

생물반응기에서 현삼의 신초 형성과 발근

한석훈*·채영암*

Production and Rooting of Shoots in Bioreactor Culture of *Scrophularia buergeriana* Miquel

Suk Hoon Hahn* and Young Am Chae*

ABSTRACT : This study was carried out to know the factors affecting on shoot formation and rooting for stable and routine production of plantlets in bioreactor culture of *Scrophularia buergeriana*. Multiple shoots were formed effectively when explants were transplanted on the MS media with decreased concentration of NH_4NO_3 as 413mg/l. Three hundred stem explants (0.8-1.0cm) was appeared as proper inoculation size in bioreactor culture. IBA (0.05mg/L) was more effective for rooting of the shoots in liquid as well as solid media. Six weeks long culture of explants in bioreactor gave better shoot shape for rooting on solid half-strength MS media.

Key words : *Scrophularia buergeriana*, multiple shoots, rooting, inoculum size, culture period, Bioreactor culture

서 언

현삼(*Scrophularia buergeriana*)은玄蓼科에 속하는 다년생 초본으로 뿌리를 생약재로 이용하는 주요 약용작물 중의 하나로 종자와 종근으로 번식한다. 종자로 번식을 할 경우 발아와 생육이 불균일하며 1년간의 육묘를 거쳐 이식을 해야하는 단점이 있다. 뿌리로 번식을 할 경우 그해에 큰 뿌리를 얻을 수 있으나 증식율이 낮고 종근 보관의 어려움이 있으며 번식 시 발생한 상처를 통한 바이러스와 세균성 병원균의 침입을 피할 수 없어 시간 경과에 따라 수확량과 품질이 저하된다고 하였다(김등,

1995).

조직배양 번식의 이점은 단일 절편에서 많은 배가 발생하고, 유전적으로 완전한 식물체가 될 수 있는 유전정보를 모두 갖추고 있다고 하였다(Kirstein, 1993). 생물반응기는 이러한 조직배양의 규모를 확대시킬 수 있으며 일반적으로 진탕 배양보다 공기의 공급이 우수하기 때문에 더 좋은 배양 결과를 얻을 수 있다고 하였다(이 등, 1995).

생물반응기를 통해 생산된 종묘는, 대부분의 기간을 액체배지에서 성장함으로 유리화, 과수화 현상이 나타난다. 이러한 유리화 문제점을 극복하고 포장 이식 시 정상적으로 성장하기 위해서는 기내 배양 기간 중 건설한 유식물체로의 생육하기 위한

* 서울대학교 식물생산과학부 (School of Plant Science, Seoul National Univ. Suwon 441-744, Korea)

< 2000. 3. 4 접수 >

여러 조건이 반드시 확립되어야 한다.

현삼의 기내배양은 고체배지에서 재분화(채 등, 1993)와 현탁배양을 통한 신초의 유도가 이루어졌으나(임, 1998) 포장 이식이 가능한 종묘로의 발근과 생장에 관한 연구는 보고되지 않았다.

본 실험에서는 생물반응기를 이용한 대량 유향 생산 가능성을 확인하기 위하여 생물반응기에서 신초형성을, 적정 배양밀도, 배양기간과 신초 형성 및 신초의 발근 등에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

1. 생물반응기

실험에 사용된 생물반응기는 inner-loop가 없는 구형 (sphere type) air-lift type 이었으며, 운용 조건은 공기유입량 0.6 m³/sec, 광주기 16시간(명)/8시간(암), 온도는 25℃를 유지하였다.

2. 공시재료

현삼의 재료 확보 및 유지를 위하여 종자로부터 무균 발아된 식물체를 축아를 포함하도록 자른 마디를 마젠타 배양병을 이용, MS(Murashige & Skoog) 기본배지 (hormone free, 0.8% agar)에 치상하여 증식 및 유지하여 실험 재료로 사용하였다.

3. 생물반응기에서 multiple shoot 유도

MS 기본 액체배지 (BA 1mg/l + IAA 0.1mg/l 포함) 1.5L와 NH₄NO₃를 413mg/l로 조절한 MS 배지 (BA 1mg/l + IAA 0.1mg/l 포함) 1.5L에 현삼 줄기 조직 (0.8-1cm)을 각각 300 개체씩 접종하여 배양 후 4주부터 7일 간격으로 형성된 신초 수와 생체중을 조사하였다.

4. 생물반응기 배양의 적정 배양밀도

NH₄NO₃를 413mg/l로 조절한 MS 배지 (BA 1mg/l + IAA 0.1mg/l 포함) 1.5L에 각각 줄기조직을 300 개체와 400 개체씩 접종하여 배양 후 4주부터 7일 간격으로 형성된 신초수와 생체중을 조사하였다.

5. 옥신종류와 농도에 따른 신초의 발근

현삼의 기내 발근에 효과적인 옥신의 종류와 농도를 구명하고자 NH₄NO₃를 413mg/l로 조절한 MS 배지에서 4주간 배양 후 배지 농도를 1/10으로 감소시킨 MS 기본배지에 IAA, IBA 및 NAA를 농도별 (0, 0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1mg/l)로 처리한 후 500ml 플라스크에서 4주간 배양하여, 발근 수와 발생된 뿌리의 길이를 측정하였다.

6. 생물반응기에서 배양기간에 따른 신초의 생장과 발근

생물반응기에서 각각 4주, 5주, 6주 동안 배양한 후에 형성된 신초의 수와 생체중 그리고 신초를 발근 호르몬 IBA 0.05mg/l를 첨가한 액체배지 (1/10X MS)에 치상하여 발근 수와 뿌리길이를 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 생물반응기에서 multiple shoot 유도

500ml 플라스크 조건에서 수행되었던 연구결과 중 MS배지에서 NH₄NO₃의 양을 1/4로 줄였을 때 신초 형성율이 높았다(임, 1999). 이 조건이 생물반응기에서도 유효한지를 알아보기 위하여 MS 기본 액체배지 (BA 1mg/l + IAA 0.1mg/l 포함) 1.5L와 NH₄NO₃를 413mg/l로 조절한 배지 (MS + BA 1mg/l + IAA 0.1mg/l 포함) 1.5L에 현삼 줄기조직을 각각 300 절편씩 접종하여 4, 5, 6주간 배양한 후 신초의 수와 생체중을 조사한 결과는 표 1과 같다.

기본 MS배지 시험구와 NH₄NO₃의 양을 1/4로 줄인 시험구 모두 배양기간이 길수록 생체중과 신초의 수가 증가되는 경향을 보였다. 신초의 수는 배양기간 동안 NH₄NO₃의 양을 1/4로 줄인 MS배지에서 full MS 배지에서 보다 증가되었으나 생체중은 감소되었다. 신초의 수가 많음에도 생체중이 적은 것은 NH₄⁺ 농도를 감소시키면 세포의 목질화를 증가시켜 유리화 발생률을 낮출 수 있다는 보고 (Leonhardt & Kandeler, 1987)와 들능금과 뱀무 (Geum)에서 유리화의 감소에 따라 생체중이 감

Table 1. Effect of NH_4NO_3 concentration and culture period on mean shoot development per explant in bioreactor culture of *Scrophularia buergeriana*

Culture period (week)	No. of shoot			Fresh weight (g)		
	MS	1/4 NH_4NO_3 MS	Mean (F-Test ^{**})	MS	1/4 NH_4NO_3 MS	Mean (F-Test ^{**})
4	8.5	11.6	10.10 ^c	1.45	0.29	0.84 ^c
5	9.6	12.5	10.96 ^{ab}	2.45	1.07	1.72 ^b
6	10.4	12.9	11.61 ^a	2.72	1.92	2.30 ^a
Mean (F-Test)	9.56b (**)	12.30a (**)		2.21a (**)	1.09b (**)	

소하였다는 보고 (Turner & Singha, 1990) 와 같이, 기본 MS 배지에 비해 신초의 유리화가 진전되지 않았기 때문으로 생각된다. 따라서, 생물반응기에서 현삼 배양은 MS 기본배지의 NH_4NO_3 양을 1/4 로 줄여 413mg/l 의 농도로 처리하고 5주 이상 배양하는 것이 신초의 유도에 유리한 것으로 판단되었다.

2. 생물반응기 배양의 적정 배양밀도

플라스크를 이용한 현삼 조직배양 실험에서 배지 150ml 에 줄기 절편체 30개를 접종하였으나 (임, 1999), 플라스크와 생물반응기의 배양 공간과 배지 순환에 따른 조직 유동에 차이가 있다. 따라서 생물반응기에서 현삼 조직의 적정 접종량을 결정하고자, BA 1mg/l 와 IAA 0.1mg/l 를 첨가하고 NH_4NO_3 를 413mg/l 로 조절한 MS 배지 1.5L 에 현

삼 줄기조직 (0.8-1cm) 300절편과 400절편씩을 각각 접종하였다. 배양 후 4주부터 7일 간격으로 시료를 채취하여 발생된 신초의 수와 생체중을 조사한 결과를 표 2에서 보면 300개체를 접종한 시험구가 400개체를 접종한 시험구에 비해 배양기간에 관계없이 신초의 수가 다소 증가되는 경향을 보였다. 300개체 접종구에서는 신초의 생육이 6주 후 까지 꾸준히 증가하는 반면, 400개체 접종구에서는 5주 후 신초의 생육이 더 이상 진전되지 않았다. 이는 400개체 이상을 접종할 경우 생물반응기 내에서 발생된 현삼의 신초들이 과밀화된 상태로 성장하게 되기 때문에 오히려 생육이 저해되고, 생물반응기 중심부 및 배지 위로 노출된 신초는 괴사되었기 때문이었다. 따라서 신초의 생체중이 무거우면서도 신초수를 많게 하기 위해서는 적정 접종량은 300개체로 하는 것이 유리한 것으로 판단되었다.

Table 2. Effect of explant numbers inoculated into bioreactor with 1.5L liquid media on mean shoots development of *S. buergeriana*

Culture period (week)	No. of shoot			Fresh weight (g)		
	300 explant	400 explant	Mean (F-Test ^{**})	300 explant	400 explant	Mean (F-Test ^{**})
4	11.6	10.9	11.16 ^b	0.29	0.75	0.53 ^c
5	12.5	11.9	12.20 ^a	1.07	1.39	1.22 ^b
6	12.9	11.6	12.23 ^a	1.92	1.48	1.70 ^a
Mean (F-Test)	12.30a (*)	11.35b (*)		1.09 (NS)	1.18 (NS)	

3. 액체배지에서 발근유도

현삼에서 신초 형성이후 완전한 개체로 발육이 되기 위해서는 신초 발생과 함께 발근이 이루어져야 한다. 기내배양 식물의 발근을 위해서는 주로 고체 배지가 이용되나(허, 1995), 액체배지에서 발근을 유도할 경우 기내배양 현삼 묘의 순화기간을 단축시킬 수 있을 것으로 기대 되었다. 따라서, 적합한 옥신의 종류와 농도를 구명하고자 NH

Table 3. Effect of auxins on root development from shoots of *S. buergeriana* cultured in modified liquid MS media

Concentration (mg/l)	No. of root		
	IAA	IBA	NAA
0	-	0.8 ^{ca}	-
0.001	2.6 ^{bc}	1.5 ^{cd}	0.2 ^d
0.01	1.0 ^{cd}	1.0 ^{cd}	0.5 ^{cd}
0.05	3.4 ^{ab}	4.6 ^a	0.0 ^d
0.1	0.8 ^{cd}	0.0 ^d	1.8 ^{cd}
0.5	0.4 ^d	1.6 ^{cd}	4.3 ^a
1	0.4 ^d	3.5 ^b	0.2 ^d

Within columns, means followed by the same letter are not significantly different at p=0.05.

Table 4. Effect of auxins on elongation of roots developed from shoot of *S. buergeriana* cultured in modified liquid MS media

Concentration (mg/l)	No. of root		
	IAA	IBA	NAA
0	-	1.8 ^{cde}	-
0.001	3.9 ^{bc}	4.1 ^b	0.2 ^c
0.01	2.6 ^{bcd}	1.2 ^{de}	0.6 ^{de}
0.05	4.9 ^{ab}	5.8 ^a	0.0 ^e
0.1	1.4 ^{de}	0.0 ^e	2.2 ^{cd}
0.5	0.6 ^{de}	3.2 ^{bc}	3.9 ^{bc}
1	0.8 ^{de}	2.8 ^{bcd}	0.2 ^e

Within columns, means followed by the same letter are not significantly different at p=0.05.

NO₃의 양을 413mg/l로 조절한 MS 액체 배지에 줄기 조직을 300개체 접종하여 4주간 배양한 후, 배지 농도를 1/10으로 감소시킨 MS 기본배지에 IAA, IBA 및 NAA의 농도를 각각 6수준으로 처리하여 4주간 배양한 후, 발근수와 발생된 뿌리의 길이를 측정 한 결과는 표 3 및 4와 같다.

발근 수는 옥신 농도 0.05mg/l에서 IAA는 3.4개, IBA는 4.6개로 IBA에서 높았으며, NAA는 0.5mg/l의 고농도에서 4.3개로 효과가 있었다. 뿌리의 길이도 발근 수와 같은 경향을 보였다. 이는 부자에서 기내 발근 유도시 IBA 처리가 효과적이었던 것(성 등, 1993)과, eucalyptus에서의 실험결과(Yang et al, 1995)와 유사하다. 그러나, 중국 무의 경우 IAA가 효과적인 것(Pua et al, 1996)과는 차이가 있다. 종합적으로 보아 발근 수 및 뿌리의 길이 성장에 가장 효과적인 옥신의 종류는 IBA이었으며, 농도는 0.05mg/l로 매우 저 농도에서 효율이 높은 것을 확인되었다. NAA 0.05mg/l와 IBA 0.1mg/l에서는 실험의 오차로 인하여 정확한 결과를 얻지 못하였다. 그러나 액체배지 상태에서는 잎이 전개가 되지 않아 정상적인 묘로의 성장에 불리하였다. 따라서 고체배지 상태에서 신초의 발근과 순화가 동시에 이루어지도록 하는 것이 유리한 것으로 판단되었다.

4. 배양기간이 신초 형성과 기내 발근에 미치는 영향

생물반응기에서 유도한 신초의 알맞은 수확 시기를 알아보기 위하여 BA 1mg/l와 IAA 0.1mg/l가 첨가된 MS 배지 1.5L에 현삼 조직 300 절편을 접종하여 배양 4주 후부터 7일 간격으로 시료를 채취하여 각 절편 당 발생된 신초의 수와 생체중을 조사하였다(Table 5). 이 신초들을 표 3, 표 4에서 결정된 발근 유도 배지(1/10X MS+ IBA 0.05mg/l)로 옮겨 100ml 플라스크 조건에서 2주간 배양한 후 발생된 뿌리의 수와 길이를 조사하였다(Table 6).

실험결과 배양 후 6주까지 신초 수와 생체중은 지속적으로 증가하였고(표 5), 발근 양상은 생물반응기에서 6주간 배양 후 발근 배지로 옮겨 배양한 시험구에서 뚜렷하게 증가하였다. 따라서 이때가 생물반응기에서 신초의 수확 적기라고 판단되었다(표 6). 이는 현삼의 기내배양에 있어서 신초의 생육이

Table 5. Effect of culture period on the numbers and fresh weight of shoots per explant inoculated in bioreactor of *S. buergeriana*

Culture period (week)	No. of shoot	Fresh weight (g)
4	8.7	1.45 ^b
5	9.6	2.45 ^a
6	10.4	2.72 ^a
F-Test	NS	**

Within columns, means followed by the same letter are not significantly different at p=0.05.

Table 6. Effect of culture period in bioreactor before transfer on to rooting media on numbers and length of roots of *S. buergeriana*

Culture period (week)	No. of root	Root length (cm)
4	0.9b	0.65b
5	1.2b	0.70b
6	3.8a	3.35a
F-Test	**	**

Within columns, means followed by the same letter are not significantly different at p=0.05.

선행되어야 함을 의미한다. 한편 생물반응기에서 6주간 생육 후 peristaltic pump를 이용해서 발근 배지로 교환하여 2주간 배양하였을 때, 전체 시료의 약 68%가 발근되었고 뿌리의 수는 1.05개, 뿌리의 길이는 1.98cm으로 100ml 플라스크 조건에서의 결과와 차이를 보였다. 이는 생물반응기 내에서 현삼 조직들이 과밀집되어 있어 발근에 영향을 미친 것으로 판단된다. 현삼 조직을 생물반응기에서 6주간 생육 후 분체형의 발근제 (pokon, rooton)를 처리하였을 경우에는 발근이 전혀 이루어지지 않았다.

요 약

본 실험은 생물반응기를 이용한 현삼 종묘의 기내생산과 기내 발근에 관여하는 요인을 검토하여 추후 종묘의 건전한 생육과 안정적 생산에 활용할

수 있는 기초자료를 얻고자 실험한 결과는 다음과 같다.

1. 생물반응기에서 현삼 배양은 MS 기본배지의 NH_4NO_3 양을 1/4로 줄여 413mg/l의 농도로 처리하고 6주간 배양하는 것이 신초의 유도에 유리하였다.
2. 생물반응기 배양시 신초의 형성과 성장에는 NH_4NO_3 를 413mg/l로 줄인 MS 배지가 유리하였다.
3. 배지량 1.5L의 생물반응기에서 줄기 절편의 접종량이 300개 이상일 경우 기내 식물체가 과밀화되어 신초의 생육이 저해되고, 생물반응기 내부 및 배지 위로 노출된 신초는 괴사되었다. 따라서 신초의 생체중이 무거우면서도 신초수를 많게 하기 위해서는 적정 접종량을 300개체로 하는 것이 유리하였다.
4. 신초의 발근 수와 길이생장에는 IBA 0.05mg/l가 효과적이었다.
5. 생물반응기에서 6주간 배양하는 것이 신초의 생육이 정상적으로 되었으며 또한 이들 신초에서 발근과 뿌리의 발육에도 유리하였다.

LITERATURE CITED

- Chae, Y.A., S.U. Park and H.H. Kim, 1993. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf tissues in *Scrophularia buergeriana*, Kor. J. Plant Tissue Culture 20(3) : 125-128.
- Kirsten, F. C. Daniel, W. Brown and K. Joy, 1993. Characterization of competence during induction of somatic embryogenesis in alfalfa tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 34 : 125-132.
- Leonhardt, W. and R. Kandeler, 1987. Ethylene accumulation in culture vessels-a reason vitrification. Acta Hort. 212 : 223-229.
- Lim, W.S. and Y.A. Chae, 2000. Effects of carbon and nitrogen sources on shoot formation in bioreactor culture of *Scrophularia buergeriana*. Kor. J. Medicinal Crop Sci. 8(1) : 1-5.
- Pua, E.C., G.E. Sim, G.L. Chi and L.F. Kong. 1996. Synergistic effect of ethylene inhibitors and putrescine on shoot regeneration from hypocotyl explant of Chinese radish (*Raphanus sativus* L. var.

- longipinnatus* Bailey) in vitro. Plant Cell Reports 15 : 685-690
- Turner, S.R. and S. Singha. 1990. Vitrification of Crabapple, Pear, and Geum on Gellan Gum-solidified Culture Medium. Hortscience 25(12) : 1648-1649
- Yang, J. C., J. D. Chung and Z. Chen. 1995. vegetative propagation of adult *Eucalyptus grandis* X *urophylla* and comparison of growth between micropagated plantlets and rooted cuttings. Plant Cell Reports 15 : 170-173
- 김규원, 백기화, 정근식, 정재동, 최광태. 1996. 식물조직배양·기술 (4) : p27-28, p53-54
- 성낙술, 박충헌. 1993. 기내배양에 의한 부자 우량종묘 증식기술 개발. 부자·지황의 기내증식 기술개발 보고서 : p 9-15
- 이용현, 이기명. 1995. 기내 유묘생산의 자동화기술. 최신생물공학, 식물편 I, p207-220
- 허태린. 1995. 기내 배양묘의 순화와 환경 스트레스. 최신생물공학. 식물편 I. p273-278