 수준을 보였다.

Table 10. Total phenol and flavonoid contents of methanol extracts of *F. nipponica*

Sample	Total phenol (mg·GAE/g) ¹⁾	Total flavonoids (mg·QE/g) ²⁾
30% Ethanol(Extract)	70.75 ± 1.42	5.93 ± 0.27

1) mg·GAE/g, mg·gallic acid equivalent per sample 1 mg.

2) mg·QE/g, mg·quercetin acid equivalent per sample 1 mg.

2) DPPH radical 소거활성

흰뺨딸기의 항산화 활성을 평가하기 위해 DPPH radical 소거활성은 Blois(1958)의 방법을 변형하여 이용하였는데, DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical 소거활성은 항산화 물질로부터 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제시키는 척도로 사용되고 있을 뿐만 아니라 인체 내 free radical에 의한 노화를 억제시키는 작용의 척도로 사용함으로써 실제 항산화 활성과 높은 연관성이 있다(Blois, 1958). 그리고 합성 항산화제인 BHT를 대조구로하여 흰뺨딸기의 DPPH radical 소거활성을 측정한 결과 Fig. 11에서 보는 바와 같이 저농도에서는 흰뺨딸기가 BHT보다 DPPH radical 소거활성이 낮았으나 500 $\mu\text{l/ml}$ 이상의 농도에서는 합성 항산화제인 BHT와 비슷한 DPPH radical 소거활성을 나타냈다(Fig. 11).

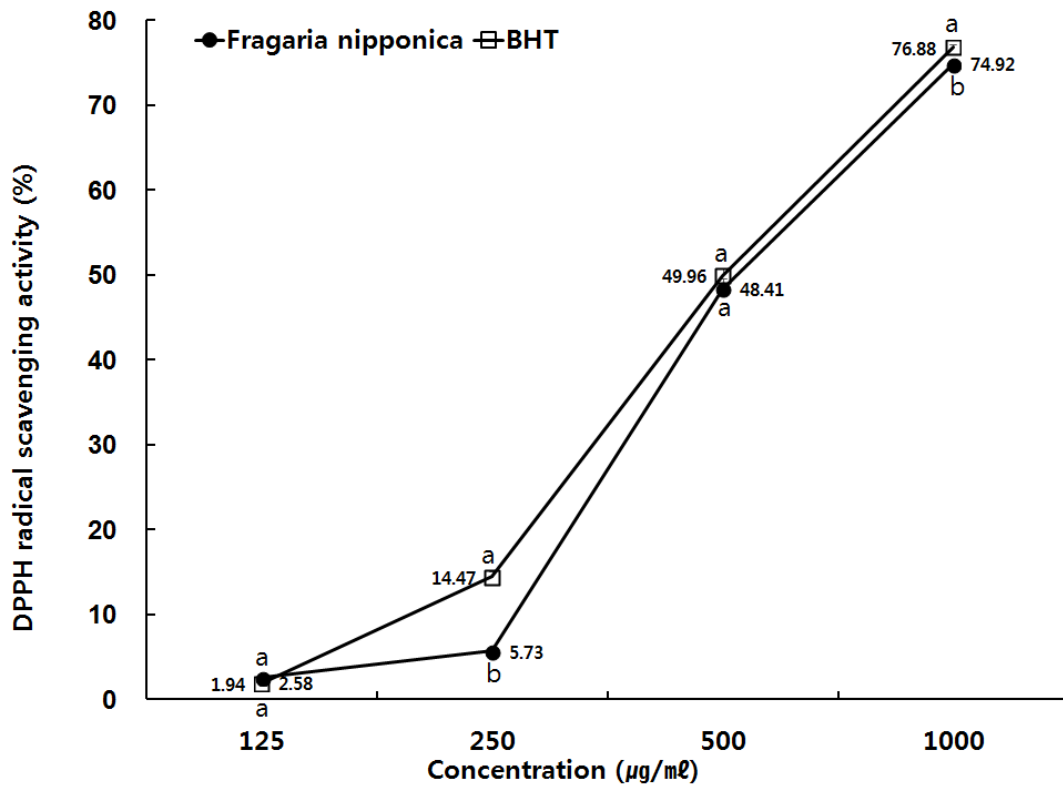


Fig. 11. DPPH radical scavenging activities of organic solvent extract from *F. nipponica*.

The different letters in column indicate significantly difference at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

3. 흰뺨딸기의 기내 배양을 위한 기초연구

1) 흰뺨딸기의 종자 발아 조사

흰뺨딸기의 열매 특성을 알아보기 위하여 2017년 7월 한라산 성판악, 관음사 탐방로에서 3주에 걸쳐 열매를 채취하여 열매 특성을 조사한 결과는 Table 11에서 보는 바와 같다. 육안으로 확인된 흰뺨딸기 열매 23개의 평균 크기는 가로 6.78 ± 0.95 mm, 세로 8.43 ± 1.41 mm였으며, 평균 종자 수는 33.13 ± 8.50 개였다. 그러나 이(2014)는 흰뺨딸기의 열매는 겉에 털이 약간 있고 지름 10 mm로서 난상 원형 또는 구형이며 먹을 수 있다고 하였는데 열매 크기인 경우 본 조사 결과와 약간의 차이를 보여서 지속적인 조사가 필요할 것으로 생각되었다.

채집한 흰뺨딸기의 열매에서 과육을 분리하여 종자를 정선 후 총 762립의 종자를 얻었으며, 이 종자들에 대해 발아 실험을 실시하였다. 그 결과 파종 후 43일까지 96.1%가 발아하였으며, 파종 후 10일이 경과하였을 때 45.3%, 20일째에는 87.3%, 30일째에는 93.4%가 발아하였다. 평균발아일수는 12.8일이 소요되었다. 위와 같은 결과는 김 등(2012b)이 딸기 재배 품종인 '설향'에 대한 발아 실험 결과에서 NaOCl 농도가 높을수록 종피의 지나친 상처로 인하여 발아율이 저조하므로 20°C 조건에서 2% NaOCl을 4~8시간 내외로 처리하는 것이 발아율 향상에 적절하다고 보고하였는데 같은 결과를 나타냈다.

Table 11. Number of seeds per *F. nipponica* fruit and their diameter and length

Fruit size(mm)		The number of seeds per fruit (ea)
Diameter	Length	
6.78 ± 0.95	8.43 ± 1.41	33.13 ± 8.50

Table 12. Germination ratio and MGT(Mean germination time) of *F. nipponica*

Germination ratio(%)				MGT(day)
Total	After 10 day	After 20 day	After 30 day	
96.1	45.3	87.3	93.4	12.8

2) 효율적인 기내배양을 위한 배지의 적정 조건

흰맛딸기의 기내배양 적정조건을 찾기 위해 배지종류와 배지의 적정 염농도 및 sucrose 농도 등의 시험을 수행하였으며, 그 결과는 아래와 같다.

(1) 배지 종류

사용한 배지종류에 따라 식물의 성장과 발달에 미치는 영향이 서로 다르기 때문에 식물종과 배양체의 종류에 따라 성장량에 적합한 배지의 선정이 필요한데 (최, 2012), 한데, MS배지, Gamborg B5배지, White배지 등 몇 가지 배지를 사용하여 흰맛딸기의 적정 배지를 찾고자 시험을 한 결과는 Table 13에서 보는 바와 같다.

기내배양 시 배지 종류에 따른 기내식물의 생육특성을 살펴보면 신초 길이는 MS배지가 28.00 mm로 가장 길었으며, Gamborg B5배지 16.42 mm, White배지 19.25 mm로 약 3mm차이로 비슷하였다. 이와 같은 결과는 Choi(1997)가 배지 내에 함유된 질소질이 세포성장 및 유기물 합성에 밀접한 관계를 갖고 있으며, 질소의 형태 및 농도에 의하여 기내 식물체의 생육이 크게 좌우된다고 하였으며, Choi(1997)와 Leifert et al.(1992)의 신초 길이는 질소함량이 많을수록 길어진다는 보고와 일치하였다.

관부직경은 MS배지가 1.07 mm, Gamborg B5배지 1.12 mm, White배지 1.05 mm로 차이가 없었으며, 줄기 수와 엽수 또한 각각 MS배지 6.1개, 12.3개 Gamborg B5배지 1.1개, 6.2개, White배지 6.0개, 12.2개로 차이가 없었다. 엽장의 경우 MS배지가 6.83 mm로 가장 길었고 White배지 4.92 mm, Gamborg B5 4.00 mm로 순으로 짧았으며, 엽폭의 경우 White배지 4.58 mm MS배지 4.42 mm, Gamborg B5 3.42 mm 순으로 짧았다.

뿌리수의 경우에도 White 배지가 10.0개로 MS배지와 Gamborg B5 배지에 비해 가장 많았으나 큰 차이는 없었다. 반면 뿌리길이는 MS배지가 18.17 mm로 가장 길었으며, White배지의 8.50 mm Gamborg B5 1.25 mm로 가장 짧았다. 뿌리수에서는 차이가 없었으나 뿌리 길이에서 월등한 차이로 인해 MS배지가 순화 시 뿌리의 활착이 가장 빠를 것으로 생각되었다. 발근은 질소원과 농도에 상당히 큰 영향을 받는데 *Eucalyptus marginata*의 경우 각 질소 형태별로 단독 처리한 것보다 $\text{NO}_3\text{-N}$ 와 $\text{NH}_4\text{-N}$ 의 비율을 2:1로 처리하였을 때 가장 효과적으로 발근이 되었고(Woodward et al., 2006), 혐오갈피 부정근 배양에서 $\text{NH}_4\text{-N}$ 의 비율이 $\text{NO}_3\text{-N}$ 보다 높은 처리구에서 부정근의 생장이 감소하였다는 보고(이, 2009)와 딸기 토양재배 시 근권에 질소질 비료를 시비하였을 때 $\text{NO}_3\text{-N}$ 와 $\text{NH}_4\text{-N}$ 를 혼합 시비한 것이 뿌리 발생이 가장 좋았다는 보고(Sas et al., 2003)로 미루어 보아 본 실험에서 사용된 배지들 중에서 MS배지가 $\text{NO}_3\text{-N}$ 와 $\text{NH}_4\text{-N}$ 의 비율이 2:1로 함유되어 있기 때문에 뿌리의 생육량이 많았던 것으로 생각되었다.

생체중과 건물중도 MS배지에서 58.33 mg, 12.05 mg으로 Gamborg B5 30.00 mg, 5.83 mg, White배지의 28.33 mg, 6.67 mg에 비해 더 무거웠다. 또한 생체중에 대한 건물중의 비율(D/F율)은 MS배지가 21.43%, White배지가 23.53%로 오히려 높았다.

이상의 결과로 보아 White배지는 MS 배지에 비하여 D/F율은 높으나, 신초 길이와 뿌리 길이 등 성장량이 적어 부적합하며, MS배지가 D/F율이 낮으나 신초 길이, 뿌리 길이 등이 비교적 높고 엽장, 엽폭 등의 성장량에서 큰 차이를 보이지므로 흰땃딸기의 기내배양 시 가장 적합하다고 생각되었다.

Table 13. Growth characteristics of *F. nipponica* as affected by different media types

Media	Shoot length (mm)	Crown diameter (mm)	No. of stems (ea)	No. of leaves (ea)	Leaf length (mm)	Leaf width (mm)
MS	28.00±5.69a	1.07±0.32a	6.1±1.1a	12.3±3.8a	6.83±0.94a	4.42±0.79ab
Gamborg B5	16.42±4.80b	1.12±0.34a	6.2±1.1a	12.8±4.0a	4.00±1.04c	3.42±1.00b
White	19.25±4.37b	1.05±0.27a	6.0±0.7a	12.2±3.7a	4.92±0.79b	4.58±1.83a

Media	No. of roots (ea)	Root length (mm)	Fresh weight (mg)	Dry weight (mg)	D/F rate (%)
MS	8.1±2.8a	18.17±7.98a	58.33±24.80a	12.05±2.03a	21.43
Gamborg B5	7.6±3.1a	1.25±0.45c	30.00±11.28b	5.83±0.97b	19.44
White	10.0±3.4a	8.50±3.23b	28.33±12.67b	6.67±0.34b	23.53

The different letters in column indicate significantly difference at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(2) 배지 농도

위의 걱정 배지종류 구명시험 결과 흰땃딸기의 기내배양용으로 적정한 MS배지를 가지고 걱정 농도를 구명하기 위해 표준농도와 1/2배 농도 및 2배의 농도 처리를 하여 시험을 한 결과는 Table 14에서 보는 바와 같다.

신초 길이는 기준농도 1배에서 28.00 mm로 가장 길었으며, 2배 25.00 mm, 1/2배 24.92 mm로 짧아졌으나 큰 차이를 보이지 않았다. 관부직경, 줄기수, 엽수에서도 큰 차이를 보이지는 않았으나 엽장에서 기준농도의 1배에서 6.83 mm로 가장 컸으며, 2배 6.27 mm, 1/2배 5.42 mm 순으로 길이가 작아졌다. 뿌리수의 경우 1/2배가 11.3개로 가장 많았고, 2배가 4.7개로 기준농도 1배의 8.1개보다 3.4개 더 적었다. 뿌리 길이인 경우 1배에서 18.17mm로 가장 길었으며, 1/2배 9.08 mm, 2배 5.64 mm로 작아졌다. MS배지 농도가 높아짐에 따라 뿌리수가 적어지고, 뿌리길이는 기준농도에서 가장 길었다가 짧아지는 경향이였다.

MS 기본배지는 생체중이 58.33 mg, 건물중이 12.50 mg로 1/2배에 비해 낮았으나 D/F율이 21.43%로 다른 농도보다 가장 높았으며, D/F율이 높으면 조직이 견고하여, 외부환경에 대한 적응성이 높아진다는 보고(Juan et al., 1995)와 같이 MS배지의 걱정 농도는 1배인 것으로 확인되었다.

배지 내 존재하는 고농도 염에 의해 수분포텐셜이 낮아져 세포가 배지로부터 세포분열과 팽창에 필요한 물과 무기양분의 흡수가 억제되어 성장량이 감소하며 (Lee et al., 2016), 딸기는 염류장해에 가장 약한 작물로서 기내배양액의 비료농도에 큰 영향을 받는다(김, 2011). 사계성 딸기 고설 수경재배 시 생육초기의 배양액 농도는 0.6 dS/m^{-1} 후기에는 1.2 dS/m^{-1} 가 적당한 것으로 보고되었으며 (Lee, 2006), 김(2011)은 사계성 딸기 '고하'에 대한 걱정 배지 실험결과 MS 1배 배지의 EC가 고설 재배 시 걱정 수준인 1.2 dS/m^{-1} 에 비하여 약 5배 이상 높고 2배는 약 8배 이상으로 농도가 급격히 높아지므로 배지의 농도가 높을수록 EC가 상승하여 식물체의 생장이 현저히 감소하는 경향을 보였다는 결과와 비슷하였으며, 흰땃딸기 역시 MS배지 2배에서 지하부 생육이 억제됨으로서 양분흡수가 원활히 이뤄지지 못해 지상부의 성장도 저해 받았을 것으로 생각된다.

Table 14. Growth characteristics of *F. nipponica* as affected by MS medium concentration

nitrate concentration	Shoot length (mm)	Crown diameter (mm)	No. of stems (ea)	No. of leaves (ea)	Leaf length (mm)	Leaf width (mm)
1/2×	24.92±2.87a	0.95±0.22a	6.8±1.1a	15.3±3.5a	5.42±1.44b	4.00±0.95a
1×	28.00±5.69a	1.07±0.32a	6.1±1.1a	12.3±3.8a	6.83±0.94a	4.42±0.79a
2×	25.00±6.84a	0.88±0.22a	6.4±0.8a	14.2±4.0a	6.27±1.79ab	4.45±1.13a

nitrate concentration	No. of roots (ea)	Root length (mm)	Fresh weight (mg)	Dry weight (mg)	D/F rate (%)
1/2×	11.3±4.7a	9.08±5.21b	65.83±39.19a	13.33±4.25a	20.25
1×	8.1±2.8b	18.17±7.98a	58.33±24.80a	12.50±2.03a	21.43
2×	4.7±2.8c	5.64±4.18b	55.45±33.28a	10.91±4.11a	19.67

The different letters in column indicate significantly difference at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(3) Sucrose

기내배양에서 sucrose의 첨가는 배양체의 탄소원과 에너지원으로 사용되고 배지 내 삼투압을 조절하는 요인으로 작용하며(Lee et al., 2006), 식물생장에 적절한 sucrose 농도가 식물종과 유전자형에 따라 각각 다르다고 보고하였다(Brown, et al., 1979). 따라서 배지에 첨가할 적정 당 농도 구명을 위해 sucrose 농도별 처리 실험 결과(Table 15) 신초 길이, 관부직경, 줄기수, 엽수는 농도 간에 큰 차이를 보이지 않았다. 하지만 sucrose 1%에서 27.00 mm, 3% 28.00 mm, 5% 24.58 mm로 5%에서 급격히 신초 길이가 줄어드는 것으로 확인되었다. *Philodendron erubescens*와 *Cordyline terminalis*에서는 4~5%의 고농도 sucrose가 신초 길이 신장에 적당하지만(Maene and Debergh, 1985), *Prunus domestica*(Nowak et al., 2004), 계요등(*Paederia foetida*)(Amin et al., 2003), *Elaeocarpus robustus*(Rohman et al., 2004) 및 알팔파(Stavarek et al., 1980), 사계성 딸기 ‘고하’는 고농도의 sucrose가 오히려 신초 길이의 신장을 저해한다고 보고되었는데(김, 2011) 본 실험의 경우에서도 고농도의 sucrose에서 신초 길이의 신장이 저해되는 것으로 확인되었다.

뿌리길이는 sucrose 3% 농도에서 18.17 mm로 가장 길었다. 5% 14.33 mm, 1% 9.92 mm로 1%에 비해 3% 농도에서 뿌리길이가 약 2배 긴 것으로 조사되었다. 본 실험에서도 생체중은 sucrose 3% 농도까지 증가하였고 5%의 농도에서는 감소하는 경향을 보여 딸기 기내배양 시 최대의 생체량을 얻을 수 있는 적정 농도는 3% 이하임을 알 수 있었고, 건물중과 D/F율의 분석결과 sucrose 3% 농도에서 21.43%로 가장 높았으며, 1%, 5%에서는 각각 20.51%, 20.59%로 비슷하였고, sucrose 3%에서 뿌리의 길이 등이 가장 길었으며, 관부직경이 가장 두꺼워 순화 처리시 가장 적당한 농도라고 생각되었다.

Lipavska and Vreugdenhil(1996)는 식물체의 최적 sucrose 흡수농도는 감자가 sucrose 6%, 밀이 sucrose 4%, 유채가 sucrose 5%로 sucrose의 농도를 높여주면 생체중, 건물중 등의 생체량이 증가한다고 보고하였으나, sucrose의 농도가 높으면 배지 내 삼투압은 식물체에 비하여 상대적으로 높아지고 수분포텐셜은 낮아져 배지의 수분 및 양분이 식물체내로의 흡수가 저해되어 그에 따라 생장도 저해된다고 보고(Lee et al., 2006; Lipavska and Vreugdenhil, 1996; 김, 2011)도

있으며, 이(2009)는 배지 내 sucrose 농도는 배지의 삼투압을 결정한다고 하였는데, 본 실험의 결과 5%의 배지에서 생체중과 건물중 등의 생체량이 감소되어 5%의 sucrose 조건에서 수분포텐셜을 감소시킨 것으로 생각된다. 하지만 이와 반대로 이(2009)는 1% sucrose 조건에서는 배양체의 탄소원과 에너지 공급원으로 사용되는 sucrose의 부족으로 인해 섬오갈피의 부정근의 생장이 억제되고 생체중과 건물중이 낮아졌다는 보고와 같이 본 실험에서도 1% sucrose 조건에서 지하부 등의 생장이 억제되고 저장 양분도 적어 D/F율도 적게 나타난 것으로 생각된다.

Table 15. Growth characteristics of *F. nipponica* as affected by sucrose concentration

Sucrose	Shoot length (mm)	Crown diameter (mm)	No. of stems (ea)	No. of leaves (ea)	Leaf length (mm)	Leaf width (mm)
1%	27.00±4.49a	1.00±0.30a	6.5±0.8a	13.1±3.3a	5.92±0.79b	4.83±0.58a
3%	28.00±5.69a	1.07±0.32a	6.1±1.1a	12.3±3.8a	6.83±0.94a	4.42±0.79ab
5%	24.58±4.81a	0.83±0.28a	6.1±0.7a	12.8±2.4a	5.17±1.11b	4.00±1.21b

Sucrose	No. of roots (ea)	Root length (mm)	Fresh weight (mg)	Dry weight (mg)	D/F rate (%)
1%	8.5±4.5a	9.92±2.91b	32.50±19.60b	6.67±2.66b	20.51
3%	8.1±2.8a	18.17±7.98a	58.33±24.80a	12.50±2.03a	21.43
5%	5.7±2.2a	14.33±6.92ab	28.33±10.30b	5.83±1.30b	20.59

The different letters in column indicate significantly difference at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

4. 배양 방법별 흰뚨팥기의 기내 증식

흰뚨팥기의 기내배양 시 대량증식에 적합한 배양방법을 찾기 위해 고체배양과 액체배양, 통기배양의 처리를 하여 기내 유식물체의 생육특성을 조사한 결과는 Table 16에서 보는 바와 같다. 각 배양방법 별 싌초 길이는 고체배양 28.00 mm, 액체배양 25.60 mm로 었으며, bioreactor 배양에서 33.58 mm로 가장 길었다. 액체배양과 bioreactor 배양의 었수는 각각 11.3개, 10.3개로 고체배양 방법에 비해 생육이 좋았다. 액체배양은 생체중이 308.00 mg, 건물중 40.00 mg으로 가장 높게 나타났으나 bioreactor 배양은 생체중이 151.67 mg, 건물중이 35.83 mg으로 나타냈지만 D/F율이 23.63%로 다른 배양방법에 비해 높았다.

액체배지에서 식물체의 생장 반응은 식물의 속과 종에 따라 다양하게 나타나는데, 친수성 환경에서 잘 자라는 Begonia와 같은 식물은 반고체 배양이나 고체배양보다 액체배양이나 bioreactor 배양에서 생장률이 증가하는 반면, 소수성 환경에서 잘 자라는 딸기와 같은 식물은 반고체배양이나 고체배양에서 생장률이 증가한다(Takayama and Akita, 2008). 그러나 액체배지 내에 공기를 주입하면 소수성 식물종 또한 생장이 활발하게 증가하는 경향(Takayama, 2000; Takayama and Akita, 2008)을 보이기도 하는데, 특히 딸기의 경우 공기주입형 bioreactor를 이용하면 액체배지에서도 식물체의 생장률과 최종 생장량이 증가되고 또한 공기주입량에 따라 생장이 비례적으로 변화한다는 보고(Takayama and Akita, 2008)와 같이 본 싌험에서도 bioreactor 배양 시 지속적으로 공기를 주입해 주었기 때문에 식물체의 지상부 생장량이 증가한 것으로 생각된다.

뿌리 개수와 길이인 경우 고체배양이 8.1개, 18.17 mm로 가장 높게 조사되었으며, bioreactor 배양은 1.3개, 2.08 mm로 가장 적게 조사되었다. 하지만 bioreactor 배양에서 생산된 싌초는 뿌리가 거의 없어도 토양으로 이식 후에 90% 이상의 싌초가 성공적으로 활착했다는 Takayama and Akita(2008)의 보고와 D/F율이 높으면 조직이 견고하여 외부환경에 대한 적응성이 높아진다는 Juan et al.(1995)의 보고를 생각해 볼 때 본 싌험의 bioreactor 배양에서 생산된 흰뚨팥기의 유식물체가 bioreactor 배양에서 뿌리의 수와 길이가 다른 배양방법에 비해 가장 낮았지만 D/F율이 23.63%로 가장 높았기 때문에 기내 유식물체도 토양순화가 잘 될 것으로 생각된다. 그러나 순화 시 뿌리활착을 빠르게 하고 생존율을 높이기 위해

서는 뿌리발달을 유도하는 방법을 모색해야 할 것으로 생각된다.

신초 발생은 액체배양에서 70% 발생하였으며, 고체배양과 bioreactor 배양이 0개로 조사되었다. 식물조직배양에서 gelling agent로 많이 사용되는 plant agar는 배지 내 수분포텐셜의 교질성분으로서의 역할을 하여 agar 농도를 높이면 번식율이 급격하게 감소한다(Debergh et al., 1981)는 보고와 마찬가지로 딸기 조직배양 시 agar를 첨가하는 고체배양에서 신초 증식율이 매우 낮음을 확인할 수 있었다. 또한, Takayama and Akita(2008)는 bioreactor 배양에서 식물체가 항상 움직이므로 정단우세현상이 타파되어 하나의 식물체에서 많은 수의 신초가 발생한다고 하였는데, 본 실험과는 다른 결과를 보여 추후 다양한 실험이 필요할 것으로 생각된다.

Table 16. Growth characteristics of *F. nipponica* as affected by culture method

Culture method	Shoot length (mm)	Crown diameter (mm)	No. of stems (ea)	No. of leaves (ea)	Leaf length (mm)	Leaf width (mm)
Solid	28.00±5.69ab	1.07±0.32b	6.1±1.1b	12.3±3.8b	6.83±0.94a	4.42±0.79b
Liquid	25.60±6.87b	1.37±0.31a	11.3±3.4a	22.6±7.3a	6.70±1.06a	4.50±0.53b
Bioreactor	33.58±8.73a	0.96±0.21b	10.3±3.9a	21.3±9.3a	6.33±0.78a	5.92±2.15a

Culture method	No. of roots (ea)	Root length (mm)	Fresh weight (mg)	Dry weight (mg)	D/F rate (%)	Shoot generation rate (%)
Solid	8.1±2.8a	18.17±7.98a	58.33±24.80c	12.50±2.03b	21.43	0
Liquid	3.7±2.0b	12.00±6.93b	308.00±85.09a	40.00±1.73a	12.99	70
Bioreactor	1.3±0.9c	2.08±1.56c	151.67±88.20b	35.83±16.71a	23.63	0

The different letters in column indicate significantly difference at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

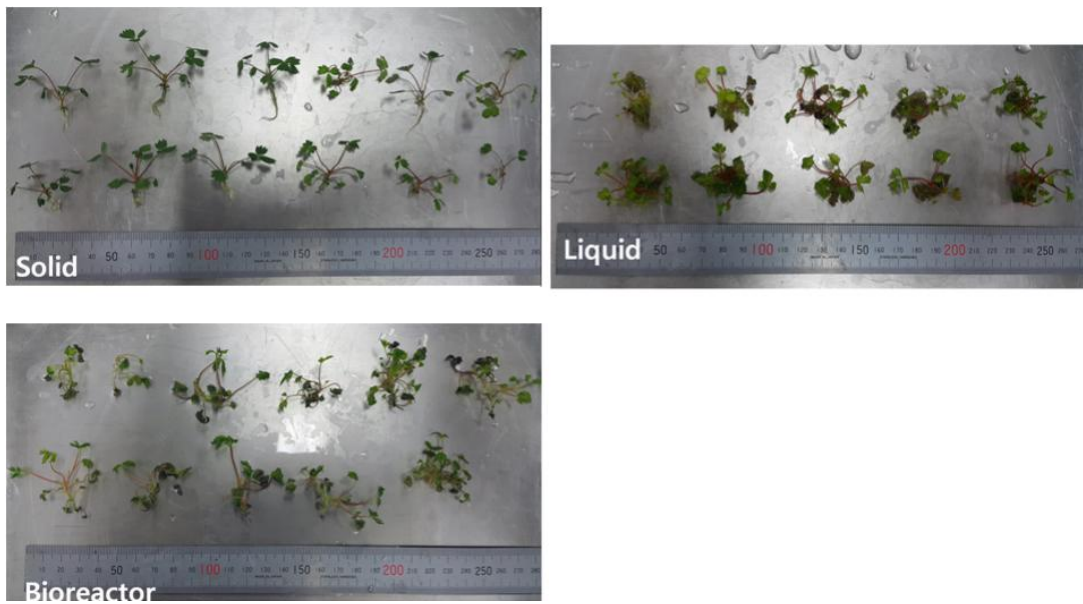


Fig. 12. Growth of *F. nipponica* as affected by culture method.

5. Bioreactor를 이용한 흰맛딸기의 기내 대량증식

흰맛딸기의 기내 대량증식을 위한 bioreactor 배양시 적정 질소질, sucrose, BA, 공기주입량, 배양기간을 구명하기 위하여 본 실험을 실시하였다. 적정 질소질 농도 구명을 위해 MS배지에 사용되는 NH_4NO_3 과 KNO_3 에 대해서 표준농도와 표준의 0.5배 및 2배 농도를 처리하였고, sucrose은 1%, 3%, 5%, BA는 0.1, 0.2 0.4 ppm, 공기주입량은 0.1, 0.2, 0.4 vvm, 배양은 2주, 4주, 6주를 처리하였다.

1) 질소질

질소 화합물의 농도에 따라 기내 유식물체의 성장반응은 Table 17에서 보는 바와 같았다. 생육특성결과 신초 길이, 관부직경, 줄기수는 질소질 농도에 관계없이 모든 처리에서 비슷하였다. 그러나 뿌리수와 뿌리 길이는 질소질 농도가 높아질수록 점차 적어졌는데, 이는 질소질의 농도가 3배 이상 증가할 때부터 딸기 재배 품종인 '고하'의 뿌리길이, 뿌리수, 생체중이 급격히 줄어들었다는 김(2011)의 연구 보고와 비슷하였다. 1배 농도에서 생체중이 151.67 mg로 가장 높았으며, 2배에서 96.00 mg으로 가장 생체중이 낮았으며, 건물중 역시 1배에서 35.83 mg으로 가장 높았으며 1/2배, 2배 순으로 적어졌고, D/F율 역시 1배에서 가장 높게 조사되었다.

Lee(2006)는 딸기는 내염성에 가장 약한 작물로, 재배 시 배양액의 EC가 생육과 매우 밀접한 관계를 갖고 있으며, 사계성 딸기 수경재배 시 배양액의 적정 EC범위는 0.6 dS/m^{-1} 에서 1.2 dS/m^{-1} 이다. 배양액의 EC가 높아지면 뿌리의 발육이 저해되고 뿌리가 갈변되어 최종적으로 지상부 생육이 불량해진다고 보고하였다. 본 실험에서 질소질의 농도가 높아짐에 따라 배지 EC도 상승하였을 것으로 생각되며, 그로 인해 뿌리수와 뿌리길이가 고농도의 질소질에서 현저히 짧아진 것으로 생각된다.

Archambault et al.(1994)은 많은 연구에서 기내배양 시 식물종에 따라 배지를 달리하거나, MS배지의 무기물이나 유기물을 부분적으로 변형해서 사용해왔는데, 무기영양분의 유효성은 고체배양 또는 액체배양 등의 배양방식과 식물생체의 형태와 크기 그리고 배양 시 물리적 성질에 달려있으며, bioreactor 배양은 용기 내 습한 공기가 탈수를 막아주기 때문에 배지 내 영양성분의 수준은 오로지 식물체

의 흡수율과 세포 분해에 의해서만 영향을 받는다. 양치류, 글라디올러스 및 Nerine의 마디를 bioreactor 배양할 경우 1배 MS배지보다 1/2배 MS 배지에서 분화와 증식이 더 잘되었으며, 백합 구근도 같은 경향을 나타냈다(Takayama, 1991). 고무나무의 기내 대량번식에서는 질소원의 종류별 처리와 농도는 신초증식에 중대한 영향을 미치지 않았으나 발근 단계에 영향을 미쳤다(Le Roux and Van Staden, 1991; McComb et al., 1996)는 보고와 딸기 재배품종 ‘고하’의 경우에도 신초의 증식과 MS배지 농도에서는 중대한 영향을 미치지 않으며 농도가 높아질수록 지하부와 신초 발생을 저해했다(김, 2011)고 보고하였다. 본 실험의 결과 질소질 농도가 증가해도 기내 유식물체의 생체 성장량과 신초 발생이 비슷한 것으로 보아 흰뚨딸기도 질소원의 종류 및 농도가 신초 증식에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다. 유칼립투스(Bennett et al., 2003), *Tylophora indica*(Chattopadhyay et al., 1992), 인도 벼(Grimes and Hodges, 1990), 사과(Sriskandarajah et al., 1990)로 조직배양 실험을 한 결과 NH_4NO_3 의 양이 감소하면 뿌리발생이 증가한다고 보고하였는데 본 실험에서도 NH_4NO_3 가 가장 적게 첨가된 1/2배 처리구의 뿌리발생량이 가장 많았고, NH_4NO_3 가 가장 많이 첨가된 2배 처리구의 뿌리 발생량이 가장 적어 같은 결과를 보였다.

Table 17. Growth characteristics of *F. nipponica* as affected by MS medium concentration in bioreactor

Nitrate concentration	Shoot length (mm)	Crown diameter (mm)	No. of stems (ea)	No. of leaves (ea)	Leaf length (mm)	Leaf width (mm)
1/2×	34.58±4.01a	0.97±0.027a	7.8±2.0a	14.1±5.8b	6.25±1.96a	4.17±1.27b
1×	33.58±8.73a	0.96±0.21a	10.3±3.9a	21.3±9.3a	6.33±0.78a	5.92±2.15a
2×	36.00±7.33a	0.99±0.40a	9.2±2.8a	16.6±7.2ab	4.50±1.43b	3.60±1.35b

Nitrate concentration	No. of roots (ea)	Root length (mm)	Fresh weight (mg)	Dry weight (mg)	D/F rate (%)	Shoot generation rate (%)
1/2×	4.4±2.1a	6.17±4.49a	124.17±49.26a	20.83±3.78ab	16.78	0
1×	1.3±0.9b	2.08±1.56b	151.67±88.20 a	35.83±16.71a	23.63	0
2×	0.8±0.9b	1.30±1.70b	96.00±39.21a	12.00±2.65b	12.50	0

The different letters in column indicate significantly difference at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

2) Sucrose

배지내 여러 영양소 중 식물의 에너지원으로 사용되는 탄소원은 조직배양 세포에 있어서 매우 중요한 역할을 하는데 흰뚨딸기의 bioreactor 시 sucrose의 적정농도를 알아보기 위해 1%, 3%, 5%의 농도처리를 하여 시험한 결과는 Table 18에서 보는 바와 같다

배지내 여러 영양소 중 식물의 에너지원으로 사용되는 탄소원은 조직배양 세포에 있어서 매우 중요한 역할을 하며, 배지 내의 구성물질로서 효과적으로 사용되고 있는 탄소원은 sucrose, glucose, fructose이며, 각 식물의 종에 따라 차이가 있으나 대부분의 경우 sucrose가 가장 효과적인 탄소원으로 알려져 있다(Wu and Zhong, 1999).

Sucrose 3%의 경우 관부직경 0.96 mm, 줄기수 10.33개, 엽수 21.25개, 엽장 6.33 mm, 엽폭 5.92 mm, 생체중 151.67 mg, 건물중 35.83 mg, D/F율 23.63%를 보여 1%와 5% 농도 처리에 비해 대부분의 생육형질에서 양호한 결과를 보였다.

생체중은 sucrose 3% 농도처리가 151.67 mg으로 sucrose 1% 농도처리의 약 2 배로 매우 무거웠으며, 신초 발생은 sucrose 5%에서 유일하게 110% 발생하였다.

조직배양에서 당은 세포의 성장과 분화에 영향을 미치는 중요한 요소임(Aloni, 1980; Bofunia and Pryzywara, 1990; Gibson, 2000; Leva et al., 1990; Steinitz, 1999)은 기존에 밝혀졌는데, 일반적으로 배지 내 sucrose 농도가 적정수준 이상일 경우 배지 내 삼투압과 배지의 점도 증가에 의해 배양체가 배지로부터 물과 무기염류 및 탄소원을 흡수하는데 장애를 받아 성장량이 감소한다(Lee et al., 2006; Zhang et al., 1996b). 또한 Ziv and Hadar(1991)는 *Nephrolepis exaltata*(Boston fern)의 배양에서 sucrose의 농도를 0.75-3%까지 증가시키면 양치식물 분열조직 덩어리의 생체량이 증가된다고 보고하였다.

글라디올러스의 경우, sucrose 농도를 3%에서 6%까지 증가시키면 삼투효과에 의해 생체(biomass)의 생체중이 약 50%까지 감소한다고 보고하였다(Ziv, 1992). 그리고 *Lillium*을 bioreactor 배양할 경우, 소인경의 생산수를 높이려면 3%의 sucrose가 적당하다고 보고하였으며(Takayama, 1991), 또한 김(2011)은 딸기 재배품종인 '고하'의 적정 sucrose 농도는 3%라고 보고하였다.

따라서 위의 결과를 종합하면 bioreactor를 이용한 흰뚨딸기의 배양시 sucrose

의 농도 차이는 생체량 증가 및 신초생산에 큰영향을 주었으며, 본 실험에서 bioreactor 배양 시 흰뚨딸기는 sucrose 3% 농도가 최대의 생육량 생산에 알맞은 농도였으며, 이것은 sucrose 농도가 높아짐에 따라 세포의 성장과 분화가 촉진된 것으로 생각된다.

Table 18. Growth characteristics of *F. nipponica* as affected by sucrose concentration in bioreactor

Sucrose concentration	Shoot length (mm)	Crown diameter (mm)	No. of stems (ea)	No. of leaves (ea)	Leaf length (mm)	Leaf width (mm)
1%	20.90±2.85b	0.90±0.22a	8.6±2.7ab	14.9±6.9ab	5.10±1.37b	3.50±0.97b
3%	33.58±8.73a	0.96±0.21a	10.3±3.9a	21.3±9.3a	6.33±0.78a	5.92±2.15a
5%	34.70±8.97a	0.76±0.23a	5.9±2.9b	9.6±4.2b	5.00±1.15b	3.40±1.07b

Sucrose concentration	No. of roots (ea)	Root length (mm)	Fresh weight (mg)	Dry weight (mg)	D/F rate (%)	Shoot generation rate (%)
1%	0.9±1.9a	1.40±2.46b	83.00±49.23a	10.00±3.46b	12.05	0
3%	1.3±0.9a	2.08±1.56ab	151.67±88.20a	35.83±16.71a	23.63	0
5%	1.9±1.2a	4.10±2.77a	109.00±98.71a	17.00±6.08ab	15.60	110

The different letters in column indicate significantly difference at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

3) BA

Bioreactor를 이용한 흰뚨딸기의 대량증식을 위해 성장조정제의 농도효과를 알아보기 위해 shoot의 증식(Stapfer and Heuser, 1984)과 발생(Yoeum et al., 2000)에 효과적인 BA를 농도별로 처리하여 생육반응을 조사하였는데, 그 결과는 Table 19에서 보는 바와 같다

신초 길이의 경우 대조구인 BA 0 ppm에서 33.58 mm으로 가장 길었고 농도가 높아질수록 신초 길이가 짧아졌지만 관부 직경의 경우 0.1 ppm 농도에서 2.21 mm로 가장 두꺼웠다. 이는 신초가 형성되면서 두꺼워진 것으로 생각되며, 줄기수, 엽수, 엽장, 엽폭, 뿌리 개수, 뿌리길이, D/F율에서 대조구가 가장 높게 조사되었다. 하지만 신초 형성율은 BA 0.2 ppm에서 290%라는 결과를 보여 흰뚨딸기의 대량증식을 위해서는 BA 0.2 ppm 농도처리가 매우 효과적일 것으로 생각된다.

일반적으로 기내배양을 통한 식물체의 분화 및 탈분화는 식물의 종에 따라서, 그리고 같은 종 내에서도 품종 및 계통에 따라 차이를 보이는 경우가 많으며, 식물체의 유전자형이나 배양에 이용되는 부위도 중요한 영향을 미치지만 배지의 조성, 배양조건과 방법에 따라서도 배양반응이 크게 달라지는 것으로 알려져 있다(김 등, 1996). 사이토키닌은 보편적으로 지하부의 발육을 억제하고 지상부의 생육을 촉진한다고 알려져 있어(Pennazio, 1975), 식물체의 대량번식에 shoot를 증식시키는데 많이 사용되고 있다.

딸기 기내배양 시 호르몬을 첨가하지 않고 고체배지에 배양할 경우 증식효율이 매우 낮아 생산비용이 많이 드는 단점을 가지고 있어 딸기 bioreactor 배양시 대부분 호르몬을 첨가하여 다량의 신초발생을 유도하였다(Hanhineva and Karenlampi, 2007; Takayama et al., 1985). 그러나 김 등(2015)은 대부분의 딸기인 경우 배수성($2n=8x=56$)이 높아 호르몬을 사용하면 변이개체가 발생할 확률이 높기 때문에 대량증식 시 호르몬 사용에 유의해야 하며, 딸기 재배품종인 ‘고하’에 대한 체세포영양계 변이 발생을 알아보기 위해 실험한 결과 BA 0.5 ppm 이하에서는 3년 내에 유전적 변이가 전혀 나타나지 않았으며, 1.0 ppm 이상에서는 3년차에 2.0%의 변이개체를 확인하였다고 보고하였다. 흰뚨딸기인 경우 2배체이기($2n=2x=14$)(Scott, 1951; Staudt and Olbricht, 2008; Yang and Davis, 2017) 때문에 조직배양시 성장조정제의 사용이나 계대배양시 발생할 수 있는 유전적 변이가 사계성 딸기인 ‘고하’에 비해 더 낮을 것으로 생각된다.

Table 19. Growth characteristics of *F. nipponica* as affected by BA concentration in bioreactor

concentration of BA	Shoot length (mm)	Crown diameter (mm)	No. of stems (ea)	No. of leaves (ea)	Leaf length (mm)	Leaf width (mm)
0ppm	33.58±8.73a	0.96±0.21b	10.3±4.0a	21.3±9.3a	6.33±0.78a	5.92±2.15a
0.1ppm	21.80±4.61b	2.21±0.67a	9.3±3.9b	12.9±5.3b	5.50±2.27a	4.10±1.45b
0.2ppm	18.50±2.95bc	1.09±0.44b	7.0±1.8b	7.8±2.0b	6.40±1.71a	4.40±1.26b
0.4ppm	16.58±3.12c	1.10±0.37b	9.3±3.6b	9.8±3.6b	5.67±1.87a	4.00±1.65b

concentration of BA	No. of roots (ea)	Root length (mm)	Fresh weight (mg)	Dry weight (mg)	D/F rate (%)	Shoot generation rate (%)
0ppm	1.3±0.9a	2.08±1.56a	151.67±88.20a	35.83±16.71a	23.63	0
0.1ppm	0.0±0.0b	0.00±0.00b	148.00±51.16a	13.00±1.73b	8.78	90
0.2ppm	0.4±1.3b	0.20±0.63b	201.00±249.51a	14.00±9.17b	6.97	290
0.4ppm	0.5±1.2b	0.58±1.51b	131.67±57.02a	15.00±3.28b	11.39	0

The different letters in column indicate significantly difference at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

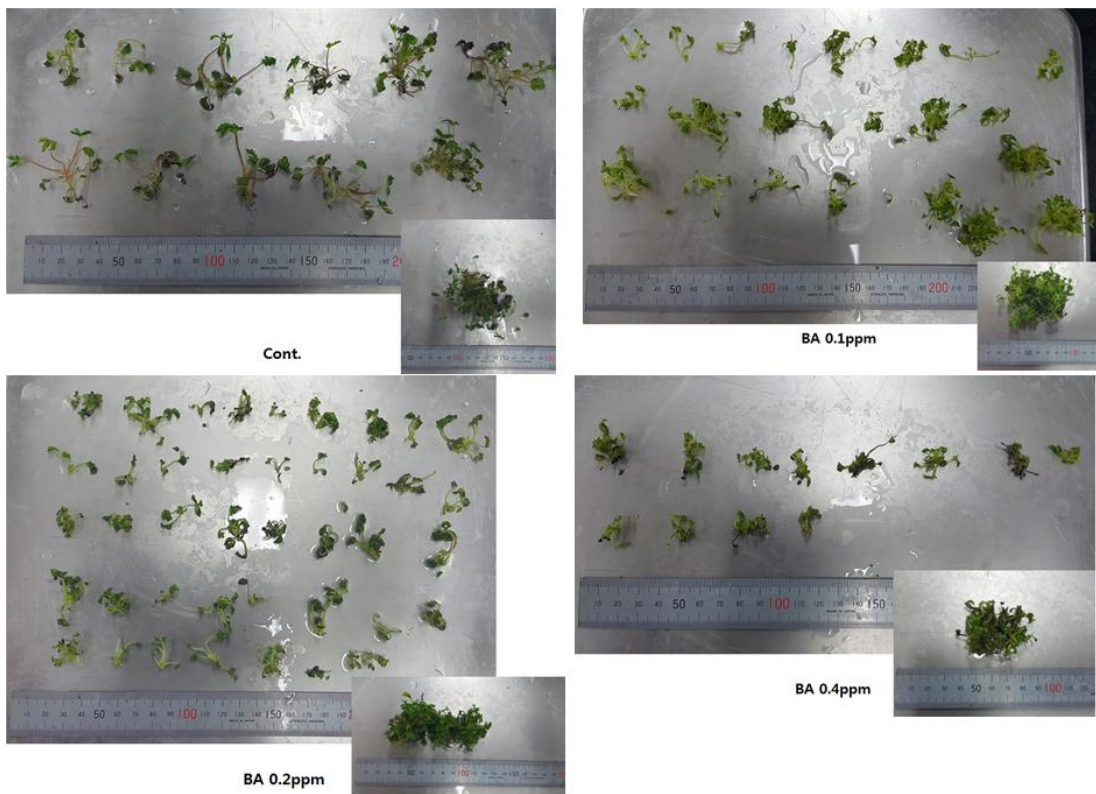


Fig. 13. Growth of *F. nipponica* as affected by BA concentration in bioreactor

4) 공기주입량

산소는 식물체 및 미생물의 성장과 유지에 반드시 필요한 물질이며 (Garcia-Ochoa and Gomez, 2008), 산소는 물에 잘 녹는 성질을 가지고 있지만 액체배지 내의 용해도는 매우 낮다(Doran, 1995). 전단응력에 민감한 식물 세포 배양의 경우 생물반응기 내부로 주입하는 공기 공급량에 따라 유체역학적 스트레스의 강도가 달라지므로 세포 생장의 차이를 나타낸다(Peak et al., 2003; Meijer et al., 1993).

흰뚨딸기의 bioreactor 배양시 적정 공기주입량을 알아보기 위해 0.1 vvm, 0.2 vvm, 0.4 vvm의 공기주입량을 처리한 결과는 Table 20에서 보는 바와 같다. 기내 유식물체의 신초 길이, 관부직경, 줄기수, 엽수, 엽장, 뿌리갯수, 생체중에서 공기량이 높을수록 높은 수치를 나타냈으나 큰 차이를 나타내지 않았다. 신초 길이에서는 0.4 vvm 처리구가 41.08 mm로 가장 길었으며, 0.1 vvm 처리구가 32.80 mm로 가장 짧았다. 신초 발생은 0.4 vvm에서 유일하게 25% 발생한 것으로 조사되었다. 생체중과 건물중은 0.4 vvm 처리구가 229.17 mg 및 30.00 mg으로 가장 무거웠으나 D/F율은 0.2 vvm에서 23.63%로 가장 높게 나타나 0.2 vvm이 적정한 공기주입량으로 생각된다.

Min et al.(2007)은 미치광이풀(*Scoplioa parviflora*) 부정근 배양시 공기공급량이 적정 양 이하일 경우 부정근이 배지 내에 늘 침지되어 있어 부정근의 측근형성이 이루어지지 않고 노화가 빨리 진행되었다고 보고하였으며, 지나치게 많은 양의 공기를 주입 할 경우 전단응력에 민감한 배양체에게 유체역학적 스트레스를 주고(Meijer et al., 1993), 생물반응기 내부에 존재하는 이산화탄소, 에틸렌 또는 높은 용존산소율에 의해 발생하는 휘발성 기체들에 의해 부정근의 성장량과 생리활성물질 축적이 오히려 감소될 수 있다고 하여 적정 공기공급량의 중요성을 강조하였다(Schlatmann et al., 1993).

Bioreactor 내 공기주입량은 식물생장과 밀접한 관계를 갖고 있다고 할 수 있다. 그러나 식물세포는 미생물 세포보다 대사율이 약 2배 가량 낮아 산소요구량이 적기 때문에 일반적으로 공기주입량이 높아지면 생체량 증가폭이 감소한다는 보고(Cazzulino et al., 1991)가 있으며, 식물종과 사용하는 생물반응기의 형태에 따라 적정 공기공급량에는 차이가 있다. 본 실험과 동일한 기포관형 생물반응기

(ballon type bioreactor)를 이용하여 *Morinda citrifolia*(Ahmed et al., 2008)와 *Gymnema sylvestra*(Lee et al., 2006)를 배양한 결과 *Morinda citrifolia*는 공기 공급량을 0.3vvm까지 증가시킬 경우 성장량이 증가하였으나, *Gymnema sylvestra*는 0.2 vvm 이상의 공기를 공급할 경우 성장량이 감소하였다고 보고하였다. 섬오갈피의 부정근에 대한 0.05 vvm~0.4 vvm의 공기주입량이 부정근의 성장량에 큰 차이를 나타나지 않았다고 보고하였으며(이, 2009), 재배종 딸기인 ‘고하’인 경우 0.2 vvm 처리구까지는 전체적인 생체량이 증가하였으나, 0.2 vvm 이상 처리하였을 경우, 생체량이 점점 감소되었다고 보고하였다(김, 2011). 이와 같이 식물종에 따라 적정 공기공급량이 다른 것은 각 식물별 세포 성장 속도에 따른 산소 요구도 및 스트레스 반응이 다르기 때문으로 생각된다. 본 실험에서는 0.4 vvm까지 순차적으로 흰땃딸기의 성장량이 증가하였으나 D/F율에서는 0.2 vvm이 가장 높아 다른 결과를 나타냈으며, 더 많은 공기를 주입할 시 성장량이 감소될 것으로 생각된다.

Table 20. Growth characteristics of *F. nipponica* as affected by aeration rate in bioreactor

Aeration rate (vvm*)	Shoot length (mm)	Crown diameter (mm)	No. of stems (ea)	No. of leaves (ea)	Leaf length (mm)	Leaf width (mm)
0.1	32.80±33.33b	0.95±0.12a	10.2±2.2a	21.0±2.9b	6.10±0.74b	5.60±1.43a
0.2	33.58±8.73b	0.96±0.21a	10.3±3.9a	21.3±9.3b	6.33±0.78b	5.92±2.15a
0.4	41.08±8.36a	1.17±0.45a	12.4±5.6a	32.2±15.8a	7.67±1.83a	5.42±1.16a

Aeration rate (vvm)	No. of roots (ea)	Root length (mm)	Fresh weight (mg)	Dry weight (mg)	D/F rate (%)	Shoot generation rate (%)
0.1	1.2±0.8a	2.00±1.49b	145.00±30.64a	17.50±3.14a	12.07	0
0.2	1.3±0.9a	2.08±1.56b	151.67±88.20a	35.83±16.71a	23.63	0
0.4	1.9±1.6a	5.58±3.60a	229.17±142.98a	30.00±16.41a	13.09	25

* vvm : air volume/medium volume/min

The different letters in column indicate significantly difference at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

5) 배양기간

Bioreactor 적정 배양기간을 알아보기 위한 기내 유식물체의 생육비교는 Table 18과 같다. 배양기간별 신초 길이는 2주째 27.00 mm에서 4주째 31.90 mm, 6주째 33.58 mm로 배양기간이 길어질수록 점진적으로 늘어났다. 엽수와 뿌리수는 2주째 각각 4.1개 및 0.3개였으나 배양 6주째는 각각 21.3개 및 1.3개로 배양기간이 길어짐에 따라 많은 수의 잎과 뿌리가 발생했으며, 뿌리길이도 점진적으로 길어져 2주째 1.09 mm, 4주째 1.44 mm, 6주째 2.08 mm였으며, 생체중이 2주째 21.82 mg에서 6주째 151.67 mg으로 크게 늘어났다. D/F율 또한 2주째 8.22%에서 6주째 23.63%로 크게 늘어났다. 하지만 신초는 발생하지 않았다.

Gymnema sylvestre(Lee, 2005), 딸기(Zhang et al., 1998), *Panax quinquefolium*(Zhong et al., 1996)에 대한 bioreactor의 배양 초기에는 세포분열이 활발히 이루어져 세포수가 많아지므로 생장이 급격히 증가하였다가 세포의 활력이 감소되어 더 이상 세포분열이 이루어지지 않았지만 개개의 세포들이 배지로부터 영양분을 흡수하여 생체중이 증가하며, 마지막에는 세포의 사멸기로 접어들었다고 하였다. 오(2007)는 *Echinacea purpurea*의 부정근 배양에서 배양 2~5주까지는 서서히 증가하였다가 5주부터 생장이 감소하여 7주 후 부터는 생장이 거의 정지하였다고 하였으며, 최(2012)는 석곡의 PLB 증식에서 배양 2~4주까지는 급격히 증가하다가 4~7주까지는 소폭 증가하였다고 보고하였다.

김(2011)은 재배종 딸기 ‘고하’의 bioreactor에서 배양하면서 배양 2주째에는 유식물체의 잎겨드랑이(葉腋)에서 신초가 발생하였고, 배양 4주째에는 발생된 신초가 신장하기 시작하였으며, 배양 6주째에는 발생된 신초가 하나의 덩어리로 뭉쳐있으나, 각각 하나의 독립된 개체로 발달된 것을 확인하였다고 하였는데, ‘고하’와 흰땃딸기의 식물종 유전적 차이로 인해 액아발생의 특성에도 차이를 보이는 것으로 생각된다

Table 21. Growth characteristics of *F. nipponica* as affected by culture period in bioreactor

Culture period (weeks)	Shoot length (mm)	Crown diameter (mm)	No. of stems (ea)	No. of leaves (ea)	Leaf length (mm)	Leaf width (mm)
2	27.00±8.82a	0.67±0.18b	3.2±0.9c	4.1±1.3b	3.73±0.90b	4.00±1.55b
4	31.90±3.87a	0.74±0.21b	7.1±2.9b	5.7±2.1b	6.00±0.67a	4.40±1.26b
6	33.58±8.73a	0.96±0.21a	10.3±3.9a	21.3±9.3a	6.33±0.78a	5.92±2.15a

Culture period (weeks)	No. of roots (ea)	Root length (mm)	Fresh weight (mg)	Dry weight (mg)	D/F rate (%)	Shoot generation rate (%)
2	0.3±0.7b	1.09±2.07a	21.82±9.82b	1.82±0.06b	8.33	0
4	0.6±0.7ab	1.44±3.52a	56.00±15.78b	6.00±1.00b	10.71	0
6	1.3±0.9a	2.08±1.56a	151.67±88.20a	35.83±16.71a	23.63	0

The different letters in column indicate significantly difference at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

V. 종합고찰

본 연구는 멸종위기식물 흰뺨딸기(*Fragaria nipponica* Makino)에 대한 연구가 전무한 실정이고, 한라산의 많은 탐방객과 제주조릿대의 피압, 기후변화 등에 취약한 흰뺨딸기에 대한 종 보전이 시급하다고 생각하여 현지의 보존의 한 방법으로 조직배양을 이용하여 본 연구를 수행하게 되었다.

공(1988)은 한라산 고산식물의 분포 특성 연구에서 한라산은 북방계 극지고산식물의 세계적 남방 한계선으로서 생물 지리적으로 매우 중요한 지역이라고 하면서 고산식물은 분포 범위가 좁고 이동할 수 있는 범위가 제한되어 있어서 지구 온난화 등의 환경변화는 그 분포에 중요한 요인으로 작용하여 멸종을 야기할 수도 있다고 하였다. 이러한 관점에서 공시재료인 흰뺨딸기의 자생지에 대한 주요온도를 조사하는 것은 중요하다.

따라서 2013년 1월에서 2017년 9월까지 한라산 성판악 탐방로 해발 1,800 m와 어리목 탐방로 해발 1,600 m의 고도별 온·습도를 조사하였다. 그 결과 12~2월은 모든 조사지점에서 영하의 기온을 유지하였으며, 3월에는 가장 낮은 고도인 성판악 진달래밭 대피소(해발 1,500 m)에서만 영상의 기온이었으며, 4월부터는 모든 조사지역에서 영상의 기온을 유지하였다. 따라서 4월경부터 흰뺨딸기의 지상부가 출현하기 시작하여 이후 기온이 점차 오르면서 6월부터 개화 및 결실을 하여 7월 평균 기온이 17.5℃로 가장 높았을 때까지 열매를 맺는 것으로 조사되었다.

연평균 기온은 가장 낮은 지대인 해발 1,500 m에서 7.3℃로 가장 높게 조사되었다. 1,500 m~1,800 m의 연평균 기온은 6.4℃이며, 일 최고 온도는 2013년 8월 8일 진달래밭 대피소(1,500 m)가 27℃로 가장 높았으며, 일 최저 온도는 2015년 1월 23일과 2016년 1월 24일 위세오름 대피소(1,700 m)가 -18.5℃로 가장 낮았다. 일 최저온도가 영하권으로 접어드는 10월 하순부터는 흰뺨딸기의 지상부가 고사하기 시작하였다.

토양분류학에서는 용적밀도가 매우 낮은 것이 화산회토의 대표적인 특성 중

하나라고 하였는데, 흰땃딸기 자생지와 비자생지 토양의 물리성 분석 결과 흰땃딸기 자생지의 용적밀도는 0.54~0.96 g/cm³ 범위에 있었고, 평균 용적밀도는 자생지에서 0.74 g/cm³였으며, 비자생지에서 0.60 g/cm³로 비자생지보다 자생지에서 용적밀도가 다소 높았다. 이는 토양침식이나 답압의 영향이 거의 없었기 때문이라고 생각된다.

투수계수는 시간당 물의 이동 거리를 나타낸 것으로 어리목 탐방로(1,600 m)의 시간당 투수되는 거리(cm/h)는 0.4 cm/h이고, 성판악 탐방로(1,800 m)는 15.6 cm/h이며, 관음사 탐방로(1,400 m)인 경우는 229.2 cm/h로서 해발고도에 따른 경향은 보이지 않으나 탐방객이 많이 몰리는(Table 8.) 어리목 탐방로 > 성판악 탐방로 > 관음사 탐방로의 순으로 투수계수가 큰 경향을 보였다.

이러한 용적밀도와 투수계수에 대한 조사결과로 보아 어리목 코스를 이용한 탐방객에 의한 답압이 성판악 코스와 관음사 코스보다 많음을 알 수 있었으며, 사람에 의한 서식지 훼손이 가능하다는 것을 간접적으로 알 수 있었다. 또한 용적밀도와 투수계수의 관측지점 조사를 통해 자생식물의 회복과 복원을 위한 탐방객수 조절에 대한 근거를 제시할 수 있다는 점에서 토양물리성에 대한 지속적인 조사가 필요할 것으로 생각되었다.

흰땃딸기에 대한 자생지 조사결과 어리목 탐방로의 흰땃딸기의 개체는 독립적으로 분포하고 있었으며, 성판악 탐방로의 흰땃딸기는 군락을 형성하고 있었는데 이는 탐방로의 데크시설 형식에 의한 영향으로 생각된다(Fig. 9). 어리목 탐방로의 경우 탐방객이 탐방로 밖으로 이동하기 쉬운 형태이며, 성판악 탐방로인 경우 탐방로 밖으로 이동하기 어려운 형태이기 때문에 흰땃딸기의 군락이 형성될 수 있었던 것으로 생각되는데, 자생식물의 보호를 위해서는 탐방로 조성시에 성판악 탐방로를 참고해서 시설설치를 고려해야 할 것으로 생각된다.

그리고 조사지 주변에는 많은 제주조릿대가 분포하고 있었고 서식지 확대가 진행되어 흰땃딸기의 자생지에 대한 피압으로 서식지가 밀려남을 알 수 있었다. 김과 정(2017)의 아고산대 제주조릿대 분포 및 생육특성 연구에서 한라산 천연보호구역 내 해발 1,400 m 이상 지역은 21.55 km²로 이중 제주조릿대가 분포하는 면적은 19.03 km²로 확인되어 전체면적의 약 88.3%를 점유하며, 분포 특성으로 한라산 분화구 주변, 계곡 기저부 및 암반지역, 습지, 인공시설물 구역을 제외한 거의

전 지역에 분포한다고 보고하였는데, 이러한 제주조릿대의 분포와 생육 특성상 분포지가 겹치는 한라산 고산식물은 서식지가 밀려나는 경향을 보이는데 흰뺨딸기의 서식지도 제주조릿대에 의해 점차 줄어들어는 것으로 생각된다. 결과적으로 한라산에서 우점하고 있는 제주조릿대는 흰뺨딸기 자생지의 주요 생태적 위협요인이 되고 있다.

폴리페놀 화합물은 식물계에 널리 분포하는 2차 대사물질이며(Hyon et al., 2010), 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl(-OH)기를 가진 방향족 화합물로서 flavonoid, tannin, catechin 등이 있으며, 식물체에 색을 부여하고 항산화, 항암, 충치 예방 등의 기능적 활성을 가진다(Kim, 2010). 플라보노이드는 노란색 혹은 담황색을 띠는 폴리페놀계 화합물로 식물의 잎, 꽃, 줄기 등의 자연계에 널리 분포하고 있으며(Hetog et al., 1993), 식물에 포함되어 있는 플라보노이드 성분은 항산화를 비롯하여 여러 생리활성 기능을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다(Kim et al., 2012).

딸기는 맛과 향, 외관이 좋으며, 엘라그 산(폴리페놀)과 플라보노이드와 같은 항산화물질을 다량 함유하고 있어(Hannum, 2004) 흰뺨딸기의 열매 시료가 없어 포복경을 채취하여 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정된 결과 총 폴리페놀함량은 70.75 mg·GAE/g, 총 플라보노이드는 5.93 mg·QE/g으로 조사되었으며, 김 등(2012a)은 자생식물 26종에 대하여 총 폴리페놀 및 플라보노이드를 측정된 결과 폴리페놀 함량은 비수리가 228.90 mg·GAE/g으로 가장 높았으며, 참나무겨우살이가 46.76 mg·GAE/g으로 가장 낮게 측정되었으며, 총 플라보노이드는 비수리가 90.15 mg·QE/g으로 가장 높았으며, 여성초가 1.40 mg·QE/g으로 가장 낮게 측정되었으며, 산딸나무가 70.39 mg·GAE/g으로 흰뺨딸기와 비슷한 폴리페놀 함량을 나타냈으며, 쥐오줌풀이 6.40 mg·QE/g으로 흰뺨딸기와 비슷한 플라보노이드 함량으로 측정되었고, 고 등(2017)은 서향금혼초의 부위별로 총 폴리페놀 및 플라보노이드를 측정된 결과 총 페놀이 가장 많은 꽃에서 50.82 mg·GAE/g, 플라보노이드 15.19 mg·QE/g으로 조사되었다. 보통 폴리페놀 함량이 높을 때 플라보노이드 함량이 높지만 반드시 높은 값을 가지는 것은 아니며, 반대로 플라보노이드 함량이 높을 때 폴리페놀 함량이 반드시 높은 값을 가지는 것은 아니다(김 등, 2012a). 이 연구에서 한계는 연구수행기간 동안 흰뺨딸기의 개체수 부족과 열매

의 착과가 부진하여 열매를 대상으로 플라보노이드와 폴리페놀 함량을 조사하지 못한 점이었는데, 이후 추가로 재배종 딸기와 흰뺨딸기의 성분의 비교조사가 필요하다고 생각된다.

DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical 소거활성법(Blois, 1958)은 항산화 물질로부터 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제시키는 척도로 사용되고 있을 뿐만 아니라 인체 내 free radical에 의한 노화를 억제시키는 작용의 척도로 사용함으로써 실제 항산화 활성과 높은 연관성이 있는데, 합성 항산화제인 BHT와 비교 측정한 결과 저농도에서는 흰뺨딸기가 BHT보다 DPPH radical 소거활성이 낮았으나 500 $\mu\text{l/ml}$ 이상의 농도에서는 합성 항산화제인 BHT와 비슷한 DPPH radical 소거활성을 나타냈다.

딸기의 조직배양 시 배지 내 질소질의 종류 및 비율이 유식물체의 생장에 영향을 미치는데(Choi, 1997), 특히 질소는 유식물체의 초장에 영향을 미치며, 질소의 함량이 많을수록 길어진다(Choi, 1997 Leifert et al., 1992)고 한다. 발아한 흰뺨딸기의 기내배양을 위한 적정 배지를 알아보기 위하여 MS배지, Gamborg B5 배지, White배지에서 식물체를 배양 실험한 결과(Table 2) 질소 함량이 가장 많은 MS배지($3,550\text{mg/L}^{-1}$)에서 신초 길이, 뿌리 길이 등이 비교적 높고 엽장, 엽폭 등의 성장량에서 큰 차이를 보였다. 이는 질소질의 종류에 따라 체내로 흡수되는 속도가 달라 식물성장(Liefert et al., 1992)과 발근(Williams et al., 1985)에 영향을 미친 것으로 생각된다.

배지 내 질소형태는 $\text{NO}_3\text{-N}$ 와 $\text{NH}_4\text{-N}$ 이며, 식물이 $\text{NH}_4\text{-N}$ 를 흡수할 경우 수소이온(H^+)을 방출하여 배지 내 pH는 산성화되고(Sathyanarayana and Blake, 1994), 산성화된 배지 내에서는 환원형인 $\text{NO}_3\text{-N}$ 의 흡수가 빨라져 배지의 pH가 점진적으로 교정되기 때문에(Choi, 1997), 식물체 생육에 유리한 pH를 유지하기 위해 배지 내에 $\text{NO}_3\text{-N}$ 와 $\text{NH}_4\text{-N}$ 를 일정한 비율로 첨가하여야 한다(김, 2011). 배지 내에 첨가된 $\text{NO}_3\text{-N}$ 와 $\text{NH}_4\text{-N}$ 의 비율은 배지의 pH(Behrend and Mateles, 1975; Sathyanarayana and Blake, 1994) 식물성장(Liefert et al., 1992)과 발근(Williams et al., 1985)에 기내 배양체의 이온 흡수율(Zhong and Wang, 1998), 효소의 활성(Liu and Zhong, 1997) 등에 영향을 미치므로 본 실험에서도 배지 내 두 질소원의 함량에 따라 흰뺨딸기의 생장이 차이가 나타난 것으로 생각되며,

배지 내에 $\text{NO}_3\text{-N}$ 와 $\text{NH}_4\text{-N}$ 가 적정 비율로 첨가하는 것이 중요할 것으로 생각된다. 흰뚝딸기의 효율적인 기내배양을 위한 배지를 선발하기 위한 실험결과 흰뚝딸기 조직배양 시 기내 유식물체의 적정 생육을 위해서는 MS배지 1배의 기준농도에서 생체량이 가장 많고, D/F율도 높아 기내배양 시 가장 적당한 배지농도로 생각된다.

Sucrose는 광독립영양 활동이 부족한 기내 유식물의 에너지원 및 삼투조절제로서의 역할을 하며(Gurel and Gulsen, 1998; Nowak et al., 2004; Razdan, 1993; Stavarek et al., 1980), 기내배양에서 적정 농도를 구명하는 것은 중요한 일이다. 식물에 따라 최대의 생체량을 얻을 수 있는 sucrose 농도는 모두 다르며(Lipavska and Vreugdenhil, 1996), 농도에 따라 삼투압이 달라져 신초 성장에 영향을 미친다. *Philodendron erubescens*와 *Cordyline termminalis*는 고농도의 sucrose가 신초 성장에 적당하지만(Maene and Debergh, 1985), *Prunes domestica*, 계요등(*Paederia foetida*), *Elaeocarpus robustus* 및 알팔파 등은 고농도의 sucrose가 오히려 신초 성장을 저해한다고 보고되었다(Amin et al., 2003; Nowak et al., 2004; Rohmn et al., 2004; Stavarek et al., 1980). 흰뚝딸기의 효율적인 기내배양을 위한 배지의 적정 조건 중 적정 sucrose 농도를 구명하기 위한 실험결과 흰뚝딸기는 고농도의 sucrose에서 신초 생장이 저해되었고, 3%에서 최대의 생체량을 얻을 수 있는 것으로 나타났다.

식물체 배양시 배양방법에 따라서도 공시재료의 생육특성이 다를 것으로 생각되는데, 배양방법에 따른 기내유식물체의 생육특성을 비교한 결과 신초 길이는 고체배양 28.00 mm, 액체배양 25.60 mm이며, bioreactor 배양에서 33.58 mm로 가장 길었다. 액체배양과 bioreactor 배양의 엽수는 각각 11.30개, 10.33개로 고체배양 방법에 비해 생육이 좋았다. 액체배양은 생체중이 308.00 mg, 건물중 40.00 mg으로 가장 높게 나타났으나 bioreactor 배양은 생체중이 151.67 mg, 건물중이 35.83 mg으로 나타냈지만 D/F율이 23.63 %로 다른 배양방법에 비해 높으므로 유식물체도 토양순화가 잘 될 것으로 생각된다. 그러나 순화 시 뿌리활착을 빠르게 하고 생존율을 높이기 위해서는 뿌리발달을 유도하는 방법을 모색해야 할 것으로 생각된다.

배양방법에 따른 기내유식물체의 생육특성은 다르게 나타난다. 액체배양 시

공기를 주입해주면 소수성 식물종 또한 생장이 활발하게 증가하는 경향을 나타내기도 하며(Takayama, 2000; Takayama and Akita, 2008), 딸기의 경우 공기주입형 bioreactor를 이용하면 액체배지에서도 식물체의 생장률과 생장량이 증가되고, 공기주입량에 따라 생장이 비례적으로 변화한다(김, 2011; Takayama and Akita, 2008). 본 실험에서 고체배양보다 액체배양과 bioreactor 배양이 생체량이 높았으며, bioreactor 배양의 D/F율이 23.63 %로 다른 배양방법에 비해 높으므로 유식물체도 토양순화가 잘 될 것으로 생각되며, 이것은 딸기 유식물체를 액체배지에 치상한 후 지속적으로 공기를 주입하여 최종 생장량이 증가한 것으로 생각된다.

흰맛딸기의 bioreactor 배양시 질소 화합물의 농도에 따라 기내 유식물체의 생장량에 차이를 보였는데, 이는 Leifert et al.(1992)과 Williams et al.(1985) 및 Woodward et al.(2006) 등이 bioreactor 배양 시 기내 유식물체의 생육은 여러 가지 조건에 따라 다르게 나타나며, 특히 질소질의 종류 및 농도는 딸기 유식물체의 초장 및 뿌리 생육에 영향을 미친다고 한 보고와 유사하였다. 또한 Takayama(1991)의 양치류, 글라디올러스 및 Nerine은 bioreactor 배양 시 질소질의 농도에 영향을 받아 저농도의 질소에서 분화 및 증식이 잘되었다고 한 보고와 비슷한 결과였다. 그러나 신초 길이, 관부직경, 줄기수의 경우 질소질 농도는 1/2배부터 2배까지는 비슷한 결과를 보였는데,

Le Roux and Van Staden(1991)와 McComb et al.(1996)가 고무나무에서 질소질 농도가 신초 증식에 중대한 영향을 미치지 않는다고 보고된 바와 달리 발근 단계에 영향을 미쳤다고 한 보고와 비슷하였다. 그리고 이 시험에서 뿌리수와 뿌리 길이는 질소질 농도가 높아질수록 점차 적어졌으나 1배 농도에서 생체중과 건물중은 각각 151.67 mg, 35.83 mg로 가장 높았으며 1/2배, 2배 순으로 적어졌고 D/F율 역시 1배에서 가장 높게 조사되었다.

Sucrose는 식물체의 생장과 분화(Aloni, 1980; Bofunia and Przywara, 1999; Gibson, 2000; Leva et al., 1990; Steinitz, 1999), 삼투압과 수분포텐셜에 영향을 미쳐 유식물체의 양분과 수분 흡수에 관여하며(Lipavska and Vreugdenhil, 1996), 생체량 증가 및 신초생산에 영향을 미치는 sucrose 농도는 식물종에 따라 다르다. 따라서 흰맛딸기의 종묘전과 대량증식을 위한 조직배양시 적정 sucrose의

농도를 구명하는 것은 중요하다.

Bioreactor 배양시 적정 양분공급을 위해 sucrose 농도별 실험 결과(Table 18) sucrose 3%의 경우 관부직경 0.96 mm, 줄기수 10.33개, 엽수 21.25개, 엽장 6.33mm, 엽폭 5.92mm, 생체중 151.67 mg, 건물중 35.83 mg이다. 비슷한 시기에 시험을 수행하여 고체배양에서의 적정 sucrose농도 구명시험(Table 15)과 bioreactor 배양에서의 적정 sucrose농도 구명시험을 간접적으로 비교할 수 있었는데, 고체배양시험과 bioreactor 배양 시험의 같은 농도에서 비교하면 고체배양에 비해 bioreactor 배양에서 지상부 생장이 높았으며, 지하부는 생장이 저조하였다. 그러나 고체배양에서 sucrose 3%가 21.43%로 D/F율이 가장 높았지만 bioreactor 배양에서는 sucrose 3%에서 23.63%로 고체배양보다 bioreactor 배양의 D/F율이 높아 우수한 것으로 생각된다.

생체량 증가 및 신초생산에 영향을 미치는 sucrose 농도는 고체배양에서는 sucrose 1~3% 농도에서 생육량의 차이는 크지 않았지만 bioreactor 배양에서는 큰 차이를 보였다. 따라서 당농도의 차이가 기내식물체 생육특성에 영향을 주었으며, 흰뚨딸기는 bioreactor 배양 시 sucrose 3%가 생육량에 알맞은 농도였다.

Stapfer and Heuser(1984)는 periwinkle의 경정절편배양에서 shoot 증식을 위해서는 kinetin이나 2iP보다는 BA가 더 효과적이라고 보고하였고, Yoeum et al.(2000)은 Buffalo gourd의 기내 shoot 증식 및 생장에 미치는 사이토키닌의 효과를 조사한 결과 BA 첨가배지에서는 다수의 shoot를 얻을 수 있는 반면, kinetin과 2iP 첨가배지에서는 shoot 증식 효과가 미비하였다고 보고하였고, Kusey et al.(1980)과 Han et al.(1991)은 안개초 배양과 *Delphinium*의 경정배양에서 BA가 kinetin 및 2iP보다 shoot의 증식과 생체중의 증가에 더욱 효과적이었다고 보고하였다. 위와 같은 이유로 성장조정제 BA를 사용하여 농도별 기내생육특성을 조사한 결과(Table 19) BA 0.2 ppm에서 신초발생율이 290%로 가장 많은 신초를 발생하여 신초의 형성에 가장 좋은 효과를 보여 흰뚨딸기의 대량증식을 위해 효과적일 것으로 생각된다.

Doran(1993)과 Scagg(1992)는 bioreactor 배양 시 공기 주입은 식물 생장에 필요한 산소, 이산화탄소, 에틸렌 등을 배지 내에 공급하는 역할을 하며, Takayama and Akita(2008)는 배지를 순환하여 식물체를 지속적으로 움직여 식

물체의 정단우세현상을 타파하여 신초의 발생을 유도하는 역할을 한다고 보고하여 기내에 공급되는 공기량의 중요성을 지적하였다.

공기주입량에 대한 bioreactor 배양 실험결과(Table 20)공기주입량 0.4 vvm까지는 생체량이 증가하였으나 공기주입량이 0.2 vvm이상 공급하면 배지소모량이 많아졌으며 D/F율은 0.2 vvm에서 23.63%로 가장 높게 나타났는데, Cazzulino et al.(1991)가 bioreactor 내 공기주입량은 식물 성장과 밀접한 관계를 갖고 있지만 식물세포는 미생물 세포에 비해 대사율이 2배가량 낮기 때문에 산소요구량이 적어 공기주입량이 높아지면 생체량이 감소한다는 보고와 유사한 결과를 보였다. 따라서 bioreactor를 이용한 흰땃딸기의 기내배양에는 0.2 vvm이 적절한 공기주입량으로 생각된다.

기내식물체의 배양기간은 식물체의 증식배율에 영향을 주며, 시설 운영비와 밀접한 관계를 가지므로 bioreactor 배양시 적정 배양기간을 알아보기 위한 기내유식물체의 배양기간별 신초 길이는 2주째 27.00 mm에서 4주째 31.90 mm, 6주째 33.58 mm로 늘어났다. 엽수와 뿌리수는 2주째 각각 4.09개 및 0.27개였으나 배양 6주째는 각각 21.25개 및 1.25개로 배양기간이 길어짐에 따라 많은 수의 잎과 뿌리가 발생했으며, 뿌리길이도 길어져 2주째 1.09 mm, 4주째 1.44 mm, 6주째 2.08 mm였으며, 생체중이 2주째 21.82 mg에서 6주째 151.67 mg으로 크게 늘어났다. D/F율 또한 2주째 8.22%에서 6주째 23.63%로 크게 늘어났다.

이상의 결과를 종합하면 멸종위기식물 흰땃딸기의 현지외 보존의 한 방법으로 조직배양을 이용하여 기내배양을 할 경우 흰땃딸기는 종자 발아를 통해서도 96.1%의 높은 발아율을 나타냈으나 대량생산을 위한 조직배양묘 생산은 bioreactor 배양으로 기준에 1배의 MS배지를 이용하여 sucrose 3%, BA 0.2 ppm에 0.2 vvm의 공기를 주입하여 6주간 배양하는 것이 단기간 대량생산에 적합하다고 생각된다.

VI. 적 요

본 연구는 멸종위기식물 흰뺨딸기(*Fragaria nipponica* Makino)에 대한 연구가 전무한 실정이고, 한라산의 많은 탐방객과 제주조릿대의 피압, 기후변화 등에 취약한 흰뺨딸기에 대한 종 보전이 시급하다고 생각하여 유전자원 보전과 자생지 복원 그리고 자원화를 위한 기초자료를 제공하기 위하여 실시하였다.

2013년 1월에서 2017년 9월까지 한라산 1500m, 1600m, 1700m, 1800m의 고도별 온·습도를 조사결과 12~2월은 모든 고도에서 영하의 기온을 유지하였으며, 4월부터는 모든 지역이 영상의 기온을 유지하여 흰뺨딸기의 지상부가 출현하여 6월부터 개화 및 결실을 하여 7월 평균 기온이 17.5℃로 가장 높았을 때까지 열매를 맺는 것으로 조사되었다.

흰뺨딸기의 자생지 토양과 근처 비자생지 토양에 대하여 토양화학성 조사를 한 결과 토양 pH는 관음사 흰뺨딸기 자생지에서 pH 5.24로 가장 높았으며, 전기전도도는 어리목 흰뺨딸기 자생지역이 1.08 ms/cm으로 가장 높았다. 유기물함량은 어리목 흰뺨딸기 자생지역에서 24.5% 로 가장 높았으며, 성판악 흰뺨딸기의 자생지인 경우 유효인산 함량이 28.1mg/kg로 다른 지역에 비해 약 2배 이상 높게 나타났다. 총 질소 함량은 어리목 흰뺨딸기 비자생지에서 0.45%, 치환성 K는 어리목 흰뺨딸기 자생지가 0.24 cmol⁺/kg, 성판악 비자생지가 Ca은 1.32, Mg은 0.09 cmol⁺/kg로 가장 높았으며, Na은 성판악 자생지에서 0.025 cmol⁺/kg로 가장 높게 조사되었다.

SPAD 값과 고도별로 Pearson 상관관계 분석 결과 고도와 SPAD-502 값은 1% 유의수준에서 부의 상관($r=-0.272$, $p<0.01$)관계로 분석되어 흰뺨딸기의 엽록소는 날짜와 고도별로 밀접한 관련이 있는 것으로 분석되었다.

흰뺨딸기의 포복경을 채취하여 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정한 결과 총 폴리페놀함량은 70.75 mg·GAE/g, 총 플라보노이드는 5.93 mg·QE/g으로 조사되었으며, 흰뺨딸기의 DPPH radical 소거활성을 측정한 결과 500 μ l/ml 이상의 농도에서는 합성 항산화제인 BHT와 비슷한 DPPH radical 소거활성을 보인

것으로 측정되었다.

흰떡발기의 종자를 전처리한 후 파종 43일까지 총 96.1%가 발아하였으며, 파종 후 10일이 경과하여 45.3%, 20일 87.3%, 30일 93.4%가 발아하였으며, 평균발아일수는 12.81일이 소요되었다.

기내배양에서의 적정 배지를 알아보기 위하여 MS배지, Gamborg B5배지, White배지에 실험한 결과 MS배지가 D/F율이 낮으나 신초 길이, 뿌리 길이 등이 비교적 높고 엽장, 엽폭 등의 생장량 가장 높았다. MS배지의 농도 실험 결과 MS배지 농도가 높아짐에 따라 뿌리수가 적어지고, 뿌리길이는 기준농도에서 가장 길었다가 짧아지는 경향이였으며, MS 배지 기준농도인 1배는 D/F율이 21.43%로 다른 농도보다 가장 높았다. sucrose의 농도 실험 결과 신초 길이, 관부직경, 줄기수, 엽수는 농도 간에 큰 차이를 보이지 않았으나 D/F율의 분석결과 sucrose 3% 농도에서 21.43%로 가장 높았으며 관부직경이 가장 두꺼워 순화처리 시 가장 적당한 농도라고 생각되었다

배양방법에 따른 기내유식물체의 생육특성을 비교한 결과 bioreactor 배양은 D/F율이 23.63%로 다른 배양방법에 비해 높으므로 유식물체의 토양순화가 잘 될 것으로 예상되며, MS배지 1배 농도에서 D/F율 역시 1배에서 가장 높게 조사되었다. sucrose 농도 실험 결과 sucrose 3%의 경우 D/F율 23.63%로 대부분의 생육량이 다른 농도에 비해 많은 생장을 한 것을 조사되었으며, BA 농도별 처리 결과 신초 발생의 경우 0.2 ppm에서 290%로 가장 많이 발생되어 신초의 생성에 가장 좋은 효과를 보여 흰떡발기의 대량증식을 위해 효과적일 것으로 생각된다.

Bioreactor 적정 공기주입량은 0.2 vvm에서 D/F율이 23.63%로 가장 높게 나타났으며, bioreactor에서 배양기간이 길어질수록 생육량이 늘어났으며 D/F율 또한 2주째 8.22%에서 6주째 23.63%로 크게 늘어났다.

흰떡발기는 종자 발아를 통해서도 96.1%의 높은 발아율을 나타냈으나 추후 대량생산을 위한 조직배양묘 생산은 bioreactor 배양으로 기준에 1배의 MS배지를 이용하여 sucrose 3%, BA 0.2ppm에 0.2 vvm의 공기를 주입하여 6주간 배양하는 것이 단기간 대량생산에 적합하다고 생각된다.

VII. 인용문헌

- Ahmed, S., E.J. Hahn, and K.Y. Paek. 2008. Aeration volume and photosynthetic photon flux affect cell growth and secondary metabolite contents in bioreactor cultures of *Morinda citrifolia*. J. Plant Biol. 51:209-212.
- Ahn, J.K., W.Y. Lee, and S.Y. Park. 2003. Effect of nitrogen source on the cell growth and production of secondary metabolites in bioreactor cultures of *Eleutherococcus senticosus*. Kor. J. Plant Biotechnol. 30:301-305.
- Aloni, R. 1980. Role of auxins and sucrose in the differentiation of sieve and trachery elements in plant tissue cultures. Plant 150:255-263.
- Amin, M.N., M.M. Rahman, and M.S. Manik. 2003. *In vitro* clonal propagation of *Paederia foetida* L. A medicinal plant of Bangladesh. Plant Tissue Culture 13:117-123.
- Archambault, J., R.D. Willians, L. Lavoie, M-F. Pepin, and C. Chavarie. 1994. Production of somatic embryos in a helical ribbon impeller bioreactor. Biotech Bioengin 44:930-943.
- Bennett, I.J., D.A.J. McDavid, and J.A. McComb. 2003. The influence of ammonium nitrate, pH and indole butyric acid on root induction and survival in soil of micropropagated *Eucalyptus plobulus*. Biol. Plant. 47(3):355-360.
- Behrend, J. and I.R. Mateles. 1975. Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. Plant Physiol. 56:584-589.
- Bhatia, P. and N. Ashwath. 2005. Effect of medium pH on shoot regeneration from the cotyledonary explants of tomato. Biotechnology 4:7-10.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free

- radical. *Nature* 181:1199-1200.
- Bofunia, H. and L. Przywara. 1990. Rola cukrowcow roślinnych kulturach *in vitro*. *Wiad. Bot.* 43:25-36.
- Bray, C.M. 1983. Nitrogen metabolism in plants. Longman Inc. New York USA. p. 214.
- Brown, D.C.W., D.W.M. Leung, and T.A. Thorpe. 1979. Osmotic requirements for shoot formation in tobacco callus. *Plant Physiol.* 46:36-41.
- Buddendorf-Joosten, J.M.C. and E.J. Woltering. 1994. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. In: Lumsden, P.J., J.R. Nicholas, and W.J. Davies (eds.). *Physiology growth and development of plants in culture*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands. p. 165-190.
- Capellades, M., R. Lemeur, and P. Debergh. 1991. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 25:21-26
- Cazzulino, D., H. Pederson, and C.K. Chin. 1991. Bioreactors and image analysis for scale-up and plant propagation. In: Vasil, I.K. (ed.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Academic Press, San Diego, CA. p. 147-177.
- Chattopadhyay, S., S.K. Datta, and M. Ray. 1992. *In vitro* effect of NH_4NO_3 on growth and alkaloid content of *Tylophora indica* Merr. *Phytomorphism* 42:139-144.
- Choi, H.K., S.I. Kim, J.S. Son, H.R. Kim, J.Y. Song, J.H. Kim, and S.S. Hong. 2001. Enhanced production of paclitaxel by semi-continuous batch process (SCBP) in suspension culture of *Taxus chinensis*. *Enz. Microbial Technol.* 29:583-586.
- Choi, S.J. 1997. *Plant tissue culture*. Seon Jin Press p.48.
- Chu, C.C. 1978. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: *Proc.Symp. Plant Tiss. Cult. Sci.* p. 45-50.

- Chu, I. 1995. Economic analysis of automated micropropagation. In: J. Aitken-Christie, T. Kozai, and M.A.L. Smith (eds.). Automation and environmental control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p. 19-27.
- Dale, A. and T.M. Sjulín. 1990. Few cytoplasms contribute to North American strawberry cultivars. HortScience 25:1341-1342.
- Debergh, P.C., Y. Harbaoui, and R. Lemeur. 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): Evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. Physiol. Plant. 53:181-187.
- Doran, P.M. 1993. Design of reactors for plant cells and organs. In: Feichter, A. (ed.). Bioprocess Design Control, vol. 48. Springer-Verlag, Berlin. p. 116-169.
- Doran, P.M. 1995. Bioprocess Engineering Principles. Academic Press Ltd., New York.
- Faedi, W., F. Mourgues, and C. Rosati. 2002. Strawberry breeding and varieties: situation and perspectives. Acta Hort. 567:51-59.
- Faisal, M., N. Ahmad, and M. Anis. 2007. An efficient micropropagation system for *Tylophora indica*, an endangered, medicinally important plant. Plant Biotechnol. Rep. 1: 155-161.
- Fujita, Y., Y. Hara, C. Suga, and T. Morimoto. 1981. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. Plant Cell Rep. 1:61-63.
- Galis, I., J. Macas, J. Vlasak, M. Ondrej, and H.A. van Onckelen. 1995. The effect of an elevated cytokinin level using the ipt gene and N⁶-benzyladenine on a single node and intact potato plant tuberization *in vitro*. J. Plant Growth Regulat. 14:143-150.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell. Res. 50:151-158.

- Garcia-Ochoa, F., and E. Gomez. 2008. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnol. Adv.* 154-176.
- Gaspar, T., C. Kevers, P. Debergh, L. Maeng, M. Paques, and P. Boxus. 1987. Vitrification: Morphological, Physiological and ecological aspects. In: Bonga, J.M., and J. Durzan. (eds.). *General principles and biotechnology. Cell and Tissue Culture in Forestry.* Forestry Sciences Press, The Netherlands.
- Gautam, V.K., K. Nanda, and S.C. Gupta. 1993. Development of shoots and roots in anther-derived callus of *Azadirachta indica* A. Juss. A medicinal tree. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 34: 13-18.
- George, E.F. 1993. *Plant propagation by tissue culture.* Exegetics Ltd, Edington, UK.
- Gibson, S.I. 2000. Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiol.* 124:1532-1539.
- Gomes, G.A.C., R. Paiva, P.D.D.O. Paiva, and E.J.A.D. Santiago. 2003. Plant regeneration from callus cultures of *Maclura tinctoria*, an endangered woody species. *In Vitro Cell Dev. Bio-Plant.* 39:293-295.
- Grimes, H.D., and T.K. Hodge. 1990. The inorganic $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ratio influences plant regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of indica rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Physiol.* 136:362-367.
- Gurel, S., and Y. Gulsen. 1998. The effects of different sucrose, agar and pH levels on *in vitro* shoot production of Almond (*Amygdalus communis* L.). *Tr. J. Bot.* 22:363-373.
- Hahn, E.J., Y.S. Kim, K.W. Yu, C.S. Jeong, and K.Y. Paek. 2003. Adventitious root cultures of *Panax ginseng* C.A. Meyer and ginsengnoside production through large-scale bioreactor system. *J. Plant Biotechnol.* 5:1-6.
- Han, B.H., H.Y. Jung, and J.Y. Ko. 1991. Micropropagation of Delphinium cv.

- Princess Caroline through shoot tip cultuer. Kor. J. Plant Tis. Cult. 1:53-55.
- Hancock, J.F., J.J. Luby, A. Dale, P.W. Callow, S. Serce, and A. El-Shiek. 2002. Utilizing wild *Fragaria virginiana* in strawberry cultivar development: inheritance of photoperiod sensitivity, fruit size, gender, female fertility and disease resistance. *Euphytica* 126:177-184.
- Hanhineva K., H. Kokko, and S. Karenlampi. 2005. Shoot regeneration from leaf explants of five strawberry(*Fragaria* x *ananassa*) cultivars in temporary immersion bioreactor system. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant.* 41:826-831.
- Hanhineva, K. and S. O Karenlampi. 2007. Production of transgenic strawberries by temporary immersion bioreactor system and verification by TAIL-PCR. *BMC Biotechnology* 7:11.
- Hannum, S.M. 2004. Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44:1-17.
- Hetog MGL, PCH Hollman, and B Van de Pette. 1993. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juice. *J. Agr. Food Chem.* 41: 1242-1246.
- Hirakawa, H., K. Shirasawa, S. Kosugi, K. Tashiro, S. Nakayama, M. Yamada, M. Kohara, A. Watanabe, Y. Kishida, T. Fujishiro, H. Tsuruoka, C. Minami, S. Sasamoto, M. Kato, K. Nanri, A. Komaki, T. Yanagi, Q. Guoxin, F. Maeda, M. Ishikawa, S. Kuhara, S. Sato, S. Tabata and S.N. Isobe. 2014. Dissection of the octoploid strawberry genome by deep sequencing of the genomes of *Fragaria* species. *DNA research* 21:169 - 81.
- Hyon J.S., S.M. Kang, M. Seneevirathne, W..J. Koh, T.S. Yang, M.C. Oh, C.K. Oh, Y.J. Jeon, and S.H. Kim. 2010. Antioxidative activities of extracts from dried citrus sunki and C. unshiu peels. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39:1-7.

- Hussey, G. 1986. Vegetative propagation of plants by tissue culture. In: Yeoman, M.M.(ed.), Plant Cell Culture Technology, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Ito, E., S. Yoshinaga, Y. Ohnuki, K. Shichi, Y. Matsumoto, and H. Taoda. 2002. Soil factors affecting the decline of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) forests in Kanto plain. Japan. Proceedings of the 8th International Congress of Ecology p. 93.
- Jeong, C.S., D. Chakrabarty, E.J. Hahn, H.L. Lee, and K.Y. Paek. 2006. Effects of oxygen, carbon dioxide and ethylene on growth and bioactive compound production in bioreactor culture of ginseng adventitious roots. *Biochem. Eng. J.* 27:252-263.
- Jeong, C.S., H.N. Murthy, E.J. Hahn, and K.Y. Paek. 2009. Inoculum size and auxin concentration influence the growth of adventitious roots and accumulation of ginsenosides in suspension cultures of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Acta Physiol. Plant* 31:219-222.
- Jo, E.A., E.J. Hahn, and K.Y. Paek. 2006. Plantlet growth, and leaf and stomatal characteristics of *Alocasia amazonica* affected by medium supply methods in bioreactor culture. *Kor. J. Plant Biotechnol.* 33:117-122.
- Juan, C.D.P., E.G. Sutter, and K.A. Shackel. 1995. Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. *Physiologia Plantarum* 95:225-232.
- Kim, C.H. 2000. Assessment of natural environment: I. Selection of Plants taxa. *korean J. Environ. Biol.* 18:163-198. (in Korean).
- Kim E.J., J.Y. Choi, M. Yu, M.Y. Kim, S. Lee, and B.H. Lee. 2012. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of korean natural and medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 44: 337-342.
- Kim H.H. 2010. The study on verification of cosmeceutical activities from *asterglehni* Fr. Schm. and application of oleosome on advanced

- formulation. MS Thesis. Daegu Haany University, Daegu, Korea.
- Kim, Y.S. 2002. Production of ginsenosides through bioreactor cultures of adventitious roots in ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). Ph.D. Thesis, Chungbuk Natl. Univ., Cheongju, Korea.
- Kim, Y.S., E.J. Hahn, and K.Y. Paek. 2004a. Effects of various bioreactors on growth and ginsenoside accumulation in Ginseng adventitious root cultures (*Panax ginseng* C.A. Meyer). Kor. J. Plant Biotechnol. 31:249-253.
- Kim, Y.S., E.J. Hahn, H.N. Murthy, and K.Y. Paek. 2004b. Effect of polyploidy induction on biomass and ginsenoside accumulations in adventitious roots of ginseng. J. Plant Biol. 47:356-360.
- Knudson, C. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seed. Amer. Orchid Soc. 15:214-217.
- Kusey, W.E. Jr., P.A. Hammer and T.C. Welier. 1980. *In vitro* propagation of *Gysophila paniculata* L. 'Bristol Fairy'. HortScience 15:600-601.
- Laura, M., D. Meglio, G. Staudt, H. Yu and T.M. Davis. 2014. A phylogenetic analysis of the genus *Fragaria*(Strawberry) using intron-containing sequence from the *ADH-1* gene. PLOS ONE <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102237>.
- Le Roux, J.J. and J. Van Staden. 1991. Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus*: A review. Tree Physiol. 9:435-477.
- Lee, E.J. 2005. Effects of Chemical and Physical Environments on Cell Culture of *Gymnema sylvestre*. M.S. Thesis. Graduate School, Chungbuk National University, Cheongju, Kor.
- Lee, E.J. and K.Y. Paek. 2011. Effect of nitrogen source on biomass and bioactive compound production in submerged cultures of *Eleutherococcus koreanum* nakai adventitious roots. Biotechnol. Progress 28:508-514.
- Lee, E.J., M. Mobin, E.J. Hahn, and K.Y. Paek. 2006. Effects of sucrose, inoculum density, auxins, and aeration volume on cell growth of

- Gymnema sylvestre*. J. Plant Biol. 49:427-431.
- Lee, J.N. 2006. Physiological and ecological response of ever-bearing strawberry in the highlands cultivation for off-season production. PhD. Diss. Kangneung National University. Gangneung.
- Lee, R.B.Jr. 1985. Clonal propagation of endangered native plants *rhododendron chapmanii* Gray, *taxus floridana* Nutt., and *torreya taxifolia* Arn. The Graduate School of the University of Florida.
- Lee, S.H., E.J. Hahn, and K.Y. Paek. 2008. Nitrogen source and sucrose concentration in the medium affect Indian ginseng (*Withania somnifera*) cultures *in vitro*. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 26:306-312.
- Leifert, C., S. Pryce, P. Lumsden, and P. Waites. 1992. Effects of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing *in vitro*. Plant Tiss. Org. Cult. 30:171-179.
- Leva, A.R., G. Bartolini, R. Muleo, S. Biricoliti, and A. Benelli. 1990. Micromorphological studies on Actinidia cv. Harvard calli as influenced by different sugars. In: XXIII International Horticultural Congress (ed.). Abstracts of Contributed Papers:3123. Firenze. Italy.
- Lian, M.L., D. Chakrabarty, and K.Y. Paek. 2003. Growth of *Lilium* oriental hybrid 'Casablanca' bulblet using bioreactor culture. Scientia Hort. 97:41-48.
- Liu, S. and J.J. Zhong. 1997. Simultaneous production of ginseng saponin and polysaccharide by cell suspension cultures of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium*. Process Biochem. 33:69-74.
- Lipavska, H. and D. Vreugdenhil. 1996. Uptake of mannitol from the media by *in vitro* grown plants. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 45:103-107.
- Maene, L. and P. Debergh, 1985. Liquid medium additions to established cultures to improve elongation and rooting *in vitro*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 5:23-32.
- Marta, A.E., E.L. Camadro, J.C. Diaz-Ricci, and A.P. Castagnaro. 2004.

- Breeding berries between the cultivated strawberry, *Fragaria* × *ananassa*, and related wild germplasm. *Euphytica* 136:139-150.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants, 2nd (ed). Academic Press, New York, USA.
- Martin, S.M. 1980. Mass culture systems for plant cell suspension. 149-166. In: Staba E.J. (eds.). *Plant Tissue Culture as A Source of Biochemicals*. CRC press, Boca Raton, Florida.
- McComb, J.A., I.J. Bennett, and C.M. Tonkin. 1996. *In vitro* propagation of *Eucalyptus* species. In: Taji, A., R. Williams (eds.). *Tissue culture of Australian native plants*. University of New England Press, Armidale. p.112-156.
- Min, J.Y., H.Y. Jung, S.M. Kang, Y.D. Kim, Y.M. Kang, D.J. Park, D.T. Prasad, and M.S. Choi. 2007. Production of tropane alkaloids by small-scale bubble column bioreactor cultures of *Scopolia parviflora* adventitious roots. *Bio resource Technol.* 98:1748-1753.
- Meijer, J.J., H.J.G. Hoopen, and K.R. Libbenga. 1993. Effects of hydrodynamic stress on cultured plant cell: A literature survey. *Enz. Microb. Technol.* 15:234-238.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.* 15:473-497.
- Murthy, H.M., E.J. Hahn, and K.Y. Paek. 2008. Adventitious roots and secondary metabolism. *Chin. J. Biotechnol.* 24:711-716.
- Nafziger, E.D. and H.R. Koller. 1976. Influence of starch concentration on CO₂ assimilation in soybean. *Plant Physiol.* 57:560-563.
- Nair, L.G. and S. Seeni. 2003. *In vitro* multiplication of *Calophyllum apetalum* (Clusiaceae), and endemic medicinal tree of the Western Ghats. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 75:255-260.
- Nakayama, M., T. Kozai, and K. Watanabe. 1991. Effect of the presence/absence of the sugar in the medium and natural/forced

- ventilation on the net photosynthetic rates of potato explants *in vitro*.
Jpn. Plant Tiss. Cult. Lett. 8(2):105-109.
- Neales, T.F. and L.D. Incoll. 1968. The control of leaf photosynthetic rate by the level of assimilate concentration in leaf: a review of the hypothesis. Bot. Rev. 34:107-125.
- Nhut, D.T., J.A.T. Silva, P.X. Huyen and K.Y. Paek. 2004. The importance of explant source on regeneration and micropropagation of *Gladiolus* by liquid shake culture. Scientia Hort. 102:407-414.
- NIAST. 2000. Methods of soil chemical analysis. National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon, Korea. p.35-131.
- Njuguna, W. 2010. Development and use of molecular tools in *Fragaria*. Oregon State University Doctor of Philosophy.
- Njuguna, W., A. Liston, R. Cronn, T.L. Ashman and N. Bassil. 2013. Insights into phylogeny, sex function and age of *Fragaria* based on whole chloroplast genome sequencing. Mol. Phylogenet. Evol. 66:17 - 29.
- Njuguna, W., K.E. Hummer, C.M. Richards, T.M. Davis and N.V. Bassil. 2011. Genetic diversity of diploid Japanese strawberry species based on microsatellite markers. Genet. Resour. Crop Evol. 58(8):1187-1198.
- Nowak, B.K., K. Miczynski, and L. Hudy. 2004. Sugar uptake and utilization during adventitious bud differentiation on *in vitro* leaf explants of Wegierka Zwyczajna plum (*Prunus domestica*). Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 76:255-260.
- Paek, K.Y. (eds). 2003. Plant Tissue Culture-Technology. Hyang moon sa. Seoul, Korea.
- Paek, K.Y., E.J. Hahn, and S.H. Son. 2001. Application of bioreactors for largescale micropropagation system of plants. *In Vitro* Cell Dev. Biol. Plant. 37(2):149-157.
- Pennazio, S. 1975. Effect of adenine and kinetin on development of carnation tips cultured. *in vitro*. J. Hort. Sci. 50:161-164.

- Rai, V.R. 2002. Rapid clonal propagation of *Nothapodytes foetida*(Wight) sleumer - a threatened medicinal tree. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 38: 347-351.
- Rao, S.R. and G.A. Ravishankar. 2002. Plant cell culture: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 20:101-153.
- Razdan, M.K. 1993. Introduction and techniques. In: An introduction to plant tissue culture. Oxford and IBH Publishing, New Delhi, Bambey, Calcutta. p.1-40.
- Rohman, M.M., M.N. Amin, and R. Ahmed, 2004. *In vitro* rapid regeneration from cotyledon explants of native olive (*Elaeocarpus robustus* Roxb.). *Asian J. Plant Sci.* 3:31-35.
- Rout, G.R., S. Samantaray, and P. Das. 2000. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnol. Adv.* 18:91-120.
- Sargent, D.J., Y. Yang, N. Surbanovski, L. Bianco, M. Buti, R. Velasco, L. Giongo and T.M. Davis. 2016. HaploSNP affinities and linkage map positions illuminate subgenome composition in the octoploid, cultivated strawberry (*Fragaria×ananassa*). *Plant Sci.* 242:140 - 150.
- Sathyanarayana, B.N. and J. Blake. 1994. The effect of nitrogen sources and initial pH of the media with or without buffer on *in vitro* rooting of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam). *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture.* Kluwer Academic Publishers, Netherlands. p.77-78.
- Schenk, R.U. and A. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204.
- Schlatmann, J.E., A.M. Nuutila, W.M. Gulik, H.G.J. Hoopen, R. Verpoorte, and J.J. Heijnen. 1993. Scale up of ajmalicine production by plant cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol. Bioeng.* 41(2):253-262.
- Scragg, A.H. 1992. Large-scale plant cell culture: methods, applications and

- products. *Current Option Biotech.* 3(2):105-109.
- Seon, J.H., K.W. Yu, Y.Y. Cui, M.H. Kim, S.J. Lee, S.H. Son, and K.Y. Paek. 1999. Application of bioreactor for the production of saponin by adventitious roots cultures in *Panax ginseng*. p. 329-332. In: A. Altman et al. (eds.). *Plant Biotechnology and in Vitro Biology in the 21st Century*. Kluwer Academic Publishers.
- Shannon, C. E. and W. Wiener. 1963. *The mathematical theory of communication*. Univ. of Illinois Press, Urbana. p. 117.
- Shin, J.S. 1978. Composition and genesis of volcanic ash soils derived from basaltic materials in Jeju Island(Korea). Ph.D. Thesis. State Univ. of Ghent, Belgium.
- Shohael, A.M., H.N. Murthy, H.L. Lee, E.J. Hahn, R. Islam, and K.Y. Paek. 2008. Increased eleutheroside production in *Eleutherococcus senticosus* embryogenic suspension cultures with methyl jasmonate treatment. *Biochem. Eng. J.* 38:270-273.
- Scott, D.H. 1951. Cytological Studies on Polyploids Derived from Tetraploid *Fragaria Vesca* and Cultivated Strawberries. *Genetics* 36(4):311 - 331.
- Singleton, V.L., R. Orthofer, and R.M. Lumuela-Raventos. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology.* 299:152-178.
- Sjulin, T.M., and A. Dale. 1987. Genetic diversity of North American strawberry cultivars. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 112:375-385.
- Sriskandarajah, S., R.M. Skirvin, and H. Abu-Qaoud. 1990. The effect of some macronutrients on adventitious root development on scion apple cultivars *in vitro*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 21:185-189.
- Stapfer, R.E. and C.W. Heuser. 1984. *In vitro* propagation of periwinkle. *HortScience.* 20:141-142.
- Staudt, G. and K. Olbricht. 2008. Notes on asiatic *Fragaria* species V: *F. nipponica* and *F. iturupensis*. *Bot. Jahrb. Syst.* 127(3):317-341.

- Stavarek, S.J., T.P. Croughan, and D.W. Rains. 1980. Regeneration of plants from long-term cultures of alfalfa cells. *Plant Sci. Lett.* 19:253-261.
- Steinitz, B. 1999. Sugar alcohols display non osmotic roles in regulating morphogenesis and metabolism in plants that do not produce polyols as primary photosynthetic products. *J. Plant Physiol.* 155:1-8.
- Takayama, S. 1991. Mass propagation of plants through shake and bioreactor culture techniques. In: Bajaj, Y.P.S. (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 17. Springer-Verlag, Berlin. p.495-515.
- Takayama, S. 2000. Bioreactors, Airlift. In: Spier, R.E., A. Griffiths, and A.H. Scragg (eds.). *The Encyclopedia of Cell Technology (2-Volume Set)*. John Wiley & Sons, Inc., New York. p.201-218.
- Takayama, S. and M. Akita. 1998. Bioreactor techniques for large-scale culture of plant propagules. *Adv. Hort. Sci.* 12:93-100.
- Takayama, S. and M. Akita. 2005. Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. In: A.K. Hvoslef-Eide and W. Preil (eds.). *Practical aspects of bioreactor application in mass propagation of plants*. Springer. Netherlands. p.61-78.
- Takayama, S. and M. Akita. 2008. Plant tissue culture engineering. In: S. Dutta Gupta and Y. Ibaraki (eds.). *Bioengineering aspects of bioreactor application in plant propagation*. Springer-Verlag, Berlin. p.83-100.
- Takayama, S. and M. Misawa. 1981. Mass propagation of *Begonia hiemalis* plantlets by shake culture. *Plant Cell Physiol.* 22:461-468.
- Takayama, S., T. Amo, M. Fukano, K. Nakazawa, and K. Oosawa. 1985. Mass propagation of strawberries by jar fermentor culture. (2) Studies on the optimum conditions in a liquid medium and the establishment of mass propagation scheme using a jar fermentor. *Abst. 1985 Spring meeting of Japanese society for horticultural science*. Jpn. Soc. Hort. Sci. Tokyo p. 210-221.
- Tanaka, F., Y. Watanabe, and N. Shimada. 1990. Effect of O₂ concentration on

- photorespiration in *Chrysanthemum morifolium* plantlets in plant tissue culture. *Jpn. Plant Tiss. Cult. Lett.* 7:85-91
- Tani, A., M. Kiyota, T. Taira, and I. Aiga. 1991. Growth and photosynthesis of alfalfa plantlets cultured *in vitro* under photoautotrophic and photomixotrophic conditions. *Environ. Control in Biol.* 29:127-132
- Thanh, N.T., H.N. Murthy, K.W. Yu, C.S. Jeong, E.J. Hahn, and K.Y. Paek. 2006. Effect of oxygen supply on cell growth and saponin production in bioreactor cultures of *Panax ginseng*. *J. Plant Physiol.* 163:1337-1341.
- Thanh, N.T., H.N. Murthy, K.W. Yu, E.J. Hahn, and K.Y. Paek. 2005. Methyl jasmonate elicitation enhanced synthesis of ginsenoside by cell suspension cultures of *Panax ginseng* in 5-l balloon type bubble bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:197-201.
- Vacin, E.F. and F.W. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solution. *Bot. Gaz.* 110(4):605-613.
- Verpoorte, R., R. Heijden, H.J.G. Hoopen, and J. Memelink. 1999. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnol. Lett.* 21: 467-479.
- Wagner, F. and H. Vogelmann. 1977. Cultivation of plant tissue cultures in bioreactors and formation of secondary metabolites. In: Barz. W., Reinhard E. and M.H. Zenk (eds.). *Plant Tissue Culture and its Bio-Technological Applications*. Springer- Verlag. Berlin.
- Walkley, A., and I.A. Black. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37:29-38.
- Wang, C.J. and E.J. Staba. 1963. Peppermint and spearmint tissue culture. II. Dual-carboy culture of spearmint tissues. *J. Pharm.* 52:1058-1062.
- Watanabe, K., Y. Watanabe, and N. Shimada. 1990. Effect of sucrose concentration in the medium on growth apparent photosynthesis and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase of *Spathyphyllum* plantlets in

- aeration culture. Jpn. Plant Tiss. Cult. Lett. 7:74-79
- Weaver, T. and D. Dale. 1978. Trampling effects of hikers, motorcycles and horses in meadows and forests. Journal of Applied Ecology 15(2):451-457.
- White, P.R. 1963. The cultivation of animal and plant cells. The Ronald Press, New York. p.228.
- Williams, R.R., A.M. Taji, and J.A. Bolton. 1985. Specificity and interaction among auxins, light, and pH in rooting of Australian woody species *in vitro*. HortiScience 20:1052-1053.
- Woodward, A.J., I.J. Bennett, and S. Pusswonge. 2006. The effect of nitrogen source and concentration, medium pH and buffering on *in vitro* shoot growth and rooting in *Eucalyptus marginata*. Sci. Hortic. 110:208-213.
- Wu, C.H., Y.H. Dewir, E.J. Hahn, and K.Y. Paek. 2006. Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. J. Plant Biol. 49:193-199.
- Wu, J. and J.J. Zhong. 1999. Production of ginseng and its bioactive compounds in plant cell culture: current technological and applied aspects. J. Biotechnol. 68:89-99.
- Yang, Y. and T.M. Davis. 2017. A new perspective on polyploid *Fragaria*(strawberry) genome composition based on large-scale, multi-locus phylogenetic analysis. Genome Biology and Evolution, evx214, <https://doi.org/10.1093/gbe/evx214>.
- Yoeum, M.L., S.K. Lee and P.K. Yeoup. 2000. Micropropagation of *Cucurbita foetidissima* and *Asclepias syriaca* through shoot trip culture of seedling. Kor. J. Plant Tis. Cult. 1:63-69.
- Yu, K.W., E.J. Hahn, and K.Y. Paek. 2000. Production of adventitious ginseng roots using bioreactors. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 27:309-315.
- Zeng, S.J., S.J. Cheng, J.L. Zhang, and F.P. Zhao. 1998. Embryo culture and propagation of *Dendrobium in vitro*. Hort. Sinica 25:75-80.
- Zhang, Y.H., J.J. Zhong, and J.T. Yu. 1996a. Enhancement of ginseng saponin

- production in suspension cultures of *Panax notoginseng*: Manipulation of medium sucrose. J. Biotechnol. 51:49-56.
- Zhang, Y.H., J.J. Zhong, and J.T. Yu. 1996b. Enhancement of ginseng saponin production in suspension cultures of *Panax notoginseng*: Manipulation of medium sucrose. J. Biotechnol. 51:49-56.
- Zhang, W., M. Seki, S. Furusake, and A.P.J. Middelberg. 1998. Antocyanin synthesis, growth and nutrient uptake in suspension cultures of *Strawberry* cells. J. Fement. Bioeng. 86:72-76.
- Zhong, J.J. and S.J. Wang. 1998. Effects of nitrogen source on the production of ginseng saponin and polysaccharide by cell cultures of *Panax quinquefolium*. Process Biochem. 33:671-675.
- Zhou, J.H., X.F. Zhong, and D.W. Cai. 2005. Study of tissue culture and rapid propagation in *Dendrobium candidum*. J. Zhongkai Agrotech. College 18:23-26.
- Ziv, M. 1992. The use of growth retardants for the regulation and acclimatization of *in vitro* plants. In: Karssen, C.M., L.C. Van Loon, and D. Vreugdenhil (eds.). Progress in plant growth regulation. Current Plant Sci. Biotech. in Agric., Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands. p. 809-817.
- Ziv, M. and A. Hadar. 1991. Morphogenic pattern of *Nephrolepis exaltata* *Bostoniensis* in agar-gelled or liquid culture. Implication for mass propagation. Israel. J. Bot. 40:7-16.
- 大貫靖浩, 酒井正治, 稻垣昌宏. 1999. 屋久島登山道における難透水層の形成. 地形 20: 541-550.
- 日本材料學會土質安定材料委員會. 1981. 斜面安定工法-指針と解説. 鹿島出版會.
- 고명석, 배기화, 송관필, 소인섭. 2013. 희귀수종인 주걱비름(*Sedum tosaense* Makino)의 잎절편으로부터 기내 식물체 재분화 및 광독립배양을 통한 토양 순화. 식물생명공학회지 40: 79-87.
- 고석형, 강태우. 2012. 한라산국립공원 자연자원조사. 제주특별자치도 한라산연구

- 소 p. 353-392.
- 고정균. 2000. 한라산 고산식물의 생태생리학적 연구. 제주대학교 박사학위논문.
- 고정균, 문명옥, 고석찬. 1999. 한라산 백록담 분화구내의 식생과 식물자원. 한국 자원식물학회지 12(3):221-233.
- 고현민, 엄태길, 송선경, 조가영, 김주성. 2017. 서양금혼초 부위별 추출물의 티로신에이즈, α -글루코시다아제 저해활성 및 항산화효과. 한국약용작물학회지 23(3):139-145.
- 공공데이터포털. <https://www.data.go.kr/dataset/3084205/fileData.do>. 한국정보화진흥원.
- 공우석, 김건옥, 이슬기, 박희나, 조수현. 2014. 한반도 주요 산정의 식물종 분포와 기후변화 취약종. 환경영향평가 23(2):119-136.
- 공우석, 이슬기, 윤광희, 박희나. 2011. 풍혈의 환경특성과 식물지리적 가치. 환경영향평가 20(3):381-395.
- 공우석. 1988. 한라산 고산식물의 분포 특성. 대한지리학회 33(2):191-208.
- 공우석. 2005. 지구온난화에 취약한 지표식물 선정. 한국기상학회지 41(2-1):263-273.
- 공우석. 2007. 생물지리학으로 보는 우리식물의 지리와 생태 1. 지오북.
- 국립공원관리공단. 2017. 2017 국립공원기본통계 p. 12-13
- 국립기상연구소. 2009. 기후변화 이해하기 II -한반도 기후변화: 현재와 미래-, 국립기상연구소 기후연구과.
- 국립생물자원관. 2012. 한국의 멸종위기 야생동·식물 적색자료집 관속식물 p.295
- 기상청 국가기후데이터센터. <http://sts.kma.go.kr>.
- 김은진, 최주연, 유미리, 김미영, 이상현, 이복희. 2012a. 자생식물과 생약자원 추출물의 폴리페놀, 플라보노이드 함량 및 항산화 활성 탐색. 한국식품과학회지 44(3):337-342
- 김대영, 광정호, 박수형, 장석우, 윤무경. 2012b. 딸기 종자의 NaOCl 및 저온 처리가 발아에 미치는 영향. 한국원예학회 학술발표요지 p. 99.
- 김문홍. 1993. 제주도 관속식물의 연구와 제문제(식물상 및 특산식물의 기재와 식생대 구분을 중심으로). 한국생물과학협회 생물과학심포지움 14:109-131.

- 김세천, 박종민. 1998. 모악산도립공원 등산로의 환경훼손 실태 및 이용영향에 관한 조사연구. 한국조경학회지 25:39-50.
- 김준철, 박영찬, 이광웅, 조성호, 한태진. 1996. 참나물(*Pimpinella brachycarpa*) 경단절편체로부터 다량의 이차체세포배 발생과 식물체 재분화. 한국식물조직배양학회지 23(3):189-194
- 김찬수, 강영제, 문명옥, 송관필. 2006. 한라산의 식물. 제주도·한라산생태문화연구소.
- 김태호. 2003. 한라산과 다랑쉬오름 등산로의 답압에 의한 토양 압밀현상. 한국지역지리학회지 9:169-179.
- 김태호. 2008. 한라산 성관악 등산로 노폭의 확대 속도와 요인. 대한지리학회지 43(3):296-311.
- 김현철. 2009. 제주조릿대의 생태학적 특성 및 관리방안. 제주대학교 대학원 박사학위논문.
- 김현철, 정세호. 2017. 아고산대 제주조릿대 분포 및 생육특성. 제주특별자치도 세계유산본부 조사연구보고서 16:167-176.
- 김혜진. 2011. Bioreactor를 이용한 사계성 딸기의 무병묘 대량증식시스템개발. 강원대학교 식물생명공학과 박사학위논문.
- 김혜진, 이종남, 김기덕, 임학태, 용영록. 2015. 딸기 조직배양 시 BA와 IBA의 혼합처리가 체세포영양계 변이 발생에 미치는 영향. 한국원예학회 학술발표요지 p. 42-43.
- 농촌진흥청 농사로. 딸기 시설재배 적정 토양화학성.
<http://www.nongsaro.go.kr/portal/ps/psx/psxe/oneClickFarmngTchnlgyLst.ps?menuId=PS04148&classCode=A010801>
- 문흥규, 김용욱. 2008. 회귀 및 멸종위기 수종 개느삼의 액아배양을 통한 기내번식. 식물생명공학회지 35(3): 229-234.
- 문흥규, 석진영, 권영진, 손성호. 1999. 액아배양에 의한 회귀 수종 미선나무의 기내번식. 식물조직배양학회지 31(2): 133-136.

- 배기화, 김기주, 김남영, 송재모. 2012. 제주 용암해수를 이용한 희귀식물 자란 (*Bletilla striata*)의 기내배양. 식물생명공학회지 39: 281-287.
- 배기화, 유경화, 김지아, 윤의수. 2014. 멸종위기종 등근잎펄의비름 [*Hylotelephium ussuriense* (Kom.) H. Ohba]의 기내 증식. 식물생명공학회지 41: 38-43.
- 산림청 국립수목원. 2008. 한국 희귀식물 목록집 p.122
- 서병수, 김세천, 박종민, 이창현, 이규완. 1994. 덕유산국립공원 등산로의 환경훼손에 대한 이용영향. 한국임학회지 83:286-298.
- 수목원·정원의 조성 및 진흥에 관한 법률 시행규칙 별표 1의3(2012.01.26)
- 오구균, 허순호. 1992. 한라산국립공원 등산로와 주변의 환경훼손. 응용생태환경학회지 6:55-71.
- 오문경. 1996. 한라산국립공원의 훼손방지 방안. 제주대학교 석사학위논문.
- 오춘화. 2007. *Echinacea purpurea* 부정근의 생물반응기 배양과 활성물질의 생산. 충북대학교대학원 박사학위논문.
- 우보명. 1986. 한라산국립공원 백록담지구 훼손지 복구공법 개발에 관한 기초적 연구 및 복구시설 설계 용역보고서. 서울대학교 농업개발연구소.
- 윤국병. 1977. 조경배식학. 일조각.
- 윤형권. 1992. 딸기의 생육 단계별 광합성 특성. 강원대학교 석사학위논문.
- 이슬기. 2011. 기온 상승이 식물 분포에 미치는 영향과 취약성 분석. 경희대학교 석사학위논문.
- 이영노, 이명보. 1957. 한라산 화구내 식물과 토도 식물. 약학회지 4(1):21-34.
- 이우철. 1996. 원색한국기본식물도감. 도서출판 아카데미서적 p.161.
- 이은정. 2009. 섬오갈피 부정근의 생물반응기 배양과 생리활성물질 생산. 충북대학교 대학원 박사학위논문.
- 이창복. 2014. 원색대한식물도감. 향문사(상) p.518.
- 정진현, 구교상, 이충화, 김춘식. 2002. 우리나라 산림토양의 지역별 이화학적 특성. 한국임학회지 91(6):694-700.
- 제주도. 2000. 한라산 기초조사 및 보호관리수립.
- 제주도. 2006. 한라산 총서 VI-한라산의 등반 개발사. 제주도 한라산생태문화연구소 p. 264.

- 최혜연. 2012. 생물반응기 시스템을 이용한 *Dendrobium candidum* PLB(Protocorm-like body)의 대량증식과 생리활성물질 생산. 충북대학교 대학원 박사학위논문.
- 현해남. 2006. 한라산천연보호구역의 토양. 한라산천연보호구역 학술조사 보고 서 제주특별자치도 한라산연구소 pp 87-108.
- 한라산국립공원관리사무소. 1997. 한라산정상보호계획.
- 한무석, 문홍규, 강영제, 김원우, 강병서, 변광옥. 2004. 멸종위기식물 피뿌리풀의 기내증식. 식물생명공학회지 31(1): 31-35.
- 환경부. 2007. 전국 자연환경조사 지침(제3차) -식물상-. 한국환경정책평가연구원. 서울 p.10.
- 환경부. 2012a. 국외반출 승인대상 생물자원 자료집 p.6-433.
- 환경부. 2012b. 제4차 전국자연환경조사 지침 p.185-216.

감 사 의 글

20살 때 산악부 생활로 만나 항상 같은 모습으로 나를 지켜봐주고 때로는 비바람으로 시련을 주기도 하였지만 이 논문을 마무리 할 수 있게 흰땀팔기를 품어준 한라산에게 먼저 감사하다는 말을 전합니다.

학부와 대학원생활까지 따뜻한 관심과 격려로 지도해주신 송창길 교수님과 바쁘신 가운데 이 논문을 심사해 주신 현해남 교수님, 강영길 교수님, 김철수 박사님, 김찬우 박사님의 세심한 배려 감사드립니다. 그리고 학부와 대학원에서 많은 가르침을 주신 전용철 교수님, 김동순 교수님, 김주성 교수님과 항상 뒤에서 많은 것을 챙겨준 조교 이종훈 선생에게 감사드립니다.

많은 관심과 조언으로 이 논문의 완성을 도와주시고 제가 식물들과 친해질 수 있도록 많은 가르침을 주신 신용만 선생님과 현원학 선배님, 김현철 선배님께 감사드리며, 아낌없는 조언과 관심을 주시고 자연과 생태에 많은 가르침을 주신 제주특별자치도 세계유산본부의 고정균 박사님, 오장근 박사님, 고석형 박사님, 고윤정, 부재윤, 김영탁, 김경범, 강희석, 송순영, 이수영 선생님께 감사드립니다.

언제나 뒤에서 많은 도움을 준 자원식물연구회의 강영식, 정대천, 송상철, 송진영, 강정환, 문상호, 차미경, 박정식 선배님과 사랑하는 후배 오동은, 최고봉, 권난희, 신용하, 차진우, 현도경, 현명선, 노수방 선생과 친환경농산물인증센터의 하영삼, 강무용, 현진아 선생을 비롯하여 장용석, 김용근, 김상현 선배님들과 많은 대학 및 대학원 선.후배님들께 감사드립니다.

항상 옆에서 응원해주고 지켜봐준 내 친구 이영돈, 정봉식, 박원배, 송석근, 윤창호, 우성배, 박송훈, 양영섭, 이진호, 안용준, 김정자, 신지은과 식자과 졸업동기 한걸음 친구들과 내가 언제 졸업할지 내내 마음 졸인 냉커피 김대현, 오성훈, 현길성, 김양환, 양홍중, 부경환, 김봉철 회원들에게 감사드립니다. 그리고 나보다 더 논문 인쇄를 위하여 많은 신경을 써주신 카피앤바인딩 정승룡 형님 부부에게 감사드립니다.

항상 모자라고 걱정스러운 막내아들을 지켜봐 주신 어머니, 그리고 누나들과 매형들, 형과 형수님 사랑하는 조카 선영, 지은, 윤서, 재환, 해진, 상준, 상훈에게 감사드리며, 하늘에서 응원해주신 아버지 늦어서 죄송합니다.

사랑하는 딸 근향이를 내게 주신 장인, 장모님을 비롯한 처제 내외와 처남에게 감사드리며, 앞으로 살아온 날보다 같이 살아갈 날이 많은 근향아 우리 오순도순 행복하게 살자 ~ ^^

이외에도 거론하지는 못하였지만 저에게 많은 도움을 주신 모든 분들께 감사드립니다.

새로운 시작을 준비하면서....