

# 포도 왜성대목 '5BB'의 생물반응기 배양에서 접종밀도가 식물체 성장, 기공 및 광합성 특성에 미치는 영향

최은정, 한은주, 백기엽\*  
충북대학교 첨단원예기술개발연구센터

## Plantlet growth, leaf stomata, and photosynthesis of grape rootstock '5BB' as affected by inoculum density in bioreactor cultures

Eun-Jung Choi, Eun-Joo Hahn, and Kee-Yoeup Paek\*

Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology, Chungbuk National University,  
Cheongju 361-763, Korea

**ABSTRACT** In bioreactor cultures of plants, inoculum density is an important factor affecting growth and proliferation of the plantlets. To maximize shoot growth and proliferation of grape rootstock '5BB' in bioreactors, inoculum density varied at 15, 30, 45 and 60 single nodes in a 3-liter scale balloon type bioreactor, respectively and cultured for 40 days. Results suggested that the growth and the photosynthesis of the plantlet were greatly affected by inoculum density in the bioreactor. The inoculum density of 45 nodes resulted in the greatest growth (910.4 mg/shoot FW, 764.4 mg/root FW) followed by 30 nodes. CO<sub>2</sub> assimilation rate, stomatal conductance, transpiration rate of the plantlet were also highest at the inoculum density of 45 nodes. Significant reduces in shoot and root growth (426.5 mg/shoot FW, 248.4 mg/root FW) were observed at the inoculum density of 60 nodes. When the inoculum density decreased by 15 nodes, plantlets were malformed due to hyperhydricity, resulting in the highest transpiration rate and the lowest CO<sub>2</sub> assimilation rate. The plantlets stressed by the inoculum density at 15 nodes and 60 nodes showed larger number and irregular shape of stomata compared to the plantlets inoculated with 45 nodes.

### 서 론

포도는 삽목, 접목과 취목 등에 의하여 영양번식 되는 과수로, 대부분의 영양번식 작물에서와 같이 virus 피해가 심각하여 하나 이상의 virus 병원체에 감염되어 있다. Virus 감염주는 수량과 품질이 저하되고 심한 경우는 품종의 특성이 소실되기 한다. 또한 이들 병원체는 모주로부터 후대로 전염될 가능성이 높기 때문에 이러한 문제를 해결하고 증식효

율을 높이기 위해 조직배양을 이용한 대량번식방법이 적용되고 있다 (Barlass and Skene 1978; Hartmann et al. 1997).

기존 조직배양의 단점을 보완하기위한 생물반응기 배양은 액체배지에서 세포, 기관 및 식물체를 키우고 생물반응기 내로 적정수준의 공기를 공급하는 방식이다. 따라서 배지 내 용존산소의 농도와 배양체의 양수분 흡수율을 증가시켜 배양체의 과수화를 방지하면서 생장을 크게 촉진시킬 수 있는 배양방법으로 각광받고 있다 (Paek et al. 2001; Preil 2005). 생물반응기 배양의 효율성을 높이기 위해서는 배지 공급방식, 공기공급량, 접종밀도, gas 등의 조건을 배양 대상에 따라 최적화하는 것이 중요하다.

\*Corresponding author Tel 043 266 3245 Fax 043 272 5369

E-mail: paekky@chungbuk.ac.kr

생물반응기배양 시 접종밀도는 배양체의 성장, 기관형성 및 2차 대사산물 생산 등에 영향을 미치는 중요한 요인으로, 초기 접종밀도에 따라 세포의 분열과 성장 속도가 달라지는데 (Sakurai et al. 1996; Wang et al. 1997), 이는 접종밀도가 배양체로의 산소와 양분 전달 및 가스 확산 등에 필요한 배지의 회전 (circulation) 정도에 영향을 미치기 때문이다 (Hu et al. 2001; Lee et al. 2006). 따라서 배양체의 biomass 축적을 최대화하기 위해서는 적절한 접종밀도를 구명하는 것이 중요하다. 기내 식물체의 경우에도 접종 밀도에 따라 배양 용기 내의 CO<sub>2</sub> 농도, 순 광합성속도 등이 달라져 묘의 성장, 증식 뿐 아니라 기외 순화에 크게 영향을 미친다 (Hahn et al. 2003).

원예식물의 생물반응기 배양은 기내 증식률을 높이고 건전한 식물체를 대량생산할 수 있는 새로운 배양방식으로 각광받고 있으나 초기 접종밀도와 식물체 성장, 증식 등에 대한 연구는 국화 (Hahn and Paek 2005), 알로카시아 (Jo 2005) 등 일부 식물만을 대상으로 이루어졌다. 포도의 경우에도, 생물반응기 내 배지공급 방식에 대한 결과 구명되었다 (Shim et al. 2004). 따라서 본 연구에서는 포도 대목으로 많이 이용되고 있는 왜성대목 '5BB'의 조직배양 묘를 생물반응기에서 대량생산하기 위해 초기 접종밀도가 묘의 성장과 광합성에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

포도 왜성대목인 '5BB' (Berlandieri Riparia 5BB Selection Kober) 1년생 휴면지를 옥천 포도 시험장에서 채취하여 약 30 cm 길이로 잘라 polyethylene film으로 포장하여 5°C에서 8주간 저온 처리하여 휴면을 타파시켰다. 약 10 cm 길이의 삽수를 배양토 (peatmoss:perlite=3:1)에 삽목 후 발생한 싹을 3 cm 길이로 잘라 중성세제로 세척한 다음 Tween 20 (2~3방울/300 mL)이 포함된 1.4%의 sodium hypochlorite 용액에서 15분간 살균하였다. Clean bench 내에서 멸균수로 완전히 세척한 후 성장점 부위를 채취하여 BA 1 mg·L<sup>-1</sup>, sucrose 30 g·L<sup>-1</sup>이 첨가된 MS배지 (Murashige and Skoog 1962)에 접종하여 다싹을 유도하였고, 이들을 sucrose 30 g·L<sup>-1</sup>이 첨가된 1/2MS배지에서 5주 간격으로 배양하여 실험재료로 사용하였다.

### 초기 접종밀도 실험

3 L 용적의 풍선형 생물반응기에 net를 설치한 후 sucrose 30 g·L<sup>-1</sup>이 첨가된 1/2MS배지를 1 L씩 넣고 생물반응기 당 15, 30, 45, 60 마디의 싹을 각각 접종한 다음, 25 ± 2°C, 50 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 16시간 광주기 조건에서 40일간 배양하였다. 공기공급량은 배양 초기에는 0.1 vvm으로 조절하였고 배양기간이 경과됨에 따라 0.3 vvm까지 서서히 증가시켰다. 초기 접종밀도에 따른 싹과 뿌리의 생체중, 건물중, 싹길이, 뿌리길이, 엽수, 엽면적을 측정하였고 잎의 기공, 삼투 포텐셜, 광합성 parameter, 최대 양자수율 (Fv/Fm)도 측정하였다.

### 공초점레이저주사현미경 (confocal laser scanning microscopy)을 이용한 기공관찰

잎의 기공관찰은 위에서 두 번째로 전개된 잎의 오른쪽 상위 부분을 3 mm × 3 mm의 크기로 절단한 후에 FAA (formaldehyde:glacial acetic acid:ethylalcohol (50%)=5:5:90) 용액으로 24시간 동안 고정하였다. 고정된 잎 절편을 증류수로 30분간 세척한 다음 0.02% acridine orange로 5분간 염색하였다. 염색 후 잎 절편을 증류수로 10분 세척한 후 excitation 488/10 nm과 emission 522/32 nm 형광모드로 Nikon Diaport 300과 Kr/Ar laser가 복합된 inverted 공초점레이저주사현미경 (MRC 1024ES, Bio-Rad, Hercules, California, USA)을 이용하여 관찰하였다. 렌즈는 dry objective lens 20 × (0.6-1.0 variable NA)였으며, Scanning은 Kalman filter를 이용하여 slow scan speed로 하였다.

### 광합성 parameter 측정

식물체의 광합성 측정은 휴대용 광합성 측정기 (Li-6400, Li-COR, Lincoln, Nebraska, USA)를 이용하여 식물체의 상위로부터 2번째 잎을 측정하였다. 측정 시 CO<sub>2</sub>는 400 mol·mol<sup>-1</sup>농도, 500 mol·s<sup>-1</sup>유속으로 일정하게 공급하였고, IRGA (infra red gas analyzer) leaf chamber의 온도는 25°C, PPF는 30 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>로 설정하였으며 비교적 균일하게 자란 5개체를 임의로 선택하여 측정하였다.

### 최대 양자수율 (Fv/Fm)의 측정

최대 양자수율 (Fv/Fm)의 측정은 휴대용 엽록소 형광측정

기 PAM chlorophyll fluorometer (PAM-2000, Heinz Walz, Effeltrich, Germany)에 leaf-clip holder (2030-B, Walz)와 데이터 수집프로그램 DA-2000 (Walz)을 연결하여 측정하였다. 명기 시작 5시간 후에 잎을 30분간 암적응시킨 후 PS II 반응센터가 열린 상태의 최소형광 (minimal fluorescence,  $F_0$ )은 낮은 PPF ( $250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )의 펄스광을 조사하였으며, 이어 PS II 반응센터가 닫힌 상태의 최대형광 (maximal fluorescence,  $F_m$ )은 암상태에서 3  $\mu\text{sec}$ 동안  $2400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 white 광으로 포화펄스 (saturated pulse)를 주어 측정하였다. PS II 반응센터의 최대 양자수율  $F_v/F_m$  (maximal PS II photochemical efficiency)은  $F_v = F_m - F_0$ 이므로  $(F_m - F_0)/F_m$ 의 식으로 산출하였다 (Van Kooten and Snel 1990).

#### 잎의 삼투포텐셜 측정

잎의 삼투포텐셜은 수분포텐셜 측정기 (WP4 PotentiaMeter, Decagon, Pullman, Washington, USA)를 이용하여 측정하였

는데,  $25^\circ\text{C}$  실온에서 30분간 calibration한 후 각 처리의 생육이 균일한 5개체를 선발하여 식물체 상위 제 2엽 중앙에서 채취한 생체 0.5 g을 액체질소로 동결하여 마쇄한 후 sample chamber에 넣고 밀봉하여 측정하였다 (Ball and Oosterhuis, 2004).

#### 결과 및 고찰

신초의 지상부와 지하부 성장 모두 생물반응기당 45 마디를 접종한 처리구에서 가장 높았고 (910.4 mg/shoot FW, 764.4 mg/root FW), 30 마디의 접종밀도에서도 비교적 양호하였다. 접종밀도를 15마디로 낮추었을 경우, 신초의 과수화로 지상부의 생체중, 건물중은 가장 높았으나 신초의 생장이 정상적으로 이루어지지 않았고 접종밀도를 60 마디로 높였을 때도 지상부와 지하부 성장 모두 45 마디 접종구에 비해 2배 이상 감소되었다 (Table 1)(Fig.1).

식물세포나 기관배양의 경우, 초기 접종 밀도가 지나치게 낮으면 배양체의 세포분열까지 걸리는 시간이 길어져 증식

Table 1 Growth characteristic of grape rootstock '5BB' as affected by inoculum density in bioreactors after 40 days of culture.

Inoculum density (nodes)	Fresh weight (mg/plantlet)		Dry weight (mg/plantlet)		Shoot length (cm)	Root length (cm)	No. leaves	Leaf area ( $\text{cm}^2$ )
	Shoot	Root	Shoot	Root				
15	1074.3 a <sup>2</sup>	372.6 b	202.6 a	60.2 ab	5.9 c	10.0 b	5.0 ab	1.8 b
30	569.8 b	419.7 b	80.4 b	55.7 ab	10.4 ab	15.7 ab	6.0 a	5.6 a
45	910.4 a	769.4 a	135.2 b	99.9 a	11.6 a	25.3 a	6.0 a	4.1 ab
60	426.5 b	248.4 b	63.9 b	36.4 b	7.9 bc	9.5 b	4.3 b	1.5 b

<sup>2</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test ( $P \leq 0.05$ ).

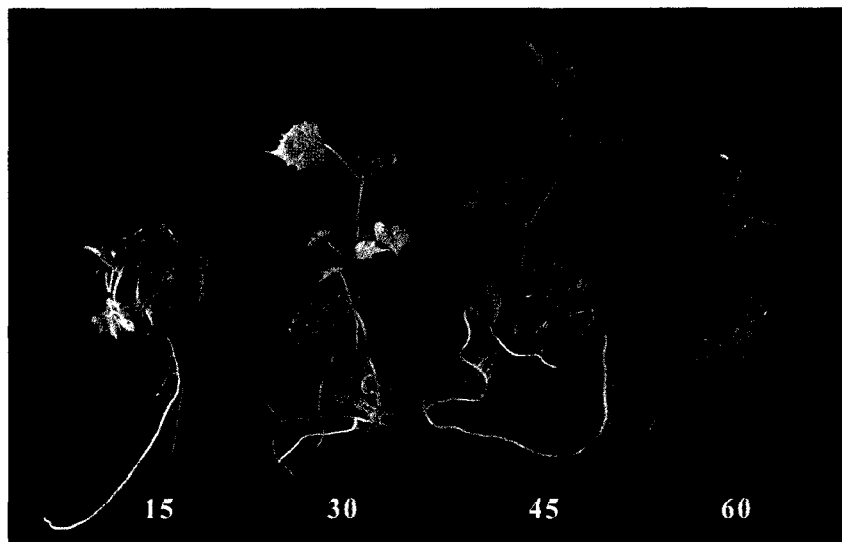
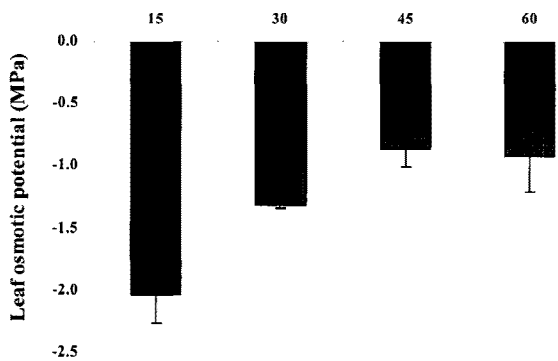


Figure 1. Growth of grape rootstock '5BB' as affected by inoculum density in bioreactors after 40 days of culture.

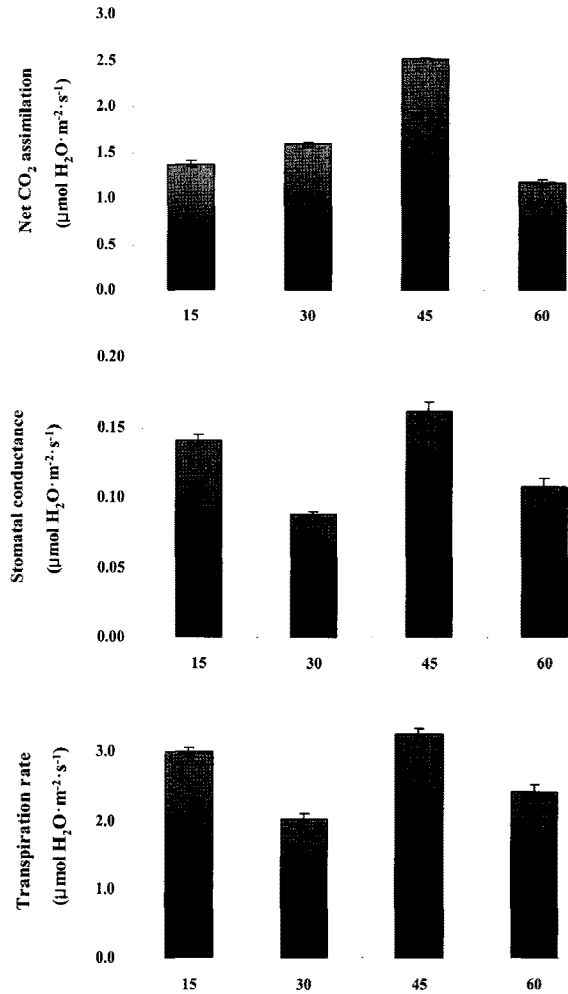
률이 낮고 비정상적인 개체로 발달하게 된다. 반대로 지나치게 높은 접종 밀도에서는 배양체의 성장속도가 너무 빨라져 노화도 촉진되어 증식률이 크게 억제된다 (Akalezi et al. 1999; Hu et al. 2001). 포도 신초의 경우, 접종 마디수가 배양 용적에 비해 낮은 경우에는 마디로부터 새로운 신초의 증식이 이루어지기 전까지 배양체가 배지에 잠겨 있는 시간이 길어져 과수화를 초래하게 되고, 이에 따라 양분의 흡수가 정상적으로 이루어지지 못했던 것으로 생각된다. 접종밀도에 따른 삼투포텐셜 측정에서도 15마디 접종구에서 현저히 낮게 나타나 수분 스트레스에 의한 성장 저해를 뒷받침 하였다 (Fig. 2). 한편, 배양 용적에 비해 접종 밀도가 높았던 처리구에서는 신초의 초기생장 기간 동안 생물반응기 내 산소 농도가 낮아지고 에틸렌 가스의 농도가 높아져 배양 후반부로 갈수록 엽수와 엽면적이 감소하고 뿌리의 발달도 억제된 것으로 보인다. 국화묘의 생물반응기 배양의 경우에서도 접종밀도가 가장 낮았던 처리구에서 묘의 과수화가 관찰되었고 접종밀도가 높았던 경우, 묘의 최종 생장률이 크게 낮아져 (Kim 2001) 포도 묘에서와 같은 결과를 보고하였다. 앞으로 배양체의 초기 접종 밀도와 생물반응기 내 산소, 이산화탄소, 에틸렌가스 농도 변화와의 관계를 구명하기 위한 실험을 진행할 예정이다.

신초의 CO<sub>2</sub> 동화량, 기공전도도, 증산률 모두 45마디 처리구에서 가장 높았다. 15마디 처리구의 신초의 경우, 증산률은 높았던 반면, CO<sub>2</sub> 동화량이 크게 낮아 과수화에 의한 비정상적인 생장임을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). Photosystem II의 최대 양자수율 (Fv/Fm)의 측정치도 15마디 처리구에서 0.6으로 가장 낮아 신초 생장이 억제됨을 알 수 있었으나 나머지 처리구의 Fv/Fm 수치는 0.8 수준에서 큰 차이를 보이지 않았다 (Fig. 4).

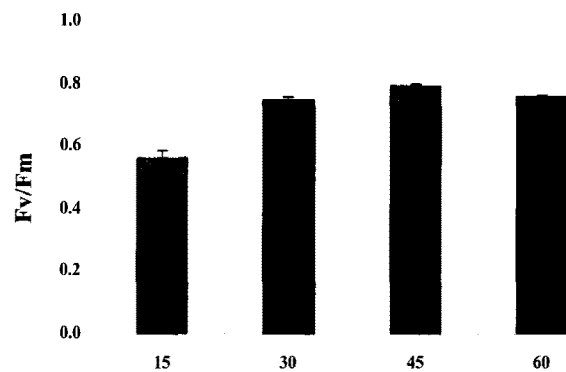


**Figure 2.** Leaf osmotic potential in grape rootstock '5BB' as affected by inoculum density in bioreactors after 40 days of culture. Vertical bars represent standard errors of 3 replicates.

식물조직배양에서 배양체의 접종량은 절편체의 성장, 기공형성 및 이차대사산물의 생산에 영향을 주는 중요한 요인



**Figure 3.** Net CO<sub>2</sub> assimilation rate, stomatal conductance and transpiration rate of grape rootstock '5BB' as affected by inoculum density in bioreactors after 40 days of culture. Vertical bars represent standard errors of 3 replicates.

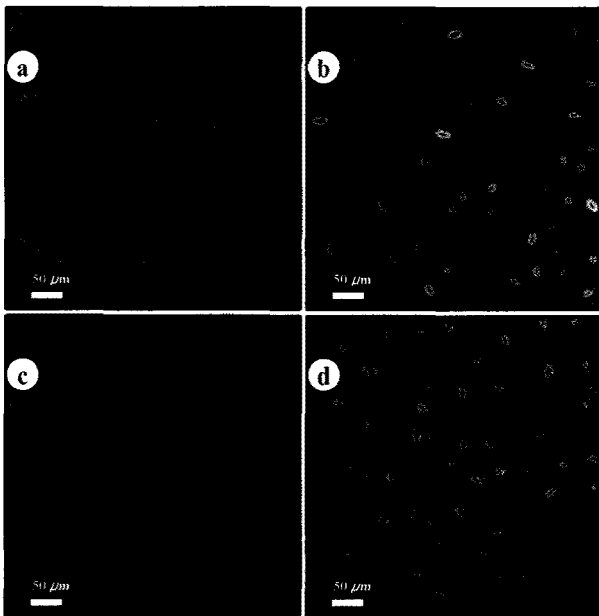


**Figure 4.** Maximum photochemical efficiency of PS II (Fv/Fm) in leaves of grape rootstock '5BB' as affected by inoculum density in bioreactors after 40 days of culture. Vertical bars represent standard errors of 3 replicates.

**Table 2** Effect of inoculum density on the number and the size of leaf stomata in grape rootstock '5BB' after 40 days of bioreactor culture.

Inoculum density	No. stomata (mm <sup>2</sup> )	Size of stomata (μm)		
		Length	Width	Length/Width
15	409.32 a <sup>2</sup>	24.74 c	18.86 a	1.31 c
30	368.00 a	27.40 ab	15.71 a	1.74 a
45	294.68 b	26.14 bc	16.56 a	1.58 b
60	230.68 c	28.08 a	18.24 a	1.54 b

<sup>2</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test ( $P \leq 0.05$ )



**Figure 5.** Confocal laser scanning micrographs of stomata in leaves of grape rootstock '5BB' as affected by inoculum density in bioreactors after 40 days of culture (a: 15 nodes, b: 30 nodes, c: 45 nodes, d: 60 nodes) ( $\times 200$ ).

이다 (McClell and Smith 1990; Pierik and Steegmans 1972). 식물체의 경우, 접종밀도가 너무 높아지면 배양 용기 내 산소가 고갈되면서 CO<sub>2</sub> 농도가 지나치게 높아져 광합성속도가 감소하고 (Kozai 1989), 반대로 너무 낮은 접종밀도에서는 최저 임계밀도 (critical density)를 충족시키지 못해 배양체가 침수되거나 세포분열이 정상적으로 이루어지지 않아 최종 수확량이 적어질 뿐 아니라 비정상적인 형태적 발달 등을 초래할 수 있다 (Hahn and Paek 2005; Lee and Shuler 2000). 따라서 배양체의 증식과 최종수확량을 최대화하기 위해서는 접종밀도의 최적화가 중요함을 알 수 있었다.

각 처리별로 기공의 밀도는 접종밀도가 감소할수록 증가하였는데 15마디 처리구에서 45마디 처리구에 비해 70% 이상 증가하였다. 기공 크기는 접종밀도가 가장 낮았던 15마

디 처리구에서 가장 작았는데, 특히 다른 처리구에 비해 타원형에서 많이 벗어난 형태의 기공들이 섞여있었다 (Table 2) (Fig. 5). 스트레스에 노출된 식물체의 경우, 정상식물체에 비해 작고 균일하지 못한 형태의 기공의 수가 증가하는 것으로 보고되고 있다 (Drew et al. 1992; Weyars and Lawson 1997). 생물반응기 배양된 포도 신초의 경우, 액체배지에 침지되어있는 기간이 상대적으로 길었던 15마디 처리구에서 배양체의 과수화로 기공의 형성과 구조가 완전하지 못했고 수분 스트레스로 인한 산소결핍으로 기공밀도도 크게 높아진 것으로 생각되었다.

## 사 사

이 논문은 2007학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비지원에 의하여 연구되었음.

## 인용문헌

- Akalezi CO, Liu S, Lig QS, Yu JT, Zhong JJ (1999) Combined effects of initial sucrose concentration and inoculum size on cell growth and ginseng saponin producton by suspension culture of *Panax ginseng*. Proc Biochem 34: 639-642
- Barlass M, Skene KGM (1978) In vitro propagation of grape (*Vitis vinifera*) from fragmented shoot apiece. Vitis 117: 335-340
- Drew AP, Kavanagh KL, Maynar CA (1992) Acclimatizing micro propagated black cherry by comparison with half-sib seedlings. Plant Physiol 86: 459-464
- Hahn EJ., Kim EK, Paek KY (2003) Proliferation of multiple shoots and microbulbs of garlic (*Allium sativum*L.) through bioreactor system. In: Seppo Sorvari (ed.) Proceedings of the 1st International Congress on Bioreactor Technology in Cell, Tissue Culture and Biomedical Applications. pp.

167-174

- Hahn EJ, Paek KY (2005) Multiplication of Chrysanthemum shoots in bioreactors as affected by culture method and inoculation density of single node stems. *Plant Cell Tiss Org Cult* 81: 301-306
- Hartmann HT, Kester DE, Davies FT Jr, Geneve RL (1997) *Plant propagation: Principles and practices*. 6th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. p. 657-659
- Hu WW, Yao H and Zhong JJ (2001) Improvement of *Panax notoginseng* cell culture for production of ginseng saponin and polysaccharide by high density cultivation in pneumatically agitated bioreactors. *Biotechnol. Prog.* 17: 838-846
- Jo EA (2005) Factors affecting multiplication and growth of *Alocasia amazonica* in solid and liquid culture. MS Thesis, Chungbuk National University, Cheongju, Korea
- Kim, SJ (2001) Effects of environmental conditions on growth and quality of *Chrysanthemum* plantlets in bioreactor culture. MS Thesis, Chungbuk National University, Cheongju, Korea
- Kozai T (1991) Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: Debergh PC, Zimmerman RM (eds.). *Micropropagation technology and Application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL. pp. 447-469
- Lee EJ, Mobin M, Hahn EJ, Paek KY (2006) Effects of sucrose, inoculum density, auxins and aeration volume on cell growth of *Gymnema sylvestre*. *J Plant Biol* 49: 427-431
- Lee CWT, Shuler ML (2000) The effect of inoculum density and conditioned medium on the production of ajmalicine and catharanthine from immobilized *Catharanthus roseus* cells. *Biotechnol Bioengr* 67: 61-71
- McClelland MT and Smith MAL (1990) Vessel type, closure and explant orientation influence in vitro performance of five woody species. *Hort. Sci.* 25: 797-800
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with *tabacco* tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497
- Paek KY, Hahn EJ, Son SH (2001) Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. *In Vitro Cell Dev Biol* 37: 284-292
- Preil W (2005) General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for in vitro culture. In: Hvoslef-Eide AK, Preil W (eds.). *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. Springer, The Netherlands. pp. 1-18
- Sakurai M, Mori T, Seki M, Furusaki S (1996) Changes of anthocyanin composition by conditioned medium and cell inoculum size using *strawberry* suspension culture. *Biotechnol Lett* 18: 1149-1154
- Shim SK, Hahn EJ, Paek KY (2004) Production of grapevine rootstock '5BB' plants as influenced by bioreactor culture method, and pH and EC of nutrient solution. *J Kor Soc Hort Sci* 45: 49-53
- Van Kooten O, Snel JFH (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosyn Res* 25: 147-150
- Wang HQ, Zhong JJ, Yu JT (1997) Enhanced production of taxol in suspension cultures of *Taxus chinensis* by controlling inoculum size. *Biotechnol Lett* 19: 353-355
- Weyers JDB, Lawson T (1997) Heterogeneity in stomatal characteristics. *Adv Bot Res* 26: 317-352

(접수일자 2008년 4월 25일, 수리일자 2008년 6월 13일)