

## 바이오리액터 배양기에 의한 석곡 유식물체 대량 증식

황성수 · 구자춘 · 최 경 · 박광우 · 강경원 · 최은경 · 김재훈

### Mass production of the seedlings of *Dendrobium moniliforme* using bioreactor culture

Sung Soo Whang · Jachoon Koo · Kyung Choi · Kwang-Woo Park · Kyung-Won Kang · Eun Gyung Choi · Jae Whune Kim

Received: 16 November 2009 / Accepted: 14 December 2009  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** Protocorms were newly formed from the culture of axillary buds, obtained in the seedlings of *Dendrobium moniliforme* in vitro. Its formation ratio was calculated to 43.7% on MS medium containing 1.0 mg/L BA. To test their survival ratio, we gradually increased the inoculation of transplant populations from single to more than three, and then found that the ratio in three populations went up as high as 95.2% rather than those of one or two. In bioreactor, explant obtained from the axillary bud grew well in lower concentration as 1/4 MS medium, while clearly grew slow in a little bit high concentration as 1/2 MS medium. We found that the explant of axillary bud, obtained from the *Dendrobium moniliforme* seedlings, would grow five times after culturing in a bioreactor for six weeks in 1/4 MS medium.

### 서론

덴드로비움속 (genus *Dendrobium*)은 전 세계에 1,200여 종이 분포하는 커다란 분류군으로 착생란이다. 본 속은 원산지에 따라 온대지역에 자생하는 동양계와 열대 및 아열대 지역에 자생하는 서양계로 구분한다. 본 속 식물의 한반도 생육은 1종으로 *Dendrobium moniliforme* (L.) SW.(석곡)이며, 제주도와 남부 해안지방에 자생한다. 생육습성은 원시구경 (protocorm)으로부터 발생된 신초가 새로운 원시구경을 만들고 비대 충실기를 거쳐 일정기간 동안 저온을 경과한 후 화아를 형성하여 5~6월경에 흰색 또는 담홍색의 여러 송이의 꽃이 핀다. 덴드로비움의 번식방법으로는 분주, 고아의 분리 이식, 줄기 삽목과 같은 영양번식방법이 행하여지고 있으며 대량번식을 목적으로 조직배양을 이용한 생장점배양이나 종자의 무균발아법이 이용되고 있다.

우리나라 자생란에 관한 연구는 죽백란 (Kim and Lee 1992), 자란 (Jee et al. 2000), 나도풍란 (Kim et al. 1990), 제주한란 (Kim et al. 1996), 새우난초와 해오라비난초 (Chung et al. 1998b), 새우란 (Hyun et al. 1999; Kim et al. 2008)에 관하여 보고되었다. 그러나 석곡에 관한 연구는 약용식물에 관한 것 (Lo et al. 2004)이 있으나, 배양과 생산에 관한 보고는 별로 이루어지지 않고 있으며 현재 국내에서 유통되고 있는 석곡 그 대부분은 일본에서 수입된 품종이고 국내에서는 일부 조직배양실에서 생산 및 육종에 관한 연구가 진행되고 있다. 앞으로 국제적으로 경쟁력이 있는 다양한 종류의 우수한 석곡 품종의 개발 및 대량 생산을 위해 신기술을 집중적으로 연구개발해야 할 필요성이 있다.

따라서 우리나라 자생난인 석곡의 기내 무균 발아묘를

S.-S. Whang · J.-C. Koo  
전북대학교 과학교육학부  
(Department of Biology Education, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea)

K. Choi · K.-W. Park  
국립수목원  
(National Arboretum, Gyeonggi-do 487-821, Korea)

K.-W. Kang  
바보난농원  
(39 Saneung 1-ri, Jingeon-cup, Namyangju-si Gyeonggi-do, Korea)

E.-G. Choi · J.-W. Kim (✉)  
(주)마이크로프랜츠  
(#501, SBC Factory B/D Pallbokdong, Jeonju, Jeonbuk, 561-203, Korea)  
e-mail: kimsabsil@hanmail.net

고체배지와 바이오리액터를 이용한 액체배지에서 대량 배양을 실시한 결과를 보고 하고자 한다.

**재료 및 방법**

**석곡종자의 무균 발아**

수분 후 150여일 된 석곡 종자 꼬투리를 70% 알콜에 30분간 소독한 후 sodium hypochlorite로 15분간 침지 소독하였다 (Fig. 1A). 살균액 제거와 종자 흡수를 돕기 위하여 멸균수로 3~4차례 수세하고 1시간 동안 침지한 후 배지가 200 mL씩 분주된 500 mL 플라스크에서 파종하였다. 파종용 배지는 Hyponex 배지에 2 g/L peptone (Duchefa사)과 시중에서 판매되는 것으로 고온 살균에 의해 제조한 바바나액 30 g/L, 감자액 20 g/L, 사과액 10 g/L를 첨가하고 배지 고형제로 0.8% agar를 첨가한 후 pH는 5.8으로 조정하였다. 종자 발아기간 중에는 간접 형광등하 (300~400 Lux)에서 23±2℃를 유지하였고, 종자 발아 후에는 2,000 Lux 16시간 일장으로 명배양을 실시하였다.

**석곡 유식물체 절편의 고체배지에서 배양**

기내에서 무균발아에 의해 얻어진 석곡 식물체의 줄기 (약 3 cm 크기)를 0.5 cm 정도로 절단하여 MS 기본배지 (Murashige and Skoog 1962)에 2 g/L pepton과 25 g/L sucrose, 0.4% gerlite 첨가된 배지와 성장조절제 0.5 mg/L NAA와

BA 첨가한 배지, 1 mg/L BA를 첨가된 배지에 배양하였다. 난의 특성을 고려하여 배양시 접종체를 1개, 2개, 3개 이상 균락으로 양을 달리하여 접종하였고 배양 8주후 난과 식물의 분열조직인 원시구경 (또는 원괴체, protocorm)의 형성율을 조사하였다. 온도는 23±2℃를 유지하였고 2,000 Lux 16시간 일장으로 명배양을 실시하였다.

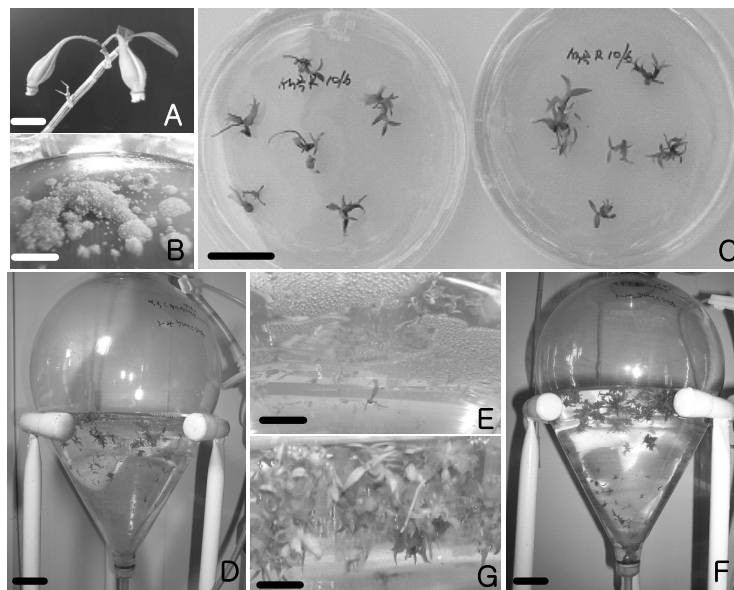
**석곡 절편체 바이오리액터 배양기의 액체배지에서 배양**

한천배지에서 증식시킨 석곡 줄기를 약 0.5 cm 정도로 잘라 무균적으로 바이오리액터에 옮겨 성장조절물질이 첨가되지 않은 MS기본배지 (1배)의 농도를 1/2배, 1/3배, 1/4배로 줄인 MS액체배지 조건에서 배양하였다. 유리 바이오리액터 안으로 공기의 주입은 수족관용 에어펌프 (LP-60 air-pump)를 사용하여 용기 밑에서 계속해서 뿜어지도록 장치하고 무균 공기의 주입을 위해 구멍크기 0.2 μm 필터 (Midisart 2000, Sartorius사, 독일)를 통과하도록 하였다. 배양환경은 23±1℃의 온도와 자연광이 드는 밝은 장소 또는 형광등 빛으로 2,000 Lux 정도의 밝기로 하였다.

**결과 및 고찰**

**석곡 종자의 무균발아 및 유식물체 배양**

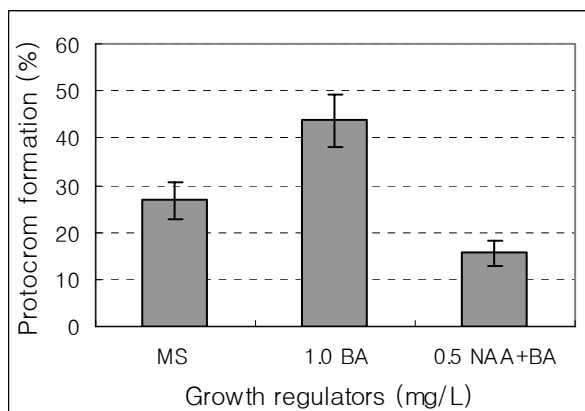
석곡 종자의 무균 발아를 위해 Hyponex 배지를 사용하여 파종한 결과 Fig. 1B와 같이 석곡종자는 파종 후 70여



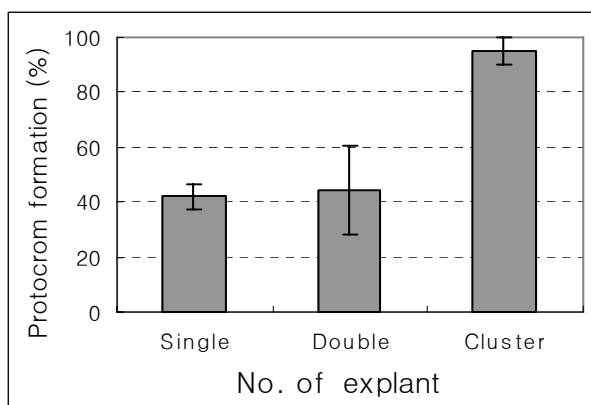
**Fig. 1** Plantlets of *Dendrobium moniliforme* propagated by bioreactor culture containing MS liquid medium. A) seed coats of *D. moniliforme*. B) germination of *D. moniliforme* seeds on MS medium. C) Plantlets cultured for five weeks on agar medium. D and E) Plantlets formed at the axillary bud by culturing for three weeks in bioreactor. F and G) Growth of plantlets propagated by culturing for six weeks in bioreactor. Scale bars represent 3 cm

일 후부터 발아하기 시작하였다. 종자의 성숙도와 흡습상태에 따라 지속적으로 발아하였으며 파종한 종자의 발아가 오랜 기간 진행되므로 배지의 양과 배지에 첨가한 바나나액, 감자액, 사과액과 같은 천연산물의 효과가 중요하리라고 생각되었다.

Hyponex 배지는 *Cymbidium*속 (Choi and Chung 1991), 새우난초와 해오라비난초 (Chung et al. 1998b)의 종자 파종시 발아상태가 양호하고 발아소요 일수가 짧아 MS배지나 KC배지 (Knudson 1946)보다 발아용 배지로 적합한 것으로 알려지고 있다. 또한, 난의 무균 파종시 첨가되는 사과즙이나 코코넛 밀크, 바나나액과 같은 천연산물은 *Cymbidium*속, 새우난초와 해오라비난초 발아 및 유묘생장에 효과적인 것으로 알려져 있다 (Chung et al. 1998b; Kim et al. 1998). 난 종자의 발아소요기간은 *Cymbidium*속 종자 경우 종피를 연화시키거나 제거시켜주는 0.1 N KOH와 초음파 처리로 단축할 수 있었는데 이와 같은 처리방법에 의해 43~90여일 사이에 종자가 모두 발아되는 것을 관찰할 수 있었다 (Choi and Chung 1991). 석곡 종자



**Fig. 2** Effect of growth regulator on the protocorm formation of *Dendrobium moniliforme* on MS agar medium after five weeks of culture



**Fig. 3** Effect of inoculation quantity on the protocorm formation of *Dendrobium moniliforme*

무균 파종 후 발아에 소요되는 기간을 단축하기 위하여 살균 수에서 일정시간 침지하는 방법 이외 물리적, 화학적 방법을 동시에 실시해 볼 필요가 있다고 생각된다. 석곡은 자연 상태에서 줄기를 그대로 놓히거나 절단하여 육묘상에 삼목하는 방법으로 번식이 가능하다. 본 연구에서도 기내무균 발아된 석곡 유묘의 줄기를 절단하여 한천배지에서 배양할 경우 액아에서 식물체가 생성되었다 (Fig. 1C).

#### 석곡 유식물체 절편의 고체배지에서 배양

크기가 3 cm 정도인 석곡 유식물체의 줄기를 0.5 cm 정도로 잘라 MS배지에 식물생장조절제가 첨가되지 않은 배지 (hormone free 배지)와 0.5 mg/L NAA와 BA, 1 mg/L BA를 첨가한 배지에 배양한 결과는 Fig. 2와 같다. Hormone free 배지에서는 26.7%, 0.5 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA 배지에서 15.6%, 1.0 mg/L BA 배지에서 43.7%로 원시구경 형성과 신초 발생에 차이가 나타났다 (Fig. 2). 온대산 *Cymbidium*속의 유묘 배양에서는 생육한 신초를 이식하여 액아로부터 신아 출현을 조사한 결과, 품종에 따라 농도 차이는 있었으나 NAA와 BA 첨가배지에서 명배양신아 출현과 유묘증식이 양호하였다. 그러나 한란의 경우에는 BA를 처리하면 원시구경 증식, auxin을 처리하면 근경형성이 일어난다고 하였으며 (Chung et al. 1998a) *Cymbidium*은 BA처리에 의해 당년 구경과 구 구경으로부터 신초 발생이 촉진되어 개화수와 꽃대의 증가를 나타내었다 (Lee et al. 1998). 석곡은 줄기를 그대로 놓히거나 절단하여 육묘상에 삼목하는 방법으로 자연번식하는데 이때 50~500 ppm BA 침적처리는 발아율을 크게 향상시키는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 결과는 기내에서 발생된 유식물체를 절단한 후 BA가 첨가된 배지에서 배양하였을 때 원시구경 형성과 신초발생을 촉진하는 것과 일치하였다.

동일 배지내에 절단된 접종체의 수량에 따른 원시구경의 형성 정도를 조사한 결과는 Fig. 3에 나타낸 바와 같다. 배지간의 원시구경 형성율의 차이는 크지 않았지만, 동일 배지 내에서도 절단된 접종체를 한개, 두개, 그리고 세 개 이상으로 접종하였을 때 1개나 2개를 접종한 경우에는 고사하여 신초 발생과 원시구경 형성이 저조하였으나 세 개 이상인 경우에는 고사되지 않고 생존하여 원시구경 형성율이 95.2%로 신초 발생이 매우 높게 나타났다 (Fig. 3). 자연상태에서 난은 난균근과 공생관계로 난에 필요한 필수아미노산, 복합탄수화물 및 cellulose를 공생균과 작용하여 합성하고 이는 난 생육을 좌우하는 것으로 알려져 있다 (Harvais and Raitasak 1975). 따라서 난 자생지 토양에서 난균근 형성과 균구 형성을 관찰하였고 각각의 난과 난균근의 특이성이 보고되어 심비디움의 경

우 최소 2개 이상의 균근이 관여하는 것으로 보고된 바 있다 (Lee et al. 1997). 자연 상태에서 난 분주번식시 3축 이상을 한주로 번식하는 기존방식은 이와 같은 난과 난균의 상호관계를 고려한 방법으로 생각된다. 석곡의 치상체를 3개 이상 균락 접종하여 동일배지에서 높은 생존율과 원시구경 형성을 관찰하였다 (Fig. 3). 난 배양시 배양조직의 갈변을 막고 배지의 산화방지를 위하여 배지에 첨가되는 활성탄, ascorbic acid, citric acid는 배지에서 polyphenoloxidase의 활성을 억제하여 경정배양에 효과가 있었다 (Chung et al. 1998a). 본 실험에서 치상체를 1개 또는 2개 접종하였을 때 갈변되며 고사되는 이와 같은 현상은 배지 내 산화방지제를 첨가함으로써 개선할 수 있으리라고 생각된다.

바이오리액터 배양에 의한 석곡 식물체 대량생산

MS 액체배지를 이용하여 바이오리액터 배양에 의한 석곡 식물체의 대량생산의 결과는 Fig. 1에 제시한 바와 같다. 한천배지에서 3 cm 정도 자란 석곡 줄기는 여러 개의 액아를 가지고 있으므로 각각의 액아들로부터 새로운 식물체를 생산할 수 있다 (Fig. 1C). 한천배지에서 증식시키는 것과 같이 석곡 유식물체의 줄기 절편에 액아가 포함되도록 절단해서 바이오리액터에서 배양하면 각각의 액아 (액아 절편)에서 하나의 줄기가 나와 성장하게 된다.

바이오리액터에서 석곡 액아절편으로부터 식물체 생장은 배양초기에 MS배지 농도가 대체로 약한 배지에서 잘 성장하였다 (Fig. 1D and E). 특히 저농도 배지인 1/4 MS배지에서 잘 자랐고, 배지 농도가 약간 높은 1/2 MS배지에서는 생장이 현저하게 늦어졌다 (Fig. 4). 석곡 액아

절편을 1/4 MS배지 조건에서 배양하면 2~3주까지는 서서히 성장하다가 3주 이후부터 급격하게 성장하여 6주간 배양하면 생중량이 5배 정도 증식되었다 (Fig. 4).

식물 배양체를 액체배지가 들어있는 바이오리액터에서 배양할 때 고체배지와 같은 조건으로 배양하면 배양체의 생장이 고체배지에서와 같이 잘 이루어지지 않는다. 석곡 줄기배양의 경우에 그 원인을 검토한 결과 고체배지에서는 줄기의 절단된 부분으로 배지성분이 들어가지 않아 무기질 농도가 높은 MS배지를 사용해도 석곡 줄기는 잘 성장하지만, 액체배지의 경우 높은 농도의 배지성분이 줄기절편을 통해 내부로 들어가므로 세포들이 상해를 입히게 되어 배양하기가 힘들어진다. 따라서 액체배지는 줄기생장에 해가 없는 적정 농도의 액체배지를 제조해야만 배양이 가능한데 이는 배지농도를 낮추어주는 것이 가장 효율적이다. 바이오리액터내의 액체배지에 잠겨 배양되는 식물 줄기의 스트레스를 완화하기 위해 그물망 위에 배양체를 올려놓고 배양하거나 (Choi et al. 2008), 반복적으로 배지를 빼주고 넣어주는 반연속 배양법을 사용하였을 때 줄기배양에 효과가 있었다 (Akita and Takayama 1994). 그러나 본 실험에서는 액체배지에서 석곡의 액아를 연속배양 하여도 액아로부터 식물체가 발달하는데 별 문제가 없었다. 이는 액체배지의 농도를 낮게 하여 석곡 마디절편이 액체배지 스트레스를 최소화하였기 때문으로 생각된다.

바이오리액터 액체배지에서 성장한 석곡 유식물체의 형태는 한천배지에서 자란 석곡 유식물체와 비슷하였고, 수분 스트레스에 의한 형태적 변이도 발생하지 않았다 (Fig. 1 F and G). 따라서 바이오리액터에서 대량 증식한 유식물체를 화분에 심어 정상적인 석곡 식물체로 키울 수 있을 것으로 사료된다.

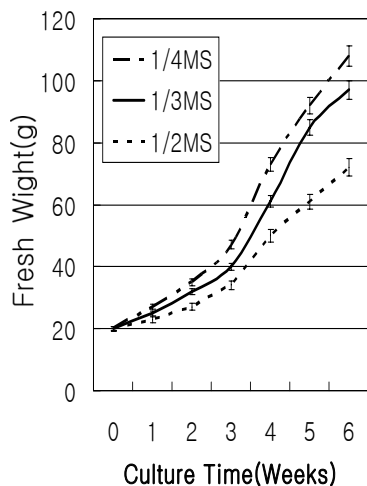


Fig. 4 Effect of medium strength on the growth of *Dendrobium moniliforme* shoots in 5 L bioreactor during six weeks of culture

적 요

무균 발아된 석곡 종자로부터 성장한 줄기의 액아절편을 절단하여 배양한 결과, 새로운 원시구경 (protocorm)이 형성되었으며 형성율은 1.0 mg/L BA가 첨가된 MS 기본 배지에서 43.7%로 나타났으며 배지에 치상한 접종체의 수를 1개, 2개, 3개 이상 균락 접종하였더니 1개, 2개 접종시보다 3개 이상 균락 접종하였을 때 생존율이 95.2%로 높게 나타났다.

바이오리액터에서 석곡 액아절편으로부터 식물체 생장은 저농도 배지인 1/4 MS배지에서 잘 자랐고, 배지 농도가 약간 높은 1/2 MS배지에서는 생장이 현저하게 늦어졌다. 1/4 MS배지 조건에서 6주간 배양하면 5배 정도로 유식물체 줄기를 증식시킬 수 있었다.

## 사 사

본 연구는 2009년 국립수목원 “국내·외 유용식물자원의 발굴 및 보존” 연구사업의 위탁연구 지원 및 “농촌진흥청 바이오그린21사업”의 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 EJ, Hahn EJ, Paek KY (2008) Plantlet growth, leaf stomata, and photosynthesis of grape rootstock '5BB' as affected by inoculum density in bioreactor cultures. *J Plant Biotechnol* 35:127-132
- Choi SO, Chung JD (1991) Effect of basal medium and pretreatments on seed germination of temperate *Cymbidium* species. *J Kor Soc Hort Sci* 32:525-532
- Chung JD, Lee JH, Jee SO, Kim CK (1998a) Effect of several additives on medium browning and mericlone growth of temperate *Cymbidium* species. *Kor J Hort Sci & Tech* 16:239-241
- Chung MY, Chung JD, Jee SO (1998b) Effect of culture media on asymbiotic seed germination and those seedling growth of *Calanthe discolor* and *Habenaria radiata*. *Kor J Plant Tissue Cult* 25:189-194
- Harvais G, Raitsakas A (1975) On the physiology of a fungus symbiotic with orchids. *Can J Bot* 53:144-155
- Hyun MR, Choi JY, Suh JN, So IS (1999) Studies on distributions and morphological characteristics of *Calanthe discolor*, *C. sieboldii*, and *C. bicolor* native to Cheju province. *Kor J Hort Sci & Tech* 17:497-499
- Jee SO, Chung JD, Park YK, Kim HY (2000) Effects of growth retardants on the morphogenesis and GA-like substance activity of *Bletilla striata* in vitro. *J Kor Soc Hort Sci* 41:409-414
- Kim JY, Lee JS (1992) Effect of cultural conditions on rhizome growth and organogenesis of *Cymbidium lancifolium* native to Korea in vitro. *J Kor Soc Hort Sci* 33:471-476
- Kim KH, Ko TS, Kim KH, Jin SG, Song CH, Lee WH, Lee JS (1990) Studies on the Aseptic multiplication in vitro by protocorm culture of *Aerides japonicum* and the plantlet-transplantation at native field. *Res Rep RDA* 32:42-49
- Kim KH, Ko TS, So IS (1996) Seed pod formation in cross- and self-pollinated *Cymbidium kanran* native to Cheju and the rhizome formation on various media. *J Kor Soc Hort Sci* 37:152-157
- Kim MS, Lee YR, Won JY, Kim JY, Kim BH, Eun JS (1998) Effects of days after pollination and media on asymbiotic germination in cross combination of *Cymbidium* spp. *Kor J Hort Sci & Tech* 16:236-238
- Kim SK, Kim JS, Park JH (2008) Aseptic germination of F1 hybrid seed by inter-species pollination of *Calanthe discolor* Lindl. and *C. discolor* for. *Sieboldii* (Decne.) Ohwi. *Kor J Plant Res* 21:341-435
- Knudson L (1946) A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. *Amer Orchid Soc Bull* 15:214-217
- Lee SS, Park SS, Kim TJ, Paek KY (1997) Effect of orchid habitat soil on growth of tissue cultured *Cymbidium kanran* and *C. goeringii*, and root infection of orchid mycorrhizal fungus. *J Kor Soc Hort Sci* 38:176-182
- Lee YR, Lee DW, Won JY, Kim MS, Kim JY, Lee JS (1998) Effects of BA on flowering of *Cymbidium encifolium* Tekkotsusosin. *Kor J Hort Sci & Tech* 16:531-532
- Lo SF, Mulabagal V, Chen CL, Kuo CL, Tsay HS (2004) Bioguided fractionation and isolation of free radical scavenging components from in vitro propagated Chinese medicinal plants *Dendrobium tosaense* Makino and *Dendrobium moniliforme* Sw. *J Agric Food Chem* 52:6916-6919
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497