Bioreactor를 이용한 사계성 딸기 조직배양묘 대량증식을 위한 적정 무호르몬 배지

김혜진 · 이종남 · 김기덕 · 임주성 · 임학태 · 용영록

Suitable hormone-free medium for in vitro mass propagation via bioreactor culture of ever-bearing strawberry

Hye Jin Kim · Jong Nam Lee · Ki Deog Kim · Ju Sung Im · Hak Tae Lim · Young Rok Yeoung

Received: 11 August 2011 / Accepted: 30 August 2011

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract This study was carried out to determine optimal medium conditions for mass propagation by bioreactor culture of ever-bearing strawberry (*Fragaria × ananassa* D.). Two different type of nitride were that mixed NH_4NO_3 and KNO_3 or added KNO_3 only. And nitride concentrations were at the 4 levels of 1/2×, 1×, 2× and 3× that was included NH_4NO_3 and KNO_3 . Sucrose content ranged at 3 levels of $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and medium pH were at the 3 levels of 4.6, 5.6 and 6.6. In bioreactor culture, medium that are included NH_4NO_3 and KNO_3 together in MS medium was suitable for mass propagation. Medium EC rose rapidly when the nitride concentration was increased. For that reason, plantlet growth was inhibited. Shoots of nitride 1/2× concentration was 10.8 ea and 1/2× concentration was suitable for shoot propagation. Fresh weight of sucrose $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ was 3,101 mg which was heaviest and aerial and ground part were higher than the other concentration. Shoots were increased in proportion to the increasing concentration of sucrose. In the pH condition, from pH 5.6 to 6.8 were appropriate for the optimum growth of aerial and ground part of plant. From the results, in bioreactor

culture for mass propagation, MS medium was suitable 1/2× concentration that was included NH_4NO_3 and KNO_3 together, and added $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ of sucrose, and then adjusted pH between 5.6 and 6.6.

Keywords *Fragaria × ananassa*, medium pH, nitride, shoot propagation, sucrose concentration

서 언

딸기는 모주에서 runner가 뻗어 나와 독립된 개체를 만들어 증식하는 영양번식 작물로, 양질의 딸기묘 생산을 위해서는 조직배양에 의해 나온 무병묘 (virus-free)를 이용하는 것이 바람직하다. 딸기 무병묘의 대량생산을 위한 조직배양 연구는 국·내외적으로 거의 이뤄지지 않았으며, 최근 발표된 연구 (Lee et al. 2010a, 2010b)와 수편에 불과하다.

딸기와 대부분의 작물들은 조직배양묘 생산 시 반고체 또는 고체배양 방법으로 증식하지만 (Boxus 1974; Boxus et al. 1977; Damiano 1980), 증식률이 1-2배로 매우 낮다 (Lee et al. 2010a). 대부분의 작물들은 증식을 향상을 위하여 호르몬 처리를 하지만 (Bhatt and Dhar 2000; Kirschbaum et al. 2004; Passey et al. 2003), 딸기의 경우 배수성 ($2n=8x=56$)이 높아 고농도의 호르몬을 사용하여 대량증식할 경우 체세포 변이 발생률이 높아져 (Sansavini et al. 1990) 우리나라 딸기 무병묘 공급체계가 중단되는 결과를 초래하기도 하였다.

식물체의 대량증식 기술로 bioreactor 이용은 Takayama와 Misawa (1981)가 사용한 후 많은 식물종에 응용되어 왔으며 (Abdullah et al. 2000; Correll et al. 2000; Escalona et

H. J. Kim · J. N. Lee (✉) · K. D. Kim · J. S. Im
국립식량과학원 고령지농업연구센터
(Highland Agricultural Research Center, National Institute of Crop Science, RDA, Pyeongchang, 232-955, Korea)
e-mail: melondad@korea.kr

H. T. Lim
강원대학교 생명건강공학전공
(Department of Bio-Health Technology, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea)

Y. R. Yeoung
강릉원주대학교 식물생명과학과
(Department of Plant Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, 210-702, Korea)

al. 1999; Gao et al. 2000; Honda et al. 2001; Ingram and Mavituna 2000; Lee et al. 2010a; Lorenzo et al. 2001; Paek et al. 2001; Vinocur et al. 2000), 특히 공기주입형 bioreactor가 개발됨으로서 영양변식작물 (Akita 2000; Lee et al. 2010a; Takayama 2002)의 대량증식에 이용되기 시작하였다.

Lee 등 (2010a)은 딸기의 무병묘 대량증식을 위해 국내 최초로 bioreactor를 이용하였는데, 증식률이 매우 높고 호르몬을 사용하지 않아도 양질의 무병묘를 대량생산할 수 있고, 고체배양에 비해 배양용기수가 적게 들고, 노동력과 공간이 적게 소요되며 특히 주당 생산비용이 매우 낮아 딸기 조직배양묘의 대량증식에 있어 bioreactor의 이용 가능성을 제시하였다. 그러나 딸기 조직배양묘의 bioreactor 배양 시 뿌리는 많이 발생하나, 뿌리길이가 매우 짧은 단점이 있기 때문에 순화 후 뿌리활착을 빠르게 하고 생존율을 높이기 위해서 뿌리발달이 잘되는 배지조건을 찾는 것이 매우 중요하다.

딸기의 bioreactor 배양 시 기내 유식물체의 생육 및 뿌리발달은 여러 가지 배지조건에 따라 다르게 나타난다. 특히 질소질의 종류 및 농도는 딸기 유식물체의 초장 및 뿌리생육에 영향을 미치며 (Leifert et al. 1992; Williams et al. 1985; Woodward et al. 2006), sucrose는 식물체의 생장과 분화 (Aloni 1980; Bofunia and Przywara 1999; Gibson 2000; Leva et al. 1990; Steinitz 1999), 삼투압과 수분포텐셜에 영향을 미쳐 유식물체의 양·수분 흡수에 관여한다 (Lipavská and Vreugdenhil 1996). 또한 배지 pH는 식물의 양분 흡수와 효소 및 호르몬 활동 (Bhatia and Ashwath 2005; Gaspar et al. 1987; Hussey 1986), 그리고 세포분화와 신초생장 등의 세포질적 활동을 조절한다 (Brown et al. 1979). 따라서 본 연구는 bioreactor 배양 시 배지 내에 호르몬 첨가없이 효율적으로 조직배양묘를 대량증식시키고, 조직배양묘의 뿌리발달을 유도하는 알맞은 배지 조건을 구명하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

생장점 배양 및 계대배양

본 실험에서 사용된 사계성 딸기는 ‘고하’ 품종이며, 고설식 수정재배법으로 재배된 ‘고하’ 모주로부터 발생된 runner tip을 10cm 길이로 절단하여 생장점 배양에 이용하였다. 생장점 배양 방법 및 배지조성은 Lee 등 (2010b)의 방법과 동일하게 실시하였으며, 생장점 배양 4주 후 계대배양 배지에 옮겨주었으며, 계대배양 배지는 1/2MS 무기염에 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 sucrose를 첨가하여 배지 pH를 5.6으로 조정 후 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 agar를 첨가하여 121°C , 1.5기압의 고압

멸균기에서 15분간 멸균하여 사용하였다 (Lee et al. 2010b). 계대배양 후 본엽이 6-10매 확보된 유식물체의 어린잎 1매를 남기고 잎과 뿌리를 모두 제거한 후 본 실험에 사용하였다.

질소질 종류 및 농도

실험에 사용된 배지는 MS 무기염이며 (Murashige and Skoog 1962), 질소질 종류별 처리는 NH_4NO_3 ($1650 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)와 KNO_3 ($1900 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)를 혼합 첨가한 배지와 KNO_3 ($1900 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)를 단독 첨가한 배지를 이용하였다. 질소질 농도별 처리는 NH_4NO_3 와 KNO_3 를 혼합 첨가하여 농도를 1/2배 (NH_4NO_3 : $825 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 KNO_3 : $950 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 1배 (NH_4NO_3 : $1650 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 KNO_3 : $1900 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 2배 (NH_4NO_3 : $3300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 KNO_3 : $3800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 및 3배 (NH_4NO_3 : $4950 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 KNO_3 : $5700 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)로 처리하였다. 모든 배지는 sucrose $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 을 첨가하였으며, pH 5.6으로 조정하여 121°C , 1.5기압의 고압멸균기에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

Sucrose 농도

Bioreactor 배양 시 sucrose 농도는 고체배양 시 생체량이 증가되는 농도 범위인 $10\text{-}30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 을 기준 (Lee et al. 2010b)하여 설정하였다. Sucrose 농도별 처리는 MS 무기염을 기본으로 사용하였으며, $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 및 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 sucrose를 첨가하여 pH 5.6으로 조정하여 121°C , 1.5기압의 고압멸균기에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

배지 pH

배지 pH실험은 MS 무기염에 sucrose $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 을 첨가한 후, 배지 pH를 각 4.6, 5.6 및 6.6으로 조정 후 pH의 변화를 막기 위해서 10mM의 MES 완충제를 첨가하였다. 배지는 121°C , 1.5기압의 고압멸균기에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

Bioreactor 배양

위 모든 실험에 사용된 bioreactor는 balloon type의 2L용량이며, bioreactor내에 액체배지를 분주하고 하부에서 공기를 주입하는 방식인 ‘Immersion’ 방식을 이용하였다. 또한 모든 실험은 각 처리당 10개의 유식물체를 치상하였으며, 공기주입량은 0.2 vvm (air volume/medium volume/minute), 배양실의 온도환경은 $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 일장조건은 16(명)/8(암)시간으로 배양하였고 3반복으로 실시하였다. 배양 6주 후 무작위로 10개체를 선발하여 생육 조사를 실시하였다.

결과 및 고찰

질소질 종류 및 농도

Bioreactor 배양 시 MS 배지 내 첨가된 질소질의 종류에 따라 기내 유식물체의 지상부 및 지하부 생육에 차이를 보였다 (Table 1). NH_4NO_3 와 KNO_3 가 모두 첨가되어 있는 처리구는 KNO_3 만 첨가되어 있는 처리구에 비해 초장을 제외한 모든 조사항목에서 생육량이 월등히 높았다. NH_4NO_3 - KNO_3 처리구 에 비해 KNO_3 처리구의 엽수는 주당 약 10개, 뿌리수는 약 25개 더 적게 발생하였다. KNO_3 처리구의 뿌리길이가 2.5 cm로 NH_4NO_3 - KNO_3 처리구 (4.5 cm)에 비해 짧았으며, 생체중은 NH_4NO_3 - KNO_3 처리구의 1/3수준이었다. 신초수는 NH_4NO_3 - KNO_3 처리구가 주당 9.8개이며, KNO_3 처리구의 주당 7.3개보다 2.5개 더 적었다. NH_4NO_3 - KNO_3 처리구에서 발생한 신초는 엽병과 잎이 녹색을 띄고, 뿌리가 흰색인 완전한 식물체로 발달하였으나, KNO_3 처리구의 엽병은 붉은색을 띄었고, 잎이 황변하였으며, 뿌리가 노황색을 띄어 지상부 및 지하부의 생육이 불량하였다 (Fig. 1).

일반적으로 배지에 두 가지 종류 ($\text{NH}_4\text{-N}$ 과 $\text{NO}_3\text{-N}$)의 질소 화합물을 첨가하였을 때 처음에는 $\text{NH}_4\text{-N}$ 의 흡수가 급속히 이루어져 배지의 pH가 낮아진다. 배지의 pH가 낮아지면 $\text{NO}_3\text{-N}$ 의 흡수가 촉진되어 pH는 다시 올라가 식

물체의 초기 생육이 왕성해진다. 그러나 $\text{NH}_4\text{-N}$ 를 첨가하지 않으면 식물체가 배양 초기에 $\text{NH}_4\text{-N}$ 를 흡수하지 못해 생육이 저조하고, $\text{NO}_3\text{-N}$ 가 $\text{NH}_4\text{-N}$ 로 환원되어 뒤늦게 식물체 내로 흡수되기 때문에 $\text{NH}_4\text{-N}$ 를 공급하는 것은 매우 중요하다 (Leifert et al., 1992). 배지의 pH는 NH_4^+ 과 NO_3^- 에 의해 변동되는데, NH_4^+ 과 NO_3^- 을 함께 첨가하면 배지 pH의 변동이 최소화되어 발근이 훨씬 잘된다 (Woodward et al. 2006). 또한 pH에 영향을 미치는 서로 다른 질소원을 각각 처리하는 것보다 혼합처리하는 것이 기내생육에 좋았던 것처럼 (Lee et al. 2010b; Sathyanarayana and Blake 1994; Selby and Harvey 1990), 본 실험에서 NH_4NO_3 - KNO_3 처리구의 신초생육이 매우 왕성하고 뿌리 발달이 좋아 딸기 유식물체 배양 시 두 가지 종류의 질소 화합물을 모두 첨가하는 것이 바람직하다고 판단된다.

본 실험에서 질소질의 농도가 증가할수록 배지 내 EC (electronic conductivity)는 크게 증가하였다 (Table 2). 딸기는 내염성에 가장 약한 작물로, 배양액의 EC가 생육과 매우 밀접한 관계를 갖고 있다. 사계성 딸기 수경재배 시 배양액의 적정 EC범위는 $0.6\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ 에서 $1.2\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ 으로 (Lee 2006) 배양액의 EC가 높아지면, 뿌리의 발육이 저해되고, 뿌리가 갈변되어 결과적으로 지상부 생육이 불량해진다. Lee 등 (2010b)은 딸기 조직배양묘의 고체배양 시 배지의 농도가 높아질수록 배지 EC도 높아지고, 그에 따라 조직배양묘의 생육이 불량해진다고 보고한 바 있다. 본 실험

Table 1 Growth characteristics of in vitro plants according to nitride type in bioreactor of ever-bearing strawberry ‘Goha’

Nitride type	Shoot length (cm)	No. of leaves (ea)	No. of roots (ea)	Root length (cm)	Fresh weight (mg)	No. of shoots (ea)	Root color index ^z
NH_4NO_3 - KNO_3	2.3±0.1	32.0±1.7	39.5±2.7	4.5±0.3	2,200±205.9	9.8±0.2	0
KNO_3	2.2±0.1	20.9±2.6	14.6±2.1	2.5±0.4	668±89.1	7.3±0.7	4
LSD ^y	NS	**	**	**	**	**	-

^zRoot color index : 0, white; 1, light yellow; 2, yellow; 3, dark yellow; 4, yellow-green; 5, green; 6, red green; 7, light brown; 8, brown; 9, dark brown

^yLSD : NS, **, No significant or significant at $P=0.001$, respectively

Fig. 1 Growth comparison of in vitro plants according to nitride type in bioreactor of ever-bearing strawberry ‘Goha’: mixed 1 concentration of NH_4NO_3 and KNO_3 in MS medium (A); added 1 concentration of KNO_3 only in MS medium (B)

Table 2 Growth characteristics of in vitro plants according to nitride concentration in bioreactor of ever-bearing strawberry ‘Goha’

Nitride concentration	Electronic conductivity (dS·m ⁻¹)	Shoot length (cm)	No. of leaves (ea)	No. of roots (ea)	Root length (cm)	Fresh weight (mg)	No. of shoots (ea)	Root color index ^z
1/2×	3.3	2.5a ^y	39.2a	44.5a	5.2a	2,075b	10.8ab	0
1×	5.5	2.3a	32.0ab	39.5a	4.5a	2,200b	9.8a	0
2×	9.9	2.5a	38.7a	37.7a	3.9a	5,177a	8.4ab	8
3×	14.0	1.7b	21.0b	6.6b	1.1b	1,382b	5.6b	9

^zRoot color index : 0, white; 1, light yellow; 2, yellow; 3, dark yellow; 4, yellow-green; 5, green; 6, red green; 7, light brown; 8, brown; 9, dark brown

^yMean separation within columns by Duncan’s multiple range test ($P \leq 0.05$)

Fig. 2 Growth comparison of in vitro plants according to nitride concentration in bioreactor of ever-bearing strawberry ‘Goha’: 1/2 concentration of NH_4NO_3 and KNO_3 (A); 1 concentration of NH_4NO_3 and KNO_3 (B); 2 concentration of NH_4NO_3 and KNO_3 (C); 3 concentration of NH_4NO_3 and KNO_3 (D)

에서 질소질농도 1/2배부터 2배까지는 초장과 엽수가 비슷하였으나, 3배는 초장이 짧아지고, 엽수는 적어졌다. 뿌리수, 뿌리길이 및 생체중은 질소질 농도가 높아질수록 점차 줄어드는 경향을 보였으며, 특히 3배 농도에서 급격히 줄어들었다. 또한 신초는 1/2배에서 10.8개, 1배에서 9.8개, 2배에서 8.4개 및 3배에서 5.6개로 질소질의 농도가 증가함에 따라 발생수가 줄어들었다. 또한 뿌리수와 뿌리길이는 고농도의 질소질에서 현저히 줄어들었으며 (Table 2), 뿌리색은 저농도의 질소질 (1/2배, 1배)에서 흰색을 띄며, 고농도의 질소질 (2배, 3배)에서 갈색 및 흑갈색을 띄어 (Table 2, Fig. 2) 배지 내 높은 EC가 딸기 유식물체의 지상부 생육 및 뿌리 생육에 악영향을 미치는 것을 확인하였다.

기내배양에서 식물종에 따라 배지를 달리하거나, MS 배지의 무기물이나 유기물을 부분적으로 변형해서 사용해왔다. 양치류, 글라디올러스 및 Nerin의 마디를 bioreactor 배양할 경우 1배 MS배지보다 1/2배 MS 배지에서 분화와 증식이 더 잘 되었으며, 백합 구근도 같은 경향을

Fig. 3 Growth comparison of in vitro plants according to sucrose concentrations in bioreactor of ever-bearing strawberry ‘Goha’: MS medium was supplemented with 10g·L⁻¹ sucrose (A), 20 g·L⁻¹ sucrose (B), and 30 g·L⁻¹ sucrose (C)

나타냈다 (Takayama 1991). 고무나무의 기내 대량번식에서는 질소원의 종류별 처리와 농도는 신초증식에 중대한 영향을 미치지 않는았으나 발근단계에 영향을 미쳤다 (Le Roux and Van Staden 1991; McComb et al. 1996)는 보고처럼 본 실험의 질소질 농도 3배를 제외하고는 농도가 증가해도 기내 유식물체의 생체 성장량 및 신초수가 비슷한 것으로 보아 사계성 딸기 ‘고하’도 질소원 1/2-2배 농도까지는 신초 증식에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 일부에서는 NH_4NO_3 의 양이 감소하면 뿌리발생이 증가한다고 보고 (Bennett et al. 2003; Chattopadhyay et al. 1992; Grimes and Hodges 1990; Sriskandarajah et al. 1990) 하였는데, 본 실험에서도 NH_4NO_3 - KNO_3 혼합 첨가한 처리구 중 NH_4NO_3 가 가장 적게 첨가된 1/2배 처리구의 뿌리발생량이 가장 많았고, NH_4NO_3 가 가장 많이 첨가된 3배 처리구의 뿌리발생량이 가장 적어 딸기에서도 배지 내 NH_4NO_3 의 양이 뿌리발생에 영향을 미치는 요인임을 알 수 있었다. Lee 등 (2010a)은 딸기 조직배양묘를 bioreactor를 이용하여 대량증식할 경우, 뿌리 발생과 신장이 불량하여, 뿌리 발육을 왕성하게 할 수 있는 방법을 찾아야

Table 3 Growth characteristics of *in vitro* plants according to sucrose concentration in bioreactor of ever-bearing strawberry ‘Goha’

Sucrose concentration (g·L ⁻¹)	Shoot length (cm)	No. of leaves (ea)	No. of roots (ea)	Root length (cm)	Fresh weight (mg)	No. of Shoots (ea)
10	1.4b ^z	6.9c	5.4b	0.8b	1,366b	2.5b
20	1.7b	22.0b	13.2b	1.8b	1,965b	4.2b
30	2.7a	64.6a	48.7a	5.2a	3,101a	9.5a

^zMean separation within columns by Duncan’s multiple range test ($P \leq 0.05$)

Table 4 Growth characteristics of *in vitro* plants according to medium pH in bioreactor of ever-bearing strawberry ‘Goha’

Medium pH	Shoot length (cm)	No. of leaves (ea)	No. of roots (ea)	Root length (cm)	Fresh weight (mg)	No. of shoots (ea)
4.6	2.3b ^z	32.0b	26.5b	3.5b	1,742b	7.9a
5.6	4.9a	101.3a	74.5a	8.5a	6,768a	11.4a
6.6	4.6a	88.2a	66.8a	6.3ab	5,572a	10.2a

^zMean separation within columns by Duncan’s multiple range test ($P \leq 0.05$)

Fig. 4 Growth comparison of *in vitro* plants according to medium pH in bioreactor of ever-bearing strawberry ‘Goha’: pH 4.6 (A), pH 5.6 (B), and pH 6.6 (C)

한다고 하였는데, 본 실험에서 신초 생육이 왕성할 뿐만 아니라 뿌리발생량이 가장 많은 질소질 농도 1/2배 처리구가 bioreactor 배양 시 가장 알맞은 것으로 확인되었다.

Sucrose 농도

Bioreactor 배양 시 sucrose 30 g·L⁻¹의 경우 초장 2.7 cm, 엽수 64.6개, 뿌리수 48.7개, 뿌리길이 5.2 cm로 지상부와 지하부 생육량이 다른 농도에 비해 매우 많았고, 생체중은 3,101 mg으로 매우 무거웠다 (Table 3). 또한 신초수는 9.5개로 sucrose농도가 높아짐에 따라 신초수도 늘어나는 경향을 보였다 (Fig. 3). 사계성 딸기 ‘고하’의 조직배양을 위한 초대배양 시, 딸기 조직배양묘의 생체량이 증가하는 sucrose 농도 범위는 10–30 g·L⁻¹였고, 그 중 고체배양 시 적정 sucrose 농도는 10 g·L⁻¹ 인 것 (Lee et al. 2010b)에 반하여, bioreactor 배양 시 최대 생체량 및 최대 신초 증식에 알맞은 sucrose 농도는 30 g·L⁻¹임을 확인할 수 있었고, 이것은 sucrose 농도가 높아짐에 따라 세포의 생장과 분화가 촉진되었기 때문으로 판단되었다.

배지 pH

Bioreactor 내 배지 pH에 따른 사계성 딸기 ‘고하’ 유식물체의 생육은 Table 4 와 같다. 배지 pH 4.6 처리는 초장 2.3 cm, 엽수 32.0개로 pH 5.6처리구와 pH 6.6 처리구의 초장 각각 4.9 cm, 4.6 cm, 엽수 101.3개, 88.2개에 비해 지상부 생육량이 저조했다. pH 4.6 처리구의 뿌리수는 26.5개로 pH 5.6과 pH 6.6 처리구의 74.5개와 66.8개에 비해 매우 적었고, pH 4.6 처리구의 뿌리길이도 3.5 cm로 다른 처리구에 비해 매우 짧아, 지하부 생육량도 가장 적었다. pH 4.6 처리구의 생체중은 1,742 mg으로 pH 5.6 (6,768 mg)과 pH 6.6 (5,572 mg) 처리구 의 1/4과 1/3 수준이었다. 신초수는 pH 4.6 처리구가 7.9개, pH 5.6처리구가 11.4개, pH 6.6 처리구가 10.2개로 pH 4.6 처리구가 가장 적게 발생하였다 (Fig. 4). pH 5.6 처리구에 비해 pH 6.6 처리구가 지상부, 지하부 생육량 및 신초수가 적은 수준이었으나, 두 처리간 큰 차이를 보이지 않았다.

딸기는 약산성 조건에서 생육이 좋은 식물로, 조직배양 시 배지의 pH도 약산성으로 맞춰주는 것이 좋다. 배지 pH는 기내 유식물체의 성장, 발달 및 신초 증식에 매

우 중요한 요인 중의 하나이다 (Bhatia and Ashwath 2005; Gaspar et al. 1987; Hussey 1986; Brown et al. 1979). 본 실험에서 pH4.6 처리구는 산성이 강해, 딸기 유식물체의 양분 흡수를 저해하고, 세포분화 및 신초생장을 억제했을 것으로 판단되며, 약산성 조건인 pH5.6과 pH6.6 처리구는 딸기 유식물체의 생육에 적당한 수준의 pH로 양분 흡수 및 세포질적 활동을 활발하게 함으로서 기내 유식물체의 생육이 왕성하고 신초수도 많았던 것으로 판단된다. 따라서 사계성 딸기 조직배양묘의 bioreactor를 이용한 대량증식 시 배지 조건은 MS 무기염을 기본으로 하여 배지 내 질소원인 NH_4NO_3 와 KNO_3 가 모두 첨가되어 있으며, 농도는 1/2배, sucrose 농도는 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH는 5.6-6.6으로 조정하여 사용하는 것이 가장 바람직한 것으로 판단되었다. 그러나 bioreactor를 이용하여 증식하면 증식률이 높아지고 지상부 생육은 왕성하나 지하부 생육은 저조하다 (Lee et al. 2010a). 또한 기내배양 시 미세환경에서 자란 유식물체가 외부환경에 노출되면 식물체가 피해를 입어 정상적인 생육이 어렵다. 따라서 bioreactor 배양 후 조직배양묘 순화방법에 관한 추가연구가 필요할 것으로 판단된다.

적 요

본 실험은 사계성 딸기의 무병묘 대량생산을 위한 bioreactor 배양 시 배지조건을 구명하기 위해 실시하였다. 배지조건은 MS배지 내 질소질 종류 2처리 (NH_4NO_3 - KNO_3 혼합, KNO_3 단독), MS배지 내 질소농도 4처리 (1/2배, 1배, 2배, 3배), sucrose농도 3처리 ($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)와 배지 pH 3처리 (pH 4.6, 5.6, 6.6) 등을 실험하였다. 사계성 딸기의 bioreactor 배양 시 MS배지 내에 NH_4NO_3 와 KNO_3 를 혼합처리한 배지가 생육량이 많았다. 질소농도가 높아질수록 배지 EC가 급격히 높아지고, 그에 따라 유식물체 생육이 억제되었다. 질소질 1/2배에서 생육량이 많고 신초가 10.8개로 가장 많이 발생하였다. Bioreactor 배양 시 sucrose농도는 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 에서 생체중이 3,101 mg으로 가장 무거웠고, 지상부와 지하부 생육량 모두 다른 농도에 비해 많았다. 또한 sucrose농도가 높아질수록 신초수도 증가되는 경향을 보였다. 배지 pH는 5.6-6.6 범위에서 지상부와 지하부 생육량이 모두 많았다. 따라서 사계성 딸기 조직배양묘의 bioreactor를 이용한 대량증식 및 뿌리발달에 알맞은 배지 조건은 MS 무기염을 기본으로 하여 배지 내 질소질은 NH_4NO_3 와 KNO_3 혼합, 농도는 1/2배, sucrose농도는 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 과 배지 pH는 5.6-6.6 범위가 가장 적합하였다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 국립식량과학원 고령지농업연구센터의 '고령지 사계성 딸기 무병묘 생산 기술연구' 연구과제비용으로 수행된 결과의 일부이며, 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

- Abdullah MA, Ariff AB, Marziah M, Ali AM, Lajis NH (2000) Strategies to overcome foaming and wall-growth during the cultivation of *Morinda elliptica* cell suspension culture in a stirred-tank bioreactor. *Plant Cell Tiss Org Cult* 60:205-212
- Akita M (2000) Bioreactor culture of plant organs In: Spier RE, Griffiths B, Scragg AH (eds), *The Encyclopaedia of cell technology*. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp 129-138
- Aloni R (1980) Role of auxins and sucrose in the differentiation of sieve and trachery elements in plant tissue cultures. *Plant* 150: 255-263
- Bennett IJ, McDavid DAJ, McComb JA (2003) The influence of ammonium nitrate, pH and indole butyric acid on root induction and survival in soil of micropropagated *Eucalyptus plobulus*. *Biol Plant* 47:355-360
- Bhatia P, Ashwath N (2005) Effect of medium pH on shoot regeneration from the cotyledonary explants of tomato. *Biotechnology* 4:7-10
- Bhatt ID, Dhar U (2000) Micropropagation of Indian wild strawberry. *Plant Cell Tiss Org Cult* 60:83-88
- Bofunia H, Przywara L (1990) Rola cukrowców roślinnych kulturach *in vitro*. *Wiad Bot [Sugars in plant tissue culture]* 43:25-36
- Boxus PH (1974) The production of strawberry plants by in vitro micropropagation. *J Hort Sci* 49:209-210
- Boxus PH, Quoirin M, Laine JM (1977) Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. In: Reinert J, Bajaj YPS (eds), *Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp 130-143
- Brown DCW, Leung DWM, Thorpe TA (1979) Osmotic requirements for shoot formation in tobacco callus. *Physiol Plant* 46: 36-41
- Chattopadhyay S, Datta SK, Ray M (1992) In vitro effect of NH_4NO_3 on growth and alkaloid content of *Tylophora indica* Merr. *Phytomorphism* 42:139-144
- Correll MJ, Wu Y, Weathers PJ (2000) Controlling hyperhydration of carnations (*Dianthus caryophyllus* L.) grown in a mist reactor. *Biotechnol Bioeng* 71:307-314
- Damiano C (1980) Proceedings of the conference on nursery production of fruit plants through tissue culture. Applications and feasibility. In: Planning and building a tissue culture laboratory. USDA, pp 93-101
- Escalona M, Lorenzo JC, Gonzalez B, Daquinta M, Gonzalez JL, Desjarins Y, Borroto CG (1999) Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rpt* 18:743-748

- Gao WY, Fan L, Paek KY (2000) Yellow and red pigment production by cell cultures of *Carthamus tinctoris* in a bioreactor. *Plant Cell Tiss Org Cult* 60:95–100
- Gaspar T, Kevers C, Debergh P, Maeng L, Paques M, Boxus P (1987) Vitrification: Morphological, Physiological and ecological aspects. In: Bonga JM, Durzan J (eds), General principles and biotechnology. Cell and Tissue Culture in Forestry. The Netherlands
- Gibson SI (2000) Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiol* 124:1532–1539
- Grimes HD, Hodge TK (1990) The inorganic $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ratio influences plant regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of indica rice (*Oryza sativa* L.). *J Plant Physiol* 136:362–367
- Honda H, Liu C, Kobayashi T (2001) Large-scale plant micropropagation. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 72:157–182
- Hussey G (1986) Vegetative propagation of plants by tissue culture. In: Yeoman MM (ed), Plant Cell Culture Technology, Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Ingram B, Mavituna F (2000) Effect of bioreactor configuration on the growth and maturation of *Picea sitchensis* somatic embryo cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult* 61:87–96
- Kirschbaum DS, Candliffe DJ, Shaw NL, Liu JR (2004) Direct adventitious shoot formation on seedling radicles in seed cultures of strawberry. *J Plant Biol* 47:160–162
- Lee JN (2006) Physiological and ecological response of ever-bearing strawberry in the highlands cultivation for off-season production. PhD. thesis. Gangneung National University. Gangneung
- Lee JN, Kim HJ, Kim KD, Kwon YS, Lim HT, Yeung YR (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 JN, Kim HJ, Kim KD, Kwon YS, Yeung YR, Lim HT (2010b) Appropriate in vitro culture conditions of growing medium for new ever-bearing strawberry ‘Goha’. *Kor J Hort Sci Technol* 28:1051–1056
- Leifert C, Pryce S, Lumsden P, Waites P (1992) Effects of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing in vitro. *Plant Cell Tiss Org Cult* 30:171–179
- Lipavská H, Vreugdenhil D (1996) Uptake of mannitol from the media by *in vitro* grown plants. *Plant Cell Tiss Org Cult* 45:103–107
- Le Roux JJ, Van Staden J (1991) Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus* -a review. *Tree Physiol* 9:435–477
- Leva AR, Bartolini G, Muleo R, Biricoliti S, Benelli A (1990) Micromorphological studies on *Actinidia* cv. Harvard calli as influenced by different sugars. In: X X III International Horticultural Congress (ed) Abstracts of Contributed Papers: 3123. Firenze. Italy
- Lorenzo JC, Ojeda E, Espinosa A, Borroto C (2001) Field performance of temporary immersion bioreactor-derived sugarcane plants. *In vitro Cellular Dev Biol Plant* 37:803–806
- McComb JA, Bennett IJ, Tonkin CM (1996) In vitro propagation of *Eucalyptus* species. In: Taji A, Williams R (eds), Tissue culture of Australian native plants, University of New England Press, Armidale, pp 112–156
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473–479
- Paek KY, Hahn EJ, Son SH (2001) Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. *In vitro Cellular Dev Biol Plant* 37:284–292
- Passey AJ, Barrett KJ, James DJ (2003) Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa* Duch.) using a range of explants types. *Plant Cell Rpt* 21:397–401
- Sansavini S, Rosati P, Gaggioli D, Toshi MF (1990) Inheritance and stability of somaclonal variation in micropropagated strawberry. *Acta Hort* 280:375–384
- Sathyanarayana BN, Blake J (1994) The effect of nitrogen sources and initial pH of the media with or without buffer on in vitro rooting of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam). *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp 77–78
- Selby C, Harvey BMR (1990) The influence of composition of the basal medium on the growth and morphogenesis of cultured sitka spruce (*Picea sitchensis*) tissues. *Ann Bot* 65:395–407
- Sriskandarajah S, Skirvin RM, Abu-Qaoud H (1990) The effect of some macronutrients on adventitious root development on scion apple cultivars in vitro. *Plant Cell Tiss Org Cult* 21:185–189
- Steinitz B (1999) Sugar alcohols display non osmotic roles in regulating morphogenesis and metabolism in plants that do not produce polyols as primary photosynthetic products. *J Plant Physiol* 155:1–8
- Takayama S (1991) Mass propagation of plants through shake and bioreactor culture techniques. In: Bajaj, YPS (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 17. Springer-Verlag, Berlin, pp 495–515
- Takayama S (2002) Practical aspects of bioreactor application in mass propagation of plants. *Abst. 1st Int. Symp. Liquid systems for in vitro mass propagation of plants*. Norway, pp 60–62
- Takayama S, Misawa M (1981) Mass propagation of *Begonia hiemalis* plantlets by shake culture. *Plant Cell Physiol* 22:461–468
- Vinocur B, Carmi T, Altman A, Ziv M (2000) Enhanced bud regeneration in aspen (*Populus tremula* L.) roots cultured in liquid media. *Plant Cell Rpt* 19:1146–1154
- Williams RR, Taji AM, Bolton JA (1985) Specificity and interaction among auxins, light, and pH in rooting of Australian woody species *in vitro*. *HortiScience* 20:1052–1053
- Woodward AJ, Bennett IJ, Pusswonge S (2006) The effect of nitrogen source and concentration, medium pH and buffering on in vitro shoot growth and rooting in *Eucalyptus marginata*. *Scientia Hort* 110:208–213