Kor. J. Hort. Sci. Technol. 30(4):432-436, 2012 DOI http://dx.doi.org/10.7235/hort.2012.12053

사계성 딸기 '고하' 조직배양묘의 대량증식 시 생물반응기 내 공기주입량에 따른 생육 특성

김혜진[1†] · 이종남[1†*] · 김기덕[1] · 임주성[1] · 임학태[2] · 용영록[3]

[1]국립식량과학원 고령지농업연구센터, [2]강원대학교 생명건강공학전공, [3]강릉원주대학교 식물생명과학과

Growth Characteristics of in Vitro Mass Propagated Plantlets of Ever-bearing Strawberry 'Goha' according to Aeration Rate in Bioreactor

Hye Jin Kim[1†], Jong Nam Lee[1†*], Ki Deog Kim[1], Ju Sung Im[1], Hak Tae Lim[2], and Young Rok Yeoung[3]

[1]Highland Agriculture Research Center, National Institute of Crop Science, Pyeongchang 232-955, Korea
[2]Department of Bio-Health Technology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
[3]Department of Plant Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 210-702, Korea

Abstract. This study was conducted to determine the optimal aeration rate for mass propagation of ever-bearing strawberry by bioreactor culture. The aeration rate was treated in four levels: 0.1 vvm (air volume/medium volume/min), 0.2 vvm, 0.3 vvm, and 0.4 vvm. In 0.2 vvm conditions, shoot length was the longest at 9.03 cm in bioreactor culture, leave numbers were 40.4 ea and fresh weight was 6,106 mg. Plant growth rate at 0.2 vvm condition was faster than other treatments. In the aeration condition, 0.2 vvm was most effective to increase aerial part growth and to decrease medium consumption. As the culture periods increased, the fresh weight also increased rapidly. After six weeks of cultivation, shoots were emerged with 10.4 ea per plantlet, resulting in developing a complete plant. As a result, the bioreactor culture system for mass propagation of strawberry is required to continuously supply the air by 0.2 vvm speed and cultivate at least for six weeks.

***Additional key words*:** *Fragaria* × *ananassa*, fresh weight, medium consumption, shoot

서 언

딸기(*Fragaria* × *annassa* Duch.)는 영양번식작물 중 하나로 무병묘(virus-free)를 생산하기 위해 조직배양기술을 이용해왔다. 대부분의 조직배양은 식물생장조절제를 사용하여 다량의 조직배양묘를 생산하는 방법(Bhatt and Dhar, 2000; Kirschbaum et al., 2004; Passey et al., 2003)이 이용되어 왔으나, 최근 Lee et al.(2010a)는 식물생장조절제를 첨가하지 않고 다량의 무병묘를 생산할 수 있는 생물반응기 기술과의 접목을 시도하여 가능성을 제시하였다. 또한 무호르몬 배지를 이용한 무병묘 대량증식이 가능한 생물반응기 배양 배지 조건을 확립하였다(Kim et al., 2011).

생물반응기 배양 방식은 Raft, Ebb & Flow, Immersion 등이 있으며(Etienne et al., 1997), 그 중 Immersion 방식은 바나나(Teission and Alvard, 1995), 고무나무(Teisson et al., 1996), 커피나무(Etienne et al., 1997), 차나무(Akula et al., 2000), 파인애플(Lorenzo et al., 1998), 사탕수수(Escalona et al., 1999) 등의 대량 증식에 이용되었다. 또한 Immersion 방식은 회전식 생물반응기 내에서 감자 소괴경을 생산(Yu et al., 2000)하는 등 많은 발전을 거듭하였다. 그러나 액체 배지를 이용하는 생물반응기 배양의 경우 가장 큰 문제점은 기내 식물체의 형태적 기형인 과수화 현상이다. 과수화 현상은 액체 배지 내의 식물체가 항산화 효소 활성에 관여하는 활성 산소종의 농도가 증가하여 산화적 스트레스에 노출

***Corresponding author:** melondad@korea.kr

†These authors are contributed equally to this work.

※ Received 14 March 2012; Revised 20 April 2012; Accepted 11 May 2012. 본 논문은 농촌진흥청 국립식량과학원 고령지농업연구센터의 '여름재배용 육성품종의 기본묘, 원원묘 생산 및 보급' 연구과제비용으로 수행된 결과의 일부이며, 이에 감사를 드립니다.

되기 때문에 유발되는 현상이며, 이러한 변화는 식물체의 구조와 생리뿐만 아니라, 생존에도 영향을 미친다(Ziv, 2005). 이러한 단점을 극복하기 위하여 공기주입형 생물반응기가 개발되어 많은 식물 종의 대량증식에 이용되어 왔으며(Akita, 2000; Akita and Takayama, 1994a, 1994b; Takayama, 2002; Takayama and Akita, 1994, 1998; Takayama et al., 1986), 여러 가지 식물 종에서 과수화 현상을 완전히 없애지는 못하지만, 감소시키는 것으로 확인되었다(Ziv, 2005).

생물반응기 배양 시 배지 속 산소 용해도는 매우 낮은데 비해 식물체가 산소를 빠르게 소모하므로 배지에 공기를 지속적으로 공급해야 하며, 공기를 주입하면 배지가 순환하면서 산소, 이산화탄소, 에틸렌 등이 공급되기 때문에(Doran, 1993; Scragg, 1992) 식물생장과 밀접한 관계가 있다. 또한 생물반응기 배양 시 공기를 주입하면 배지 내의 식물체가 지속적으로 움직여 정단 우세현상이 타파되어 액아가 출현하기 때문에(Takayama and Akita, 2008) 생물반응기를 이용한 식물체 대량증식 시 적정량의 공기를 주입하는 것은 매우 중요하다.

따라서 본 연구는 딸기 조직배양묘의 생물반응기 배양 시 공기주입량에 따른 기내 유식물체의 생육특성을 비교하며, 적정 공기주입량의 조건을 구명하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

본 실험은 사계성 딸기 '고하' 품종을 사용하였다. 고설식 수경재배법으로 재배된 모주로부터 발생한 runner tip을 10cm 길이로 절단하여 흐르는 수돗물로 1시간 동안 수세하였다. 수세한 runner tip은 2% sodium hypochlorite solution(v/v)에 tween 20을 1-2방울 첨가한 용액에 10분간 침지한 후, 멸균수로 3회 이상 클린벤치 내에서 수세하였다. 살균 처리된runner tip으로부터 생장점을 0.2-0.3mm 크기로 적출(광학 현미경: EMZ-8TR, MEIJI TECHNO, Japan)하여 MS 기본배지(MS salt + 30g·L^{-1} sucrose + 8g·L^{-1} agar)에서 4주간 배양한 후, Lee et al.(2010b)의 방법에 따라 계대배양 배지(1/2MS salt + 10g·L^{-1} sucrose + 8g·L^{-1} agar)에서 유지하며 실험에 사용하였다.

생물반응기 배양 시 식물재료는 본엽이 6-10매 확보된 기내 유식물체의 어린잎 1매를 남기고 잎과 뿌리를 모두 제거하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 생물반응기는 'Immersion' 방식으로, 2L 용량의 생물반응기를 사용하였고, 각 처리당 15주씩 치상하여 3반복 실험하였다.

딸기 조직배양묘의 생물반응기 배양 시 공기는 0.1vvm (air volume/medium volume/min), 0.2vvm, 0.3vvm 및 0.4vvm으로 주입하여 6주간 배양한 후 생육특성을 비료하고 적정 공기주입량을 확인하였으며, 적정 공기주입에 따른 배양기간별 생육특성을 비교하기 위해 2주, 4주 및 6주 후에 조사하였다.

본 실험의 배지는 1/2 MS 무기염을 기본으로 하여 sucrose 30g·L^{-1}를 첨가하였으며, pH 5.6으로 조정(Kim et al., 2011)한 뒤 121℃, 1.5기압의 고압 멸균기에서 15분간 멸균한 후 사용하였다. 생물반응기 배양은 25 ± 1℃ 배양실에서 16/8(명/암)시간의 일장 하에서 배양하여 각 처리마다 가장 생육이 왕성하거나 생육이 저조한 개체를 제외한 10주를 추출하여 생육조사를 실시하였다.

결과 및 고찰

사계성 딸기 조직배양묘 대량증식을 위한 생물반응기 내 공기주입량에 따른 기내 유식물체의 생육 특성은 Table 1과 같다. 기내 유식물체의 초장은 공기주입량 0.1vvm 처리구가 4.82cm로 가장 짧았고, 0.2vvm 처리구가 9.03cm로 가장 길었으며, 0.2vvm 이상 처리구에서 점차 짧아지는 경향을 보였다. 공기주입량 0.2vvm 처리구의 엽수는 40.4개, 엽면적은 42.2cm^2로 다른 처리구에 비해 생육이 가장 왕성하였고, 0.1vvm 처리구의 엽수 21.1개, 엽면적 35.7cm^2로 생육이 가장 저조하였다. 관부직경과 뿌리수는 공기주입량에 관계없

Table 1. Growth characteristics of in vitro plants according to aeration rate in bioreactor of ever-bearing strawberry 'Goha' (after 6 weeks culture).

Aeration rate (vvm[z])	Shoot length (cm)	Crown diameter (mm)	No. of leaves (ea)	Leaf area (cm^2)	No. of roots (ea)	Root length (cm)	Fresh weight (mg)	Dry weight (mg)	D/F rate (%)	No. of shoots (ea)
0.1	4.82 by	2.52 a	21.1 c	35.7 b	31.1 a	6.25 a	4,989 b	548.8 c	10.9	7.2 a
0.2	9.03 a	2.52 a	40.4 a	42.2 a	39.2 a	6.31 a	6,106 a	793.8 a	12.9	7.5 a
0.3	7.30 ab	2.66 a	32.9 b	36.7 b	35.6 a	4.10 b	5,135 b	610.1 b	11.8	7.1 a
0.4	6.42 ab	3.00 a	31.7 b	38.0 b	34.3 a	1.66 c	5,620 b	624.7 b	11.1	7.3 a

[z]vvm: air volume/medium volume/min.
[y]Mean separation within columns by Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$).

이 비슷하였으나, 뿌리길이는 공기주입량이 증가할수록 짧아지는 경향을 나타냈다. 신초수는 약 7개로 처리간 차이를 보이지 않았으나, 생체중과 건물중은 0.2vvm 처리구에서 6,106mg 및 793.8mg으로 가장 무거웠으며, D/F율도 12.9%로 가장 높게 나타났다.

생물반응기 내 공기주입량에 따라 지상부의 생체량 차이가 나타났으며, 공기주입량이 0.1vvm일 경우 생체량이 가장 적었으며, 0.2vvm 이상에서 생체량이 증가하는 것을 볼 수 있다. 공기주입량 0.2vvm 이상에서 지상부 생체량이 약간 감소하였으나, 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 순화 후 조직배양묘의 생존에 직접적인 영향을 미치는 뿌리의 경우, 뿌리수는 처리간의 차이를 보이지 않았으나 뿌리길이는 공기주입량이 증가할수록 현저히 짧아지는 경향을 보였다.

모든 처리구의 식물체 생장이 이뤄진 것은 생물반응기 내에 공기를 지속적으로 공급해 줌으로써 식물의 생장과 유지에 반드시 필요한 물질인 산소(Garcia-Ochoa and Gomez, 2008)가 공급되고, 또한 배양 용기 내 공기가 순환되어 생장에 필요한 이산화탄소, 에틸렌 등이 공급(Doran, 1993; Scragg, 1992)되었기 때문인 것으로 생각된다.

그러나 0.2vvm 처리까지는 전체적인 생체량이 증가하다가, 그 이상에서는 생체량이 점점 감소되는 결과를 보였는데, 이것은 미생물 세포에 비해 식물 세포의 대사율이 약 2배 가량 낮아 산소요구량이 적고(Cazzulino et al., 1991), 공기주입량이 많아지면 CO_2와 같은 여러 가지 휘발성 물질이 빠르게 고갈되어(Hegarty et al., 1986) 생장이 제한된 것으로 판단된다.

공기주입량에 따라 기내 유식물체의 생육 차이뿐만 아니라 배지 소모량의 차이를 보였다(Table 2). 배양 2주째까지는 공기주입량에 관계없이 약 10mL로 비슷하게 소모되었으나 4주째부터 공기주입량에 따른 배지소모량이 차이를 보이기 시작하였다. 배양 4주째 0.1vvm 처리구는 90mL, 0.2vvm과 0.3vvm 처리구는 각 100mL, 그리고 0.4vvm 처리구는 130mL가 소모되었다. 배양 6주째 배지소모량 차이가 현저하게 나타났으며, 최종적으로 0.1vvm과 0.2vvm 처리구는 각 200mL 및 210mL가 소모되었으며, 0.3vvm과 0.4vvm 처리구는 340mL, 390mL가 소모되었다. 배지소모량은 공기주입량이 많아질수록 늘어났는데, 이것은 공기주입량이 많아질수록 공기배출량도 많아지면서 공기 배출 시 배지도 함께 기화되어 배출됨으로써 배지소모량이 늘어나는 것으로 생각된다. 그러므로 타 처리구에 비해 배지소모량이 적고, 기내 유식물체의 생육량이 많은 0.2vvm 처리구가 딸기 조직배양묘 대량증식을 위한 생물반응기 배양 시 적정 공기주입량으로 판단된다.

적정 공기주입량(0.2vvm)에 따른 배양기간 별 생육특성을 비교한 결과는 Table 3과 같다. 초장은 2주째 1.2cm에서 4주째 2.7cm, 6주째 4.9cm로 점진적으로 늘어났으며, 배양 2주째 엽수 4.4개 및 뿌리수 3.5개였으나 배양 6주째는 각각 101.3개 및 74.5개로 배양기간이 길어짐에 따라 많은 수의 잎과 뿌리가 발생했으며, 뿌리길이도 길어져 전체 생체중이 2주째 443mg에서 6주째 6,768mg으로 크게 늘어났다. 신초수는 배양 2주째 2.0개, 배양 4주째 9.5개 발생, 배양 6주째에는 10.4개 발생하였다. 또한 배양 2주째에는 유식물체 겨

Table 2. Comparison of medium consumption according to aeration rate in bioreactor of ever-bearing strawberry 'Goha'.

Aeration rate (vvm[z])	Medium consumption (mL)			
	2 weeks after	4 weeks after	6 weeks after	Total
0.1	10	90	100	200
0.2	10	100	100	210
0.3	10	100	230	340
0.4	10	130	250	390

[z]vvm: air volume/medium volume/min.

Table 3. Growth characteristics of in vitro plants according to culture period by 0.2 vvm air supply in bioreactor of ever-bearing strawberry 'Goha'.

Culture period (weeks)	Shoot length (cm)	No. of leaves (ea)	No. of roots (ea)	Root length (cm)	Fresh weight (mg)	No. of shoots (ea)
2	1.2 c[z]	4.4 c	3.5 c	0.5 c	443 c	2.0 c
4	2.7 b	64.6 b	48.7 b	5.2 b	3,101 b	9.5 a
6	4.9 a	101.3 a	74.5 a	8.5 a	6,768 a	10.4 a

[z]Mean separation within columns by Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$).

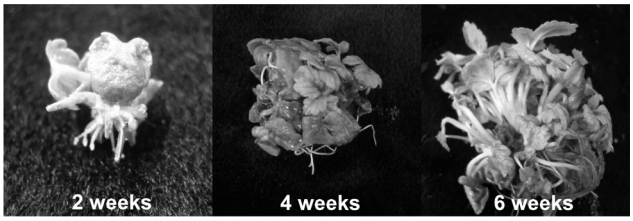

Fig. 1. Comparison of growth characteristics of in vitro plants according to culture period by 0.2 vvm air supply in bioreactor of ever-bearing strawberry 'Goha'.

드랑이에서 신초가 발생하기 시작하였고, 배양 4주째에는 발생된 신초가 신장하기 시작하여, 배양 6주째에는 발생된 신초가 하나의 덩어리로 뭉쳐있으나, 완전한 개체로 발달된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

본 실험에서 배양 2주째 딸기 유식물체에서 액아가 출현한 것은 생물반응기 내에 공기를 지속적으로 주입함으로서 유식물체가 계속 움직여 정단우세현상이 타파(Takayama and Akita, 2008)된 것으로 생각되며, 딸기 유식물체의 정단우세현상 타파를 위한 최저 배양 기간이 약 2주임을 확인할 수 있었다. 또한 배양 기간이 길어질수록 신초수가 증가하였고, 완전한 유식물체로 발달함으로써 초장, 엽수 및 근수가 증가하여, 생체중도 증가한 것으로 판단된다. 그러므로 딸기 조직배양묘의 생물반응기 배양 기간은 액아 출현 및 유식물체로의 발달이 완전히 이뤄지는 배양 6주가 적당한 것으로 판단된다. 그러나 배양 기간이 길어질수록 생체량 및 신초수가 증가하는 경향을 보이므로 생물반응기를 이용해 6주 이상 배양하여 생체량 및 신초 발생수를 비교해 볼 필요가 있을 것으로 생각된다.

딸기 조직배양 시 고체배양의 경우 신초수는 약 1.8개이며, 초장은 3.6cm인데 비해(Lee et al. 2010a), 생물반응기 배양 시 0.2vvm의 공기를 주입하면서 6주간 배양하였을 때 신초수는 약 7.5개, 초장은 9.03cm로 매우 큰 차이를 보여, 딸기 조직배양묘 증식 시 생물반응기를 이용하는 것이 바람직하며, 생물반응기 배양 시 0.2vvm의 공기를 주입하여 6주 이상 배양하는 것이 적당한 것으로 판단된다.

초 록

본 실험은 사계성 딸기의 무병묘 생산을 위한 생물반응기 배양 시 공기주입량에 따른 생육특성을 비교하고, 적정 공기주입량을 구명하기 위해 실시하였다. 생물반응기 내 공기주입량은 0.1vvm, 0.2vvm, 0.3vvm 및 0.4vvm 등 4 수준으로 처리하였다. 공기주입량 0.2vvm에서 초장이 9.03cm로 가장 길었으며, 엽수는 40.4개, 생체중은 6,106mg으로 타 처리구에 비해 생육이 왕성하였다. 생물반응기 배양기간이 길어짐에 따라 잎, 뿌리 등이 점진적으로 많이 발생하였으며, 유식물체의 생체중도 급격히 늘어났으며, 배양 6주째에는 신초수가 주당 10.4개 발생하였으며 완전한 하나의 독립된 식물체로 발달되었다. 그리고 생물반응기 내의 공기는 0.2vvm으로 지속적으로 공급해주며, 최소 6주간 배양해야 완전한 식물체로 성장하였다.

추가 주요어 : *Fragaria* × *ananassa*, 생체중, 배지 소모, 신초

인용문헌

Akita, M. 2000. Bioreactor culture of plant organs, p. 129-138. In: R.E. Spier, B. Griffiths, and A.H. Scragg (eds.). The encyclopaedia of cell technology. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Akita, M. and S. Takayama. 1994a. Induction and development of potato tubers in a jar fermentor. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 36: 177-182.

Akita, M. and S. Takayama. 1994b. Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semi-continuous liquid medium surface level control. Plant Cell Rep. 13:184-187.

Akula, A., D. Becker, and M. Bateson. 2000. High-yielding repetitive somatic embryogenesis and plant recovery in a selected tea clone, "TRI-2025", by temporary immersion. Plant Cell Rep. 19:1140-1145.

Bhatt, I.D. and U. Dhar. 2000. Micropropagation of Indian wild strawberry. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 60:83-88.

Cazzulino, D., H. Pederson, and C.K. Chin. 1991. Bioreactors and image analysis for scale-up and plant propagation, p. 147-177. In: I.K. Vasil (ed.). Cell culture and somatic cell genetics of plants. Academic Press, San Diego, CA.

Doran, P.M. 1993. Design of reactors for plant cells and organs, p. 116-169. In: A. Feichter (ed.). Bioprocess design control, Vol. 48. Springer-Verlag, Berlin.

Doran, P.M. 1995. Bioprocess engineering principles. Academic Press Ltd., New York.

Escalona, M., J.C. Lorenzo, B.L. Gonzales, M. Daquinta, C.G. Borroto, J.I. Gozales, and Y. Desjardin. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) micropropagation in temporary immersion system. Plant Cell Rep. 18:743-748.

Etienne, H., M. Lartaud, N. Michaux-Ferrière, M.P. Carron, M. Berthouly, and C. Teisson. 1997. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea Brasiliensis* (Müll. Arg.) using the temporary immersion technique. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 33:81-87.

Garcia-Ochoa, F. and E. Gomez. 2008. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. Biotechnol. Adv. p. 154-176.

Hegarty, P.K., N.J. Smart, H. Scragg, and M.W. Fowler. 1986. The aeration of *Catharanthus roseus* L.G. Don suspension cultures in airlift bioreactors: The inhibitory effect at high aeration rates on culture growth. J. Exp. Bot. 37:1911-1920.

Kim, H.J., J.N. Lee, K.D. Kim, J.S. Im, H.T. Lim, and Y.R. Yeoung. 2011. Suitable hormone-free medium for in vitro mass propagation via bioreactor culture of ever-bearing strawberry. J. Plant Biotechnol. 38:221-227.

Kirschbaum, D.S., D.J. Candtliffe, N.L. Shaw, and J.R. Liu. 2004.

Direct adventitious shoot formation on seedling radicles in seed cultures of strawberry. J. Plant Biol. 47:160-162.

Lee, J.N., H.J. Kim, K.D. Kim, Y.S. Kwon, H.T. Lim, and Y.R. Yeoung. 2010a. In vitro mass propagation and economic effects of bioreactor culture in ever-bearing strawberry 'Goha'. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 28:845-849.

Lee, J.N., H.J. Kim, K.D. Kim, Y.S. Kwon, Y.R. Yeoung, and H.T. Lim. 2010b. Appropriate in vitro culture conditions of growing medium for new ever-bearing strawberry 'Goha'. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 28:1051-1056.

Lorenzo, J.C., B.L. Gonzales, M. Escalona, C. Teisson, P. Espinosa, and C. Borroto. 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 39:197-200.

Passey, A.J., K.J. Barrett, and D.J. James. 2003. Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria* × *ananssa* Duch.) using a range of explants types. Plant Cell Rep. 21:397-401.

Scragg, A.H. 1992. Large-scale plant cell culture: Methods, applications and products. Current Option Biotech. 3:105-109.

Takayama, S. 2002. Practical aspects of bioreactor application in mass propagation of plants. 1st Intl. Symp. Liquid Systems Vitro Mass Prop. Plants. p. 60-62. (Abstr.)

Takayama, S. and M. Akita. 1994. The types of bioreactors used for shoots and embryos. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 39:147-156.

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. 2008. Plant tissue culture engineering, p. 83-100. In: S. Dutta Gupta and Y. Ibaraki (eds.). Bioengineering aspects of bioreactor application in plant propagation. Springer -Verlag, Berlin.

Takayama, S., Y. Arima, and M. Akita. 1986. Mass propagation of plants by fermentor culture techniques. 6th Intl. Congr. Plant Tissue Cell Cult. p. 449. (Abstr.)

Teisson, C. and D. Alvard. 1995. A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: Temporary immersion, p. 105-110. In: M. Terzi, R. Cella, and A. Falarigna (eds.). Current issues in plant molecular and cellular biology. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht.

Teisson, C., D. Alvard, B. Berthouly, F. Cote, J.V. Escalant, H. Etienne, and M. Lartaud. 1996. Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion. Acta Hort. 40:521-526.

Yu, W.C., P.J. Joyce, D.C. Cameron, and B.H. McCown. 2000. Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors. Plant Cell Rep. 19:407-413.

Ziv, M. 2005. Simple bioreactors for mass propagation of plants. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 81:277-285.