

## 액체배지를 이용한 조직배양 감자줄기의 대량증식

김재훈<sup>1\*</sup> · 최은경<sup>1</sup> · 김정국<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(주)마이크로프랜즈 중앙연구소, <sup>2</sup>고려대학교 생명과학대학

### Mass production of potato shoots by liquid culture

Jae Whune Kim<sup>1</sup> · Eun Gyung Choi<sup>1</sup> · Jeong-Kook Kim<sup>2</sup>

<sup>1</sup>#501, SBC Factory B/D Pallbokdong, 3ga, Jeonju, Jeonbuk 51-203, Korea

<sup>2</sup>School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

**ABSTRACT** A study was conducted to investigate *in vitro* micropropagation of four potato cultivars of Daese, Jasim, Chubaek and Haryeng in MS medium and PM medium (a medium containing half concentration of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  and  $\text{KNO}_3$ , two fold concentration of  $\text{CaCl}_2$ , as compared to MS medium). During 1~2 weeks of culture, Daese and Jasim showed better shoot elongation on the solid MS medium than Chubaek and Haryeng whereas Chubaek and Haryeng did better shoot elongation on the solid PM medium. But no difference was observed after 4 weeks of culture. As compared to shoot elongation on the solid medium, it was delayed at early stage of culture in the liquid medium without shaking. Shoot formation ratio of potato (above 4 cm of shoot length) began to increase significantly after 1 week of culture and kept on increasing until 4 weeks. The four cultivars showed the different patterns of shoot growth in bioreactor. The PM medium with a quarter salt strength was effective for the regeneration of axillary buds as well as shoot elongation of Jasim and Chubaek. Daese showed vigorous regeneration of axillary buds in the PM medium with a half salt strength. On the other hand, Haryeng showed slower growth than the other three cultivars.

### 서 론

감자는 세계 4대 식량자원 중의 하나로 전 세계 대부분의 지역에서 재배 가능하고, 단위면적당 수확량이 많은 작물로 식량이 부족한 나라에서 우선적으로 재배를 고려하며 10억 기아인구 문제를 해결할 수 있는 작물로 알려져 있다. 감자는 바이러스 피해가 가장 큰 문제점으로 무바이러스 식물은 조직배양에 의해 생산되며 1960년대 조직배양한 감자줄기로부터 종서를 생산하는 방법이 개발된 이후 많은 나라에서 무바이러스 감자 생산을 위해 많은 연구개발비를 투입하고 있다. 무바이러스 씨감자는 한천으로 경화시킨 고체배지가 들어있는 페트리디쉬 배양용기 (직경 10 cm, 두께 3 cm 내외, 배지 10 mL 내외)에서 감자 줄기를 배양한 후, 동일한 크기의 배양용기에서 배양조건만 바꿔 감자종서 (무균 인공 씨감자)를 만든다 (Jeon et al. 1992; Kim et al. 1992; Choi et al. 1998). 배양용기가 작은 고체배지에서 감자줄기를 배양하여 종서를 생산하므로

조직배양 종서의 크기가 작고 단가가 매우 비싼 단점이 있고, 이들을 하우스나 밭에서 재배하는데도 여러 가지 문제점이 있다 (Kim and Joung 1994; Park et al. 1996).

씨감자 생산과정을 살펴보면 조직배양 감자종서를 하우스에서 상토 또는 수경 재배에 의해 소형의 씨감자 (기본종)를 만들어 이들을 하우스에서 3회 정도 망실재배하고 고랭지에서 2회 정도 노지 재배한 후 농가에 공급한다. 이와 같은 체계는 조직배양 한 감자종서로부터 농가에 공급하는 보급용 씨감자를 생산하는데 5~7년 정도 걸려 병충해의 감염 기회가 많게 되어 품질관리에 어려움이 있다. 씨감자 생산에 이와 같이 오랜 기간이 필요한 이유는 최초 조직배양 감자종서를 생산하는데 많은 시간과 경비가 소요될 뿐 만 아니라 아직까지도 대량으로 감자종서를 배양하는 시스템이 정립되어있지 않아 여러 번의 증식과정이 필요하기 때문이다 (농촌진흥청 홈페이지 [www.rda.go.kr](http://www.rda.go.kr) 의 고령지연구소 자료 참조).

조직배양 감자종서는 감자줄기를 어떻게 배양했느냐에 따라 크기, 품질, 개수 등에 많은 차이가 있다. 즉 감자줄기와 잎이 크고 굵으면 이들로부터 크고 튼실한 많은 수의 종서를 얻을 수 있다 (Hwang and Lee 2008). 그러나 지금까지 고체배지를 사용한 배양

\*Corresponding author Tel 063-211-6005 Fax 063-211-6012

E-mail: kimsabsil@hanmail.net

방법으로는 만족할 만한 결과를 얻지 못하고 있는 실정이다.

크고 튼실한 줄기나 잎을 가진 감자줄기를 얻는 데는 고체배지보다 액체배지가 훨씬 유리하고 배양 경비를 대폭 줄일 수 있다 (Akita et al. 1994). 고체배지에서는 감자줄기를 절단하여 식물조직 배양에 많이 사용되는 MS 배지에 줄기를 올려놓으면 줄기는 잘 자라 이들을 배양하여 증식시키는데 별문제가 없다. 그러나 액체배지의 경우에는 고체배지와 같은 배지조건으로 배양하면 전혀 생장이 이루어지지 않는다. 따라서 절단된 감자줄기의 생장에 해가 없는 적정 농도의 액체배지를 제조해야만 액체배지에서 감자줄기의 배양이 가능하다. 즉 액체배지에서 감자줄기를 배양할 경우 감자줄기의 절단된 부분에 상해를 주지 않고 감자줄기가 잘 성장할 수 있는 적정 배지농도를 구명하는 것이 필요하다. 따라서 본 실험은 감자 주요 품종의 줄기 대량생산에 적절한 액체배지의 종류와 농도를 조사하고 이를 이용하여 bioreactor 기내 대량생산을 체계화하기 위하여 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 고체배지에서 감자줄기 배양

본 실험에는 대서, 자심, 추백, 하령 4종의 감자 품종을 사용하였다. 경정배양을 통해 얻어진 감자줄기를 0.4% gelrite가 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지 (고체배지)에서 4주 간격으로 절간 계대배양을 통해 유지 및 증식시켜 실험재료로 이용하였다.

고체배지에서 감자줄기의 생장은 MS 배지에서 큰 문제없이 잘 성장하였지만 액체배양을 위한 감자전용 배지인 PM (potato medium)배지 (MS배지에서  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 와  $\text{KNO}_3$ 의 양은 1/2,  $\text{CaCl}_2$ 는 2배 첨가하고 나머지는 동일)를 만들었다. 감자 품종별로 줄기의 생장을 비교하기 위해 MS배지를 기본 (1배)으로 하여 모든 성분을 1/2배, 1/4배로 줄인 배지와 PM 기본배지 (1배)와 모든 성분을 1/2배, 1/4배로 줄인 배지를 사용하였다. 3% sucrose와 0.4% gelrite를 첨가하고 pH 5.7로 조정하여 살균한 후, 배양용기 (100 × 40 mm)에 45 mL씩 분주하였다. 치상체의 길이는 마디 2개를 포함하여 3 cm 정도 정단부위로 균일하게 접종하였으며 배양용기 당 10개씩 10반복 하였다. 배양조건은 일장 18시간, 배양온도  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 3,000 Lux 형광 빛으로 하였다

### 액체배지에서 감자줄기생장

예비실험에서 MS 액체배지로 감자줄기를 배양하였을 때 고체배지보다 생장이 훨씬 저조하여 액체배지의 실험은 감자전용 PM 배지만 실시하였다. PM기본배지 (1배), 1/2배, 1/4배 액체배지를 배양용기에 15 mL씩 분주하여 사용하였다. 감자의 어린 줄기를 3 cm 정도로 용기 당 15개씩 5반복으로 균일하게 접종하였으며 현탁배

양 하지 않고 정지된 상태로 일장 18시간, 배양온도  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 3,000 lux 형광 빛에서 배양하였다. 또한 고체배지에서와 달리 액체배지에서는 sucrose의 농도를 0.5, 1.5, 3% 달리하여 줄기 정단부위를 3 cm 정도 잘라 균일하게 치상하였으며 줄기의 생육정도를 4주 동안 조사하였다.

### 바이오리액터 배양에 의한 감자줄기 대량생산

바이오리액터 배양기에 넣어 배양하는 감자줄기는 소형 배양용기에서 정지액체배양하고 있는 것으로 감자줄기를 무균적으로 바이오리액터에 옮겨 설당이 3%로 함유된 PM기본배지 (1배)와 1/2배, 1/4배 PM액체배지 조건에서 바이오리액터 안으로 공기의 주입은 컴퓨터서 혹은 수족관용 에어펌프를 사용하여 용기 밑에서 계속해서 뿜어지도록 장치하고 무균 공기의 주입을 위해 공기가 구멍크기 0.2  $\mu\text{m}$  필터 (Midisart 2000, Sartorius사, 독일)를 통과하도록 하였다. 감자줄기의 배양은 바이오리액터의 배양용기 크기가 5~10리터의 것을 사용하였고, 각 품종별로 10~15개의 배양기에서 배양하여 10 cm 이상 자란 줄기의 평균치를 조사하였다. 바이오리액터 배양환경은  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 온도와 직사광선이 드는 남쪽으로 창이 있는 밝은 장소 또는 형광 빛으로 3,000 Lux 이상으로 하였다.

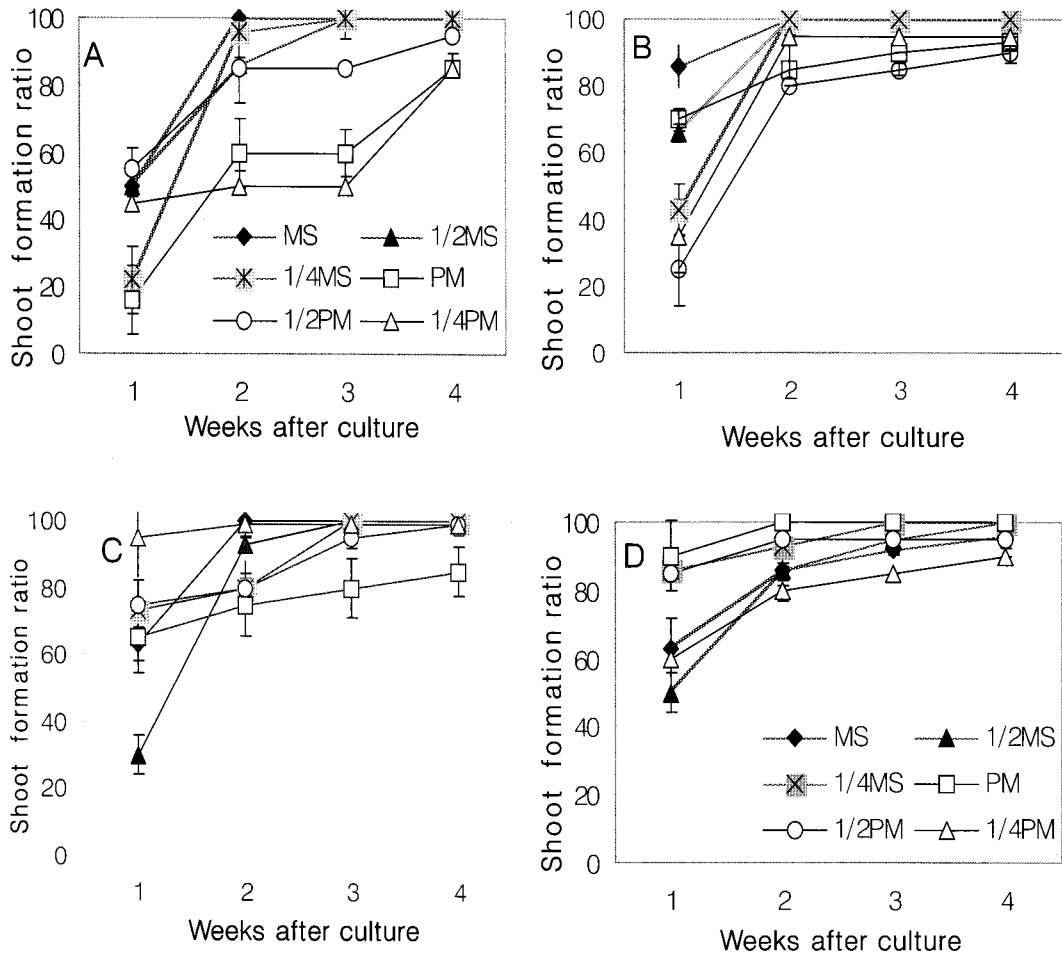
## 결과 및 고찰

### 고체배지에서 감자줄기 생장

대서, 자심, 추백, 하령 4종의 감자줄기 정단부위를 치상체로 사용함으로써 고체배지에 접종 후 바로 생육하기 시작하여 배양 1주 후부터 1 cm 이상 자란 4 cm 이상 되는 줄기의 수가 높은 비율을 차지하였다. 고체배지가 들어 있는 배양용기에서는 배양초기에 대서와 자심은 MS배지, 하령과 추백은 PM배지가 좋아 두 배지의 차이가 있었지만 배양후기에는 두 배지에서 모든 감자줄기의 생장이 양호하였다.

대부분의 품종이 배양 1~2주 사이에 줄기가 급격히 성장하여 3주째는 더 이상의 줄기 생장이 이루어지지 않고 안정적이었다. 대서는 MS배지가 PM배지보다 일찍 성장하는 경향을 보이면서 4주 후에도 생장이 우수하였지만 추백은 PM배지에서 생장이 좋았다 (Figure 1). 이와 같은 감자줄기의 빠른 생장은 정단부위를 잘라 접종하였기 때문에 가능하였으며 고체배지는 초기 배지에 대한 스트레스가 국소적으로 작용해 접종 즉시 생육이 진행되었다. 정단부위가 아닌 절간조직을 치상하였을 때는 액아로부터 줄기가 성장하기 시작함으로 2주일 정도 생육이 늦어지는 경향이였으며 배양 4주 후까지 줄기가 서서히 성장하였다 (자료 미제시). MS배지와 PM배지를 비교한 결과, 대체적으로 하령과 추백은 감자 전용배지인 PM배지가, 대서와 자심은 MS배지가 생장에 양호하였다.

기존의 감자 소피경 형성을 통한 감자의 대량증식 시 고체배지



**Figure 1.** Influences of various basal medium containing 0.4% gelrite on shoot growth of four different potato cultivars A: Daese B: Jasim, C: Chubaek D:Haryeng The data represent the mean±SE of 10 replicates measured after 4 weeks of culture

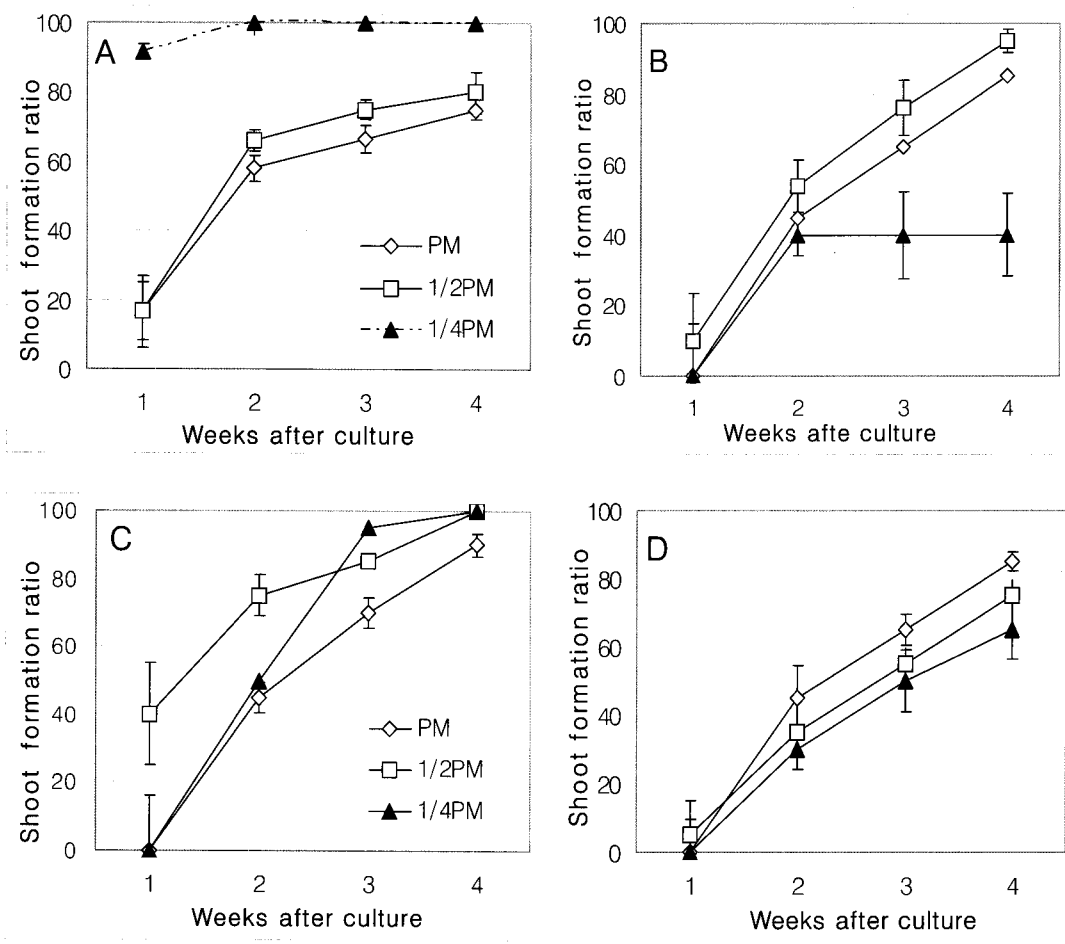
를 이용하는 것은 일반적인 배양방법이었다 (Gregory 1956, Hussy and Stacey 1984, Joung 1989). 그러나 고가의 gelrite 사용과 접종에 소요되는 시간, 배양 후 배지처리 문제 등 경제성을 고려하고, bioreactor에 배양 시 고체배지에서 생산된 모는 오염 확인에 어려움이 있으며 유식물체 뿌리 사이에 남아있는 gelrite로 인한 오염과 취급에 번거로움을 해결하기 위하여 한천과 같은 고형제를 첨가하지 않은 액체배지에서 감자줄기를 배양하는 것이 효과적이다.

**액체배지에서 줄기생육**

감자줄기 증식 후 감자종서를 만들기 위해 CaCl<sub>2</sub>가 MS배지보다 많이 첨가된 PM 액체배지를 이용하여 줄기의 생장을 조사하였다. 액체배지에서는 고체배지와 달리 배양초기에는 생장이 늦었는데, 이는 줄기 전체가 배지에 잠겨있는 상태로 배양 7일까지는 배지 내 다량 또는 소량의 무기물 (macro, micro-element)의 영향을 받고, 새 배지에 적응기간이 필요하기 때문이라고 생각한다. 액체배지에서

는 배양 1주후부터 감자줄기가 급격히 생육하기 시작하여 4주까지 줄기의 생장을 지속하였다 (Figure 2). 그러나 대서품종만 1/4 PM 액체배지에서 배양초기부터 급격한 생장을 보였다. 이는 대서품종의 줄기가 다른 품종에 비해 굵고 커서 액체배지에 적응을 빠리한 것으로 생각된다.

감자줄기는 뿌리의 생육이 진행되면서 지상부의 생육이 빨라졌으며 치상체의 크기와 부위 (정단부위 또는 그 외의 마디 절편)도 액체배지에서는 줄기의 생장에 영향을 미치는 것으로 관찰되었다. 고체배지와 같이 3 cm 크기의 정단부위를 잘라 배양하였는데 정치된 액체배지에 잠겨있는 상태로 치상체의 크기를 길게 하는 것이 작은 것보다 빨리 기립하였고 품종에 따라 정단부위는 배지의 농도가 높은 경우 부풀어 팽대해 줄기 생장이 지연되는 경우도 관찰되었다 (Figure 2). 액체배지에서 정단부위 이외 마디절편은 조직이 팽대되는 것 없이 마디에 있는 모든 액아에서 동시에 줄기 생장이 이루어졌다. 따라서 마디절편은 생장이 정단부위보다 2~3일 정도 지연되었으나, 배양 4주 후 획득할 수 있는 줄기의 양이 더 많아



**Figure 2.** Influences of MS basal medium on shoot growth (4 cm) of four different potato cultivars A: Daese B: Jasim, C: Chuback D: Haryeng. The data represent the mean±SE of 5 replicates measured after 4 weeks of culture

줄기를 증식 시키는 데 효율적이었다.

액체배지에 첨가하는 sucrose의 농도를 달리한 결과, 0.5% sucrose에서는 치상체가 더 빨리 기립하였고 팽대해진 조직도 관찰되지 않았다. 하지만 배양기간이 길어질수록 줄기가 가늘어지고 잎이 황화 되어 말라가는 현상이 나타났다 (자료 미제시). 배양초기 3%의 sucrose는 삼투압제로 작용하여 생육을 지연시켰으나 배양 후기인 3~4주 후에는 3% sucrose는 감자의 생육에 꼭 필요한 영양원으로 줄기의 생육을 더 오랜 기간 지속시켰다. 고체배지에서의 sucrose 농도는 감자중서 형성에 많은 영향을 미치므로 감자줄기의 생육에 영향이 없으면 고농도로 사용하는 것이 좋은 것으로 알려져 있다 (Kim et al. 1992). 액체배지에도 sucrose 농도는 고체배지와 비슷하게 첨가해도 감자줄기 성장에 큰 영향이 없는 것으로 생각된다.

액체배지는 고체배지에 비해 줄기생장에 있어서 배지간의 차이가 크게 나타났다. 하령은 PM배지, 자심과 추백은 1/2 PM배지, 대서는 1/4 PM배지에서 줄기 생장이 양호하였다 (Figure 2). Akita와 Takayama (1994)가 감자의 줄기생장이나 중서 형성이 액체배지에

서 잘 형성되지 않는 것으로 보고한 바와 같이 본 실험에서도 감자 줄기는 고체배지와 달리 액체배지에서 배양하면 잘 성장하지 못했다. 이는 액체배지에서 줄기 전체가 배지에 잠기게 되므로 배지 내 무기물 성분이 감자줄기에 직접적인 영향을 주게 되어 배지의 농도와 감자줄기의 상태 및 접촉량에 따른 밀도 등도 액체배지 배양시 고려해야 할 중요한 요인으로 생각된다.

#### 바이오리액터 배양에 의한 감자줄기 대량생산

소형 배양용기에서 정지 액체배양 한 감자줄기를 무균적으로 바이오리액터에 옮겨 액체배지에서 배양하였다. 바이오리액터에서 생장은 품종에 따라 약간의 차이를 보이지만 대체로 약한 농도의 배지에서 잘 성장하였다 (Table 1). 특히 추백과 자심은 저농도 배지인 1/4 PM 배지에서 잘 자랐고, 대서는 약간 농도가 높은 1/2 PM배지, 하령은 다른 품종에 비해 생장이 조금 늦는 경향이었다 (Table 1). 이러한 결과는 정지 액체배양한 것과 약간의 차이점을 보인다. 즉 대서의 경우 감자줄기가 바이오리액터에서 배지농도가

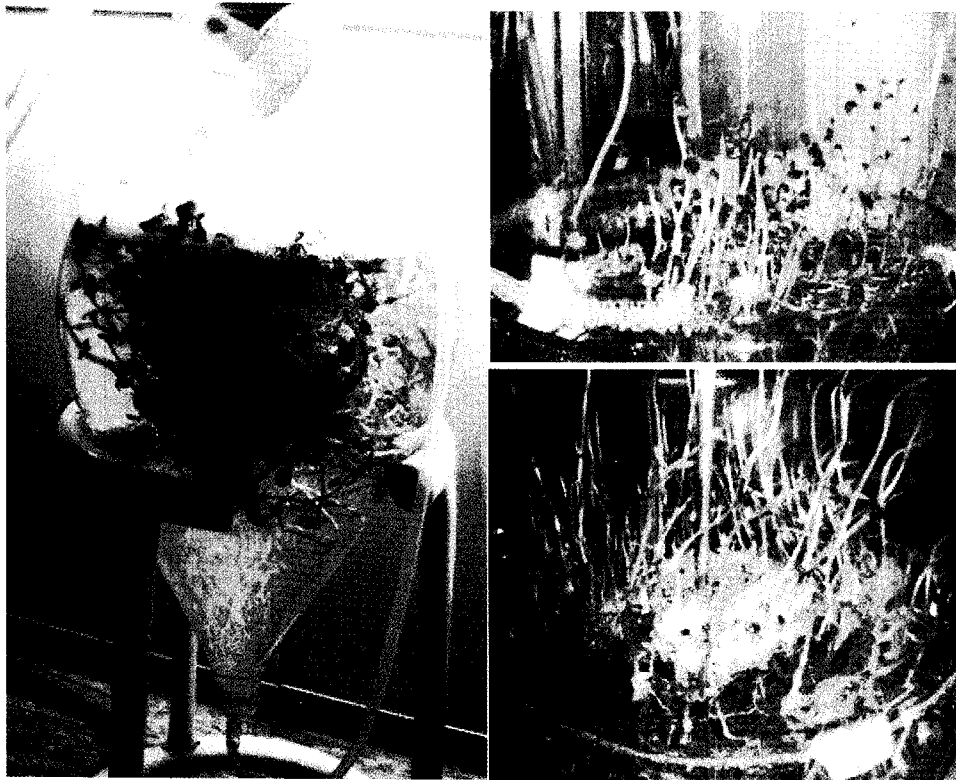


Figure 3. Growth of potato shoots by bioreactor culture containing liquid medium

Table 1 Shoot formation rate (%) of PM medium on shoot growth (above 10 cm) of four different potato cultivars

Potato cultivars	Medium	PM	1/2PM	1/4PM
Daese		23	81	62
Jasim		21	26	86
Chubaek		27	49	79
Haryeng		18	52	47

다른 품종에 비해 높은 농도에서 잘 자라는 것은 다른 감자줄기에 비해 굵고, 크기가 커서 액체배지 성분의 스트레스에 잘 대응할 수 있기 때문이다. 바이오리액터내의 액체배지에 잠겨 배양되는 감자줄기의 스트레스를 완화하기 위해 반복적으로 배지를 빼주고 넣어 주는 반연속 배양법 (semi-continuous culture)을 사용하였을 때 줄기배양에 효과가 있었다 (Akita and Takayama 1994). 그러나 본 실험에서는 액체배지에서 연속배양 하여도 별 문제가 없었는데 이는 액체배지의 농도를 낮게 하여 액체배지 스트레스를 최소화하였기 때문으로 생각된다.

감자줄기는 잎 사이의 마디마다 액아가 있어 이 부분을 절단해서 바이오리액터에서 배양하면 각각의 액아에서 하나의 줄기가 나와 성장하게 된다. 따라서 충분히 자란 줄기에는 5개 이상의 마디를 가지고 있으므로 이들을 절단하여 새 배지에서 배양하면 5배 이상의 줄기를 생산할 수 있다 (Figure 3).

식물체를 액체배지가 들어있는 바이오리액터에서 배양할 때 고체배지와 같은 조건으로 배양하면 배양체의 생장이 고체배지와 같이 잘 이루어지지 않는다. 감자줄기 배양의 경우에 그 원인을 검토한 결과 고체배지에서는 줄기의 절단된 부분으로 배지성분이 들어가 가지 않아 무기질 농도가 높은 MS배지를 사용해도 감자줄기는 잘 성장하지만, 액체배지의 경우 높은 농도의 배지성분이 줄기절편을 통해 내부로 들어가므로 세포들이 상해를 입히게 되어 배양하기가 힘들어진다는 사실을 알아냈다. 따라서 액체배지는 줄기생장에 해가 없는 적정 농도의 액체배지를 제조해야만 배양이 가능한데 이는 배지농도를 낮추어주는 것이 가장 효율적이다.

감자줄기와 잎이 크게 자랄수록 이들로부터 종서를 만들 때 종서는 크고 개수도 많이 생성되므로 되도록 감자줄기를 크게 키우는 것이 바람직하다 (Park et al. 1992; Kim et al. 1992; Hwang and Lee 2008). Vasil IK (1991)의 연구와 같이 바이오리액터를 이용한

감자의 대량생산은 필수적이며 바이오리액터에서 배양한 감자줄기는 고체배지에서 키운 줄기와 잎보다 훨씬 크고 튼실하여 종서를 대량생산하기에 적합한 배양법으로 생각된다. 바이오리액터에서 성장한 감자줄기를 절단하여 동일한 배양조건의 바이오리액터에 나눠서 배양하면 3주마다 5배 정도의 감자줄기를 증식시킬 수 있으며 이들을 수확하여 감자종서를 만드는데 사용할 수 있다.

## 적 요

MS배지와 PM (Potato medium)배지 (MS배지에서  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  와  $\text{KNO}_3$ 의 양은 1/2,  $\text{CaCl}_2$ 는 2배 첨가하고 나머지는 동일)에서 대서, 자심, 추백, 하령 4 품종 감자줄기의 기내 대량증식을 위해 실험하였다. 고체배지에서 배양초기 (1~2주)에 대서와 자심은 MS배지에서 줄기의 신장이 가장 우수하였고, 하령과 추백은 PM배지가 효과적이었지만 배양후기인 4주 째에는 두 배지 사이에 차이가 없었다. 액체 정치배양한 배지에서는 고체배지와 달리 배양초기에는 생장이 늦었고 배양 1주 후부터 감자 (4 cm 이상) 줄기 발생률이 급격히 증가하기 시작하였고, 4주까지 꾸준히 성장을 지속하였다. 바이오리액터에서 줄기의 생장은 품종에 따라 차이를 보였다. 특히 추백과 자심은 액아 발생뿐만 아니라 줄기신장이 1/4 PM배지가 우수하였고, 대서는 1/2 PM배지에서 액아발생이 왕성하였다. 한편, 하령은 다른 품종에 비해 생장이 늦었다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 (과제번호: 2008 0401034013) 연구지원비로 수행되었습니다.

## 인용문헌

Akita M, Takayama S (1994) Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium

- surface level control. *Plant Cell Rep* 13:184-187
- Choi KH, Yang DC, Jeon JH, Kim HS, Joung YH, Joung H (1998) A comparison of microtuberization efficiency between normal and adenosine deaminase transgenic potato plantlets cultured in vitro. *Korean J Plant Res* 11:252-256
- Gregory LE (1956) Some factors for tuberization in the potato plant. *Amer J Bot* 43:281-288
- Hussy G, Stacey NJ (1984) Factors affecting the formation of in vitro tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ann bot* 53: 565-578
- Hwang HY, Lee YB (2008) Influences by position of node and existence of leaf on microtuberization in node culture of potato. *J Plant Biotechnol* 35:63-68
- Jeon JH, Joung H, Park SW, Kim HS, Byun SM (1992) Regulation of in vitro tuberization potato (*Solanum tuberosum* L.) by plant growth regulators. *Kor J Plant Tiss Cult* 19: 67-73
- Joung H (1989) Mass production of potato microtuber by tissue culture technique and its application. '89 Agricultural biotechnology symposium pp 100-124
- Kim HS, Jeon JH, Park SW, Joung H (1992) Effects of alternating temperature on microtuberization of potato. *J Kor Soc Hort Sci* 33:432-437
- Kim HY, Joung H (1994) Influence of the physiological age of microtubers on field growth and tuber yield in potatoes. *J Kor Soc Hort Sci* 35:330-336
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-49
- Park SW, Jeon JH, Kim HS, Joung H (1996) Differences in storability and sprouting of potato microtubers. *J Kor Soc Hort Sci* 37:228-231
- Park SW, Jeon JH, Kim HS, Joung H (1992) Effects of paclobutrazol levels on shoot growth and microtuberization in tissue cultures of potato. *Kor J plant Tiss Cult* 19:311-315
- Vasil IK (1991) Cell culture and somatic cell genetics of plants, vol 8, Scale -up and automation in plant propagation, Academic press, San Diago

(접수일자 2008년 11월 14일, 수리일자 2009년 1월 10일)