

생물반응기 생산 현삼 신초의 순화에 미치는 배지의 영향

한석훈*·채영암*†

*서울대학교 식물생산과학부

Effects of Composition and Concentration of Media on the Acclimation of the Shoots of *Scrophularia buergeriana* Miquel Produced in Bioreactor

Suk Hoon Hahn* and Young Am Chae*†

*School of Plant Science, Seoul National Uni., Suwon 441-744, Korea

ABSTRACT : This study was carried out to investigate the optimum composition and concentration of medium for the acclimation of the shoots derived from bioreactor culture of *Scrophularia buergeriana*. Rooting and growth of the shoots cultured in bioreactor for 4 weeks were better on liquid full strength MS medium while one-tenth of MS medium was good for rooting and growth of the shoots cultured in bioreactor for 6 weeks. Leaf expansion was more effective in the shoots cultured for 6 weeks on solid MS medium than in those cultured for 4 weeks. No leaf expanded in liquid medium. Vitrification rate was higher in full strength solid MS medium than in half strength MS medium. It is concluded that acclimation of the shoots is more effective on the half strength solid MS medium containing 1.2% agar.

Key words : *Scrophularia buergeriana*, Bioreactor, Rooting and growth of shoots, Media, Acclimation

서 언

현삼은 종자로 번식시킬 경우 1년간 육묘하여 묘를 이식해야하는 단점이 있다. 뿌리로 번식시킬 경우에는 당해에 큰 뿌리를 얻을 수 있으나 증식율이 낮고 묘두 보관의 어려움이 있으며, 번식시 발생한 상처를 통한 바이러스와 세균성 병원균의 침입을 피할 수 없어 시간 경과에 따라 수확량과 품질이 저하될 수 있다. 조직배양의 이점은 단일 절편에서

한번에 많은 배를 얻을 수 있다 (Kintzios and Tarvira, 1997). 생물반응기는 이러한 조직배양의 규모를 확대시킬 수 있으며, 일반적으로 진탕 배양보다 공기의 공급이 우수하기 때문에 더 좋은 배양 결과를 얻을 수 있다(이 등, 1995). 현삼의 기내배양은 고체배지에서의 재분화(Chae et al, 1993)와 현탁배양을 통한 신초의 유도가 이루어졌으나(Lim and Chae, 2000), 포장 이식이 가능한 종묘로의 생장에 관한 연구는 보고되지 않았다. 본 실험

† Corresponding author (Phone) E-mail : yachae@plaza.snu.ac.kr

Received Jan. 13, 2001

에서는 생물반응기에서 생산된 신초의 기내순화와 관련된 MS 배지에 첨가된 암모니아태질소의 양과 배지의 농도의 영향을 분석하여 추후 종묘의 건전한 생육과 안정적인 생산에 이용할 수 있는 기초자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

1. 배양조건

실험에 사용된 생물반응기는 inner-loop가 없는 구형의 공기부양형이었으며, 운용조건은 공기 유입량 0.6 m³/sec, 16시간 광/ 8시간 암, 온도는 25℃를 유지하였다.

2. 재료의 확보 및 유지

종자로부터 무균 발아된 식물체를 측아를 포함하도록 자른 마디를 MS(Murashige and Skoog, 1962) 기본배지 (0.8% 한천)를 넣은 마젠타 배양병에 치상하여 증식 및 유지하면서 실험재료로 사용하였다.

3. 생물반응기에서 신초의 유도

MS 기본 액체배지 (BA 1mg/l, IAA 0.1mg/l 첨가) 1.5L 와 NH₄NO₃를 413mg / l로 조절한 MS 액체배지 (BA 1mg/l, IAA 0.1mg/l 첨가) 1.5L에 현삼 줄기조직 (0.8-1cm)을 각각 300개체씩 접종하여 배양 후 4주부터 7일 간격으로 시료를 채취하여 발생된 신초의 수와 생체중을 조사하였다.

4. 발근·순화 배지의 종류

MS 기본배지의 NH₄NO₃의 농도를 1/4로 줄이고, IBA 0.05mg/l를 첨가한 후 배지의 농도를 각각 1X, 1/2X, 1/4X, 1/10X로 처리한 액체배지와, 식물생장조절제가 첨가되지 않은 배지의 농도를 각각 1X, 1/2X, 1/4X로 처리한 MS 고체배지 (0.8% agar)에, 생물반응기에서 4주와 6주간 배양한 후 수확한 신초를 각각 치상하여 4주간 생육시킨 다음

뿌리의 생육 및 신초의 생육을 관찰하였다.

5. 순화 배지의 성분 및 농도

MS 기본배지 (X)와 NH₄NO₃를 413mg/l로 조절한 MS 배지 (x) 그리고 이 두가지 배지의 농도를 각각 1/2로 조절한 배지 (1/2X, 1/2x)의 아가 농도를 다르게 조합처리 (0.8, 1.2, 1.6%)하여 신초의 생육을 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 발근·순화 배지의 종류

생물반응기에서 4주간 배양 후 액체상태의 발근 배지로 옮겨진 경우 (Table 1) 1X MS의 농도에서 신초수는 12.7개, 발생된 뿌리는 2.3개, 뿌리의 길이는 1.1cm로 기타 농도에 비해 생육이 우수하였다. 6주간 배양 후 발근 배지로 옮겨준 경우에서는 1/10X 배지 농도에서 신초 수는 11.8개로 1X 농도의 12.7개에 비해 다소 적었으나, 뿌리의 수는 3.6개, 뿌리 길이는 3.5cm 로 1X의 2.7개, 2.4cm에 비해 높았다. 6주 후 이식한 경우 생체중은 1X의 2.9g에 비해 1.4g으로 낮았는데, 이는 카네이션이나 오이의 경우 배지의 농도를 낮춤으로서 유리화를 줄일 수 있다는 연구결과와 일치한다 (Ziv, 1986). 뿌리의 생육은 6주 후 발근 배지로 옮겨진 때가 좋았는데, 이는 4주 후 발근 배지로 옮겨진 경우 신초의 생장이 완전하지 못하여 신초 생장에 필요한 양분이 많이 소요되는 반면, 6주 후 발근 배지로 옮겨진 경우에는 신초의 생육은 다소 길어지나 뿌리의 생육이 활성화된데 기인한 것으로 생각된다. 따라서 6주 배양 신초의 뿌리 생육에는 낮은 농도의 배지가 효과적인 것으로 판단되었다 (Table 1).

고체배지에서 신초의 발근과 생육은 표 2와 같다. 생물반응기에서 4주간 배양한 신초의 경우 잎이 완전히 전개된 신초의 수는 4.2개인데 비해 6주간 배양한 신초에서는 8.9개로 많아 효과적이었다. 배양기간에 관계없이 잎이 완전히 전개된 신초의 수와 신초당 잎의 수는 1X의 농도가 가장 좋았으나

Table 1. Effect of concentration of MS liquid medium on shoot formation and rooting of *S. buergeriana*

MS media strength	No. of shoot			No. of root			Root length(cm)			F.W (g)		
	A	B	Mean (F-test*)	A	B	Mean (F-Test NS)	A	B	Mean (F-Test NS)	A	B	Mean (F-Test**)
1 X	12.7	12.4	12.54 ^{ab}	2.3	2.7	2.54	1.10	2.36	1.78	1.26	2.95	2.17 ^a
1/2 X	13.0	12.7	12.82 ^a	1.0	2.7	1.91	0.66	2.84	1.85	1.38	2.36	1.92 ^b
1/4 X	10.8	11.9	11.53 ^b	0.2	3.3	2.08	0.24	3.14	2.03	0.74	1.82	1.43 ^c
1/10 X	10.8	11.8	11.43 ^b	0	3.6	2.23	0	3.46	2.02	0.65	1.43	1.11 ^d
Mean (F-Test)	11.86 (NS)	12.13 (NS)		1.95 ^b (**)	3.10 ^a (**)		0.53 ^b (**)	2.96 ^a (**)		1.02 ^b (**)	2.11 ^a (**)	

Shoots were transferred to rooting media after bioreactor culture for 4 weeks(A) and 6 weeks(B) Within columns, means followed by the same letter are not significantly different at p=0.05.

유리화가 나타났으며, 1/4X 농도인 경우에는 잎이 전개된 신초수와 신초당 잎의 수도 적었다. 뿌리의 발생과 생장에는 4주간 배양 후 발근 배지로 옮겼을 경우 1X의 농도에서 양호한 것으로 나타났으나 (7.8개) 6주간 배양 후 발근 배지로 이식한 경우에는 1/4X의 농도에서는 9.8개로 가장 좋았다. 이는

액체배지에서와 같은 경향이였다. 1/2X 농도의 발근 배지에서, 신초의 수 (11.8개)와 잎이 전개된 신초의 수 (8.3개), 뿌리의 생육 및 잎이 전개된 신초의 길이 (2.2cm), 잎의 수 (5.6개)는 1X 농도의 배지와 차이가 없었으며 생체중 (1.6g)은 낮았다. 1X 농도 배지에 비해 1/2 농도의 배지에서 유리화

Table 2. Effect of concentration of solid MS medium on shoot growth and rooting of *S. buergeriana*

MS media strength	No. of shoot			No. of root			Root length(cm)		
	A	B	Mean (F-Test *)	A	B	Mean (F-Test NS)	A	B	Mean (F-Test NS)
1 X	12.7	11.4	12.50 ^a	7.8	4.5	6.17	2.70	2.35	2.50
1/2 X	11.7	11.8	11.74 ^{ab}	5.1	7.0	6.06	2.29	2.46	2.36
1/4 X	10.6	11.4	11.05 ^b	4.0	9.8	6.16	2.31	2.98	2.64
Mean (F-Test)	11.79 (NS)	11.57 (NS)		5.43 ^b (**)	7.32 ^a (**)		2.40 (NS)	2.60 (NS)	

MS media strength	No. of C.R.P ¹⁾			Shoot length of C.R.P (cm)			No. of leaf per C.R.P			F.W. (g)		
	A	B	Mean (F-Test**)	A	B	Mean (F-Test**)	A	B	Mean (F-Test**)	A	B	Mean (F-Test**)
1 X	4.2	8.9	6.53 ^a	2.67	2.11	2.32 ^a	4.2	5.1	4.73 ^a	1.83	2.31	2.12 ^a
1/2 X	2.6	8.3	5.48 ^b	1.86	2.22	2.05 ^a	2.6	5.6	4.17 ^a	1.16	1.60	1.39 ^b
1/4 X	0.9	7.9	4.37 ^c	0.78	1.94	1.36 ^b	1.1	4.2	2.63 ^b	0.97	1.66	1.32 ^b
Mean (F-Test)	2.41 ^b (**)	8.04 ^a (**)		1.69 (NS)	2.10 (NS)		2.50 ^b (**)	4.96 ^a (**)		1.27 ^b (**)	1.86 ^a (**)	

Shoots were transferred to rooting media after bioreactor culture for 4 weeks(A) and 6 weeks(B)

1) C.R.P : Completely regenerated plant.

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

발생 묘는 상대적으로 적게 발생하였다. 따라서 생물반응기에서 생육 후 발근과 순화 고체배지로의 이식에는 1/2X 농도의 배지가 유리한 것으로 판단되었다 (Table 2).

발근배지로 옮겨준 이후 잎이 전개된 신초는 고체배지에서만 나타나고 액체배지에서는 잎이 전개되지 않거나 유리화가 심한 상태로 전개되었다. 따라서 생물반응기 내에서 발근을 유도하기 위해 과

밀한 상태로 6주 이상 배양하여 해를 입는 것보다는, 배양 6주 후 신초를 고체배지로 옮겨 정상적인 신초 발생이 이루어지도록 하는 것이 유리하다고 판단되었다.

2. 순화 배지의 성분 및 농도

배지의 화학적 조성과 물리적 성질이 신초 형성이나 유리화 발생에 큰 영향을 미치며, 배지의 농

Table 3. Effects of concentration of MS medium and agar at acclimating stage on shoot growth and rooting of *S. buergeriana*

agar conc. (%)		No. of shoot				No. of root			
MS media	0.8 ³⁾	1.2	1.6	Mean (F-Test NS)	0.8	1.2	1.6	Mean (F-Test **)	
1X ¹⁾	11.9	11.4	12.8	11.85	4.0	5.3	5.8	4.85 ^c	
1/2X	11.4	12.6	11.6	11.91	4.2	6.8	6.0	5.8 ^{ab}	
1x ²⁾	11.8	11.4	11.5	11.57	6.8	4.3	5.1	5.43 ^{bc}	
1/2x	11.6	13.1	12.0	12.23	5.6	7.9	6.3	6.52 ^a	
Mean (F-Test)	11.68 (NS)	12.13 (NS)	11.85 (NS)		5.3 ^b (*)	5.8 ^{ab} (*)	6.0 ^a (*)		

agar conc. (%)		Root length(cm)			No. of C.R.P ⁴⁾ per explant			
MS media	0.8 ³⁾	1.2	1.6	Mean (F-Test **)	0.8	1.2	1.6	Mean (F-Test **)
1X ¹⁾	1.03	1.78	2.25	1.57 ^d	5.5	5.5	6.5	5.85 ^a
1/2X	2.20	2.18	2.40	2.26 ^b	3.9	6.4	4.6	5.04 ^{ab}
1x ²⁾	2.40	1.53	1.83	1.93 ^c	4.4	4.1	4.8	4.43 ^b
1/2x	2.30	3.00	3.13	2.80 ^a	4.3	6.9	4.6	5.17 ^a
Mean (F-Test)	1.97 ^b (**)	2.11 ^b (**)	2.43 ^a (**)		4.52 ^b (**)	5.73 ^a (**)	4.96 ^{ab} (**)	

agar conc. (%)		Shoot length of C.R.P (cm)			No. of leaf per C.R.P			Fresh weight(g)				
MS media strength	0.8 ³⁾	1.2	1.6	Mean (F-Test **)	0.8	1.2	1.6	Mean (F-Test **)	0.8	1.2	1.6	Mean (F-Test **)
1X ¹⁾	3.01	2.91	4.05	3.18 ^a	5.0	4.8	6.8	5.25 ^a	3.12	2.52	2.48	2.75 ^a
1/2X	2.43	3.14	3.02	2.88 ^b	4.3	4.6	4.9	4.61 ^b	2.54	2.36	1.44	2.10 ^b
1x ²⁾	2.55	2.34	2.64	2.52 ^c	3.3	3.3	3.4	3.30 ^c	2.58	2.63	2.88	2.70 ^a
1/2x	3.03	3.16	3.15	3.11 ^{ab}	3.9	4.4	4.8	4.35 ^b	2.59	2.30	1.83	2.24 ^b
Mean (F-Test)	2.76 ^b (**)	2.90 ^{ab} (**)	3.10 ^a (**)		4.10 ^b (**)	4.30 ^{ab} (**)		4.68 ^a (**)	2.71 ^a (**)	2.45 ^b (**)	2.11 ^c (**)	

1) X : MS media, 2) x : 413mg/l NH₄NO₃ MS media,

3) Agar concentration(%), 4) C.R.P : Completely regenerated plant.

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

도가 배지의 수분 포텐셜에 미치는 영향도 매우 크다 (백 등, 1991. 그리고 본 연구에서는 현삼의 신초 중 잎이 전개되어 정상적인 식물체로 성장하는 개체는 고체배지에서만 관찰되었다. 따라서 현삼 신초의 발근과 잎이 전개되는 정상적 소식물체의 성장에 적합한 고체배지의 성분과 농도 및 적정 아가 농도를 구명하기 위하여 기본 MS 배지와 NH_4NO_3 의 농도를 413mg/l 로 조절한 배지에 아가의 농도를 달리 조합하여 처리한 결과는 표 3과 같다.

전체적으로 보아 지상부 생육은 기본 MS 배지에서, 지하부 생육은 NH_4NO_3 를 413mg/l 첨가한 배지의 농도를 1/2로 조절한 배지에서 양호하였다. 뿌리의 수와 길이, 잎 전개 신초의 수와 길이, 엽수, 생체중에서 배지성분과 아가 농도에 따른 유의성이 인정되었으나, 신초의 수에서는 유의성이 없었다. MS 기본 배지에 치상하였을 경우 배지 농도가 1X인 경우에는 아가 농도가 1.6%일 때, 1/2X인 경우에는 1.2%일 때 생육이 가장 좋았다. NH_4NO_3 를 413mg/l 로 조절한 배지일 때에는 아가의 농도가 1.2%일 때 가장 양호하였다. 배지의 농도가 높을수록 아가의 농도 역시 높은 것이 유리하였는데, 이 경우 높은 아가농도가 신초의 생육에는 크게 영향하지 않았다.

그러나 NH_4NO_3 를 413mg/l 로 조절한 배지에서 성장한 현삼 신초는 유리화가 많이 진전되어 상토 및 포장 이식시 적절치 못한 것으로 생각되었다. NH_4NO_3 를 1/4로 줄인 배지가 현삼 신초의 유도에는 유리하지만, 잎이 전개된 정상적인 식물체로의 성장에는 적합치 않은 것으로 판단되었다. 배지 농도가 1X인 MS 기본 배지에 1.6%의 아가 농도에서 생육한 현삼은 배지농도 1/2X, 아가농도 1.2%의 배지에서 생육한 현삼에 비해 도장하는 경향이 나타났다. 따라서 NH_4NO_3 를 413mg/l 로 조절한 배지 혹은 배지농도가 1X인 MS 기본 배지에 1.6% 아가 농도보다는, 1/2X MS기본배지에 1.2% 아가 농도에서 잎이 완전히 전개된 개체수가 많고, 신초의 길이나 엽수가 상대적으로 많으면서도 생체중이 크

지 않다는 것은 유리화 비율이 상대적으로 낮다는 것을 나타내고 있다고 생각된다.

요 약

본 실험의 목적은 생물반응기를 이용한 현삼 종묘의 기내증식과 기내순화에 관여하는 적정 배지조건을 검토하여 추후 종묘의 건전한 생육과 안정적 생산에 활용할 수 있는 기초자료를 얻고자 하였으며 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 생물반응기에서 4주간 배양한 신초의 발근과 생장은 1X MS 액체배지에서 양호하였으나 6주간 배양한 신초는 1/10 MS 배지에서 좋았다.
2. MS 고체배지에서의 잎 전개율은 생물반응기에서 6주간 배양한 신초가 4주간 배양한 신초보다 높았다.
3. 잎이 전개된 신초의 수와 신초당 잎의 수는 1X MS 고체배지에서 많았으나 유리화도 1/2X MS 고체배지에서보다 많이 발생하였다.
4. 전반적으로 보아 신초의 지상부 생육은 MS 기본배지에서 양호하였으나 지하부 생육은 암모니아태 질소를 1/4로 줄인 배지에서 좋았다.
5. 암모니아태 질소를 1/4로 줄이고 아가농도를 1.2%로 조정한 배지에서 신초의 생육이 좋았으나 유리화가 많이 발생하였다.
6. 신초의 생육과 순화는 1X MS 배지에 1.6% 아가농도가 좋았으나 1/2X MS에 1.2%의 아가를 첨가한 경우보다 유리화가 많이 나타났기 때문에 신초의 순화는 1/2 MS 기본배지에 아가농도를 1.2%로 한 배지가 가장 적합한 것으로 생각되었다.

LITERATURE CITED

- Chae, Y.A., S.A. Park and H.H. Kim. 1993. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf tissue in *Scrophulria buergeriana*. Kor. J. of Plant Tissue Culture 20 (3) : 125-128.
- Kintzios S. E. and Tarvira. 1997. Effect of genotype

- and light intensity on somatic embryogenesis and plant regeneration in melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Breeding* 116 : 359-362.
- Lim, W.S. and Y.A. Chae.** 2000. Effects of carbon and nitrogen sources on the shoot formation in bioreactor culture of *Scrophulria buergeriana*. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* 8(1) : 9-13.
- Murasige T. and F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15 : 473-497.
- Paek, K.Y., B.H. Han and S.L. Choi.** 1991. Physiological, biochemical and morphological characteristics of vitrified shoots regenerated in vitro. *Kor. J. Plant Tissue Culture* 18(3) : 151-162.
- Ziv M.** 1986. In vitro hardening and acclimatization of tissue culture plants. In : Withers L. A. and P. G. Anderson (eds), *Plant tissue culture and its agricultural applications*. Butterwo고, London. pp 187-196.
- 이용현, 이기명.** 1995. 기내생산의 자동화기술. 최신 생물공학, 식물편 1. pp207-220.