

Bioreactor를 이용한 사계성 딸기 기내대량증식과 경제성

이종남¹ · 김혜진^{1*} · 김기덕¹ · 권영석¹ · 임주성¹ · 임학태² · 용영록³

¹국립식량과학원 고령지농업연구센터, ²강원대학교 생명건강공학전공, ³강릉원주대학교 식물생명과학과

In Vitro Mass Propagation and Economic Effects of Bioreactor Culture in Ever-bearing Strawberry 'Goha'

Jong Nam Lee¹, Hye Jin Kim^{1*}, Ki Deog Kim¹, Young Seok Kwon¹,
Ju Sung Im¹, Hak Tae Lim², and Young Rok Yeung³

¹Highland Agricultural Research Center, National Institute of Crop Science, Pyeongchang 232-955, Korea

²Department of Bio-Health Technology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

³Department of Plant Science, Kangneung-Wonju National University, Gangneung 210-702, Korea

Abstract. This study was conducted to compare various culture methods and evaluate economic feasibility of each method for mass propagation of new ever-bearing strawberry 'Goha'. Four different methods such as semi-solid culture, solid culture, liquid suspension culture and bioreactor culture were compared. The solid culture and bioreactor culture showed the shortest and longest root length, such as 3.6 cm and 8.3 cm, respectively. Fresh weights of plants cultured in bioreactor were 2,261 mg, which were heavier than those of cultures. Dry weights of plants cultured in bioreactor were the heavier compared to those in other cultures. The number of axillary bud developed in bioreactor was seven, but axillary bud was not developed in other cultures. Production cost through bioreactor culture was calculated to be 303 won per plant which was 542 won less than that of solid culture. As a result, we found that the bioreactor culture was the most cost effective culture method for in vitro mass propagation in new ever-bearing strawberry 'Goha'.

Additional key words: axillary bud, culture method, Goha, mass propagation, production cost

서 언

딸기(*Fragaria ananassa* Duch.)는 8배체의 영양번식작물이며 주로 육묘포장에서 모주로부터 발생한 자묘를 받아 증식한다. 대부분의 영양번식작물은 모주가 바이러스에 감염되었을 경우 자묘도 쉽게 감염되어 후대 생산력이 낮아지기 때문에 무병묘 생산을 위해 조직배양기술이 널리 이용되어 왔다(Monash 등, 2007). 과거에는 딸기 무병묘 생산을 위해 성장점을 조직배양한 후 고체 또는 반고체 배지로 배양하는 방법이 널리 이용되었다(Boxus, 1974, 1976; Boxus 등, 1977; Damiano, 1980). 그러나 고체배양 시 증식률이 1-2배로 낮아 상업적 재배에 필요한 많은 수의 무병묘를 조직배양을 통해 직접 당년에 공급하는 것은 불가능하기 때문에 ex vitro 상태에서 몇 년간 증식하여 보급한다. 그러나 ex vitro 상태

로의 증식은 넓은 온실이나 포장에 필요할 뿐만 아니라, 바이러스에 감염될 확률이 있어 딸기 무병묘의 대량증식을 위한 새로운 방법이 절실히 요구된다.

최근 미생물 및 동·식물의 대사물질생산과 같은 광범위한 분야에서 이용되고 있는 bioreactor는 식물체 대량생산을 위해 베고니아에서 처음 이용되었다(Ammirato, 1983; Takayama와 Misawa, 1981). 특히 공기 주입형 bioreactor가 개발됨으로써 백합, 딸기, 감자, *Spathiphyllum*, *Stevia* 등과 같은 영양번식작물(Akita, 2000; Akita와 Takayama, 1994a, 1994b; Takayama, 2002; Takayama 등, 1986; Takayama와 Akita, 1994, 1998), 약용 및 방향 식물(Bajaj, 1986, 1988) 등에 이용되었다.

Bioreactor배양은 고체와 반고체배양에 비해 배양용기 수가 적고, 노동력과 공간이 적게 소요된다는 장점이 있다. Takayama와 Akita(2005)는 식물체 증식에 있어서 bioreactor 기술의 실용적인 가능성을 제시하여 현재의 bioreactor배양 기

*Corresponding author: hejin79@empal.com

※ Received 23 July 2010; Accepted 18 August 2010.

술이 조직배양체의 산업화가 될 수 있는 기반을 마련하였다.

따라서 사계성 딸기 ‘고하’ 무병묘의 대량증식을 위한 bioreactor배양 효과와 경제성을 분석하고자 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용된 조직배양 시험 품종은 ‘고하’의 포복경의 경정으로 고설식 수경재배법으로 재배하였다. 본엽이 1매 전개된 포복경의 경정을 10cm 길이로 채취하여 흐르는 수돗물에 1시간 수세한 후 클린벤치 안에서 2% sodium hypochlorite solution에 침지하여 10분간 표면 살균한 후 멸균수로 3-4회 수세하였다. 표면 살균한 포복경의 경정으로부터 0.2-0.3mm 크기의 성장점을 적출하여 3g·L⁻¹ sucrose와 0.8g·L⁻¹ agar를 첨가한 MS배지(Murashige와 Skoog, 1962)에 치상 한 후 온도 26 ± 1°C, 일장 16/8(명/암) 배양조건에서 4주간 배양하였다. 딸기 무병묘의 대량증식 효율을 비교하기 위해 4주간 성장점 배양된 기내유식물체는 어린잎 1매를 남기고 잎과 뿌리를 모두 제거한 후 사용하였다. 시험구는 반고체, 고체, 현탁배양 및 bioreactor배양 등 4처리로 두었다. 배지는 MS 무기염에 30g·L⁻¹의 sucrose를 첨가하여 pH를 5.6으로 조정하였으며, 반고체 및 고체배양은 plant agar를 각각 4g·L⁻¹, 8g·L⁻¹ 첨가하였고, 현탁배양과 bioreactor배양은 첨가하지 않았다.

반고체 및 고체배양은 유리 배양병(250ml), 현탁배양은

삼각플라스크(300ml), bioreactor배양은 balloon type의 유리 bioreactor(5,000ml v/v, Scott Duran)를 사용하였으며, 반고체, 고체 및 현탁배양은 각 50ml씩, bioreactor배양은 2,500ml의 배지를 분주한 후 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 유식물체는 반고체, 고체 및 현탁배양은 2개씩, bioreactor배양은 30개를 치상하였다. 현탁배양은 20rpm의 속도로 회전하는 교반기에서 배양하였으며, bioreactor배양은 유식물체가 액체배지에 지속적으로 잠겨있는 방식인 ‘Immersion system’(Akita, 2008)을 이용하여 0.2vvm(air volume/medium volume/min)으로 공기를 지속적으로 주입하며 배양하였다. 생육조사는 배양 6주 후 각 10개체를 무작위로 추출하여 조사하였다.

경제성 분석을 위해 인건비는 2010년 농촌진흥청 무기제 약직 일일 급여 기준, 배지 및 시약의 가격은 ‘DUCHEFA’사, 배양용기 및 초자류 가격은 (주)관동과학사의 책정가를 기준으로 조사하였다. 배양용기의 감가상각비 기간은 10년으로 설정하였으며, 연간 1,000주 생산을 기준으로 가격을 책정하였다.

결과 및 고찰

배양방법에 따른 기내유식물체 생육 특성을 비교한 결과는 Table 1, Fig. 1과 같다. 각 배양방법 별 초장은 반고체배양 4.1cm, 고체배양 3.6cm, 현탁배양 3.8cm로 비슷하였으나, bioreactor배양에서 8.3cm로 가장 길었다. Bioreactor배

Table 1. Growth characteristics of in vitro plants according to culture method of new ever-bearing strawberry ‘Goha’.

Culture method	Shoot length (cm)	Number of leaves (ea)	Leaf area (cm ²)	Number of roots (ea)	Root length (cm)	Fresh weight (mg)	Dry weight (mg)	D/F rate (%)	Number of axillary shoots(ea)
Semi-solid	4.1 b ^z	9.8 b	14.7 b	14.1 b	6.3 a	1,557 b	165 b	10.6	0.4 b
Solid	3.6 b	10.5 b	12.2 bc	12.6 b	4.9 a	773 b	95 b	12.3	0.8 b
Suspension	3.8 b	10.1 b	8.5 c	12.6 b	1.9 b	1,825 b	189 b	10.4	1.2 b
Bioreactor	8.3 a	39.3 a	38.6 a	48.5 a	1.1 b	2,261 a	525 a	23.2	7.0 a

^zMean separation within column by DMRT at 1% level.

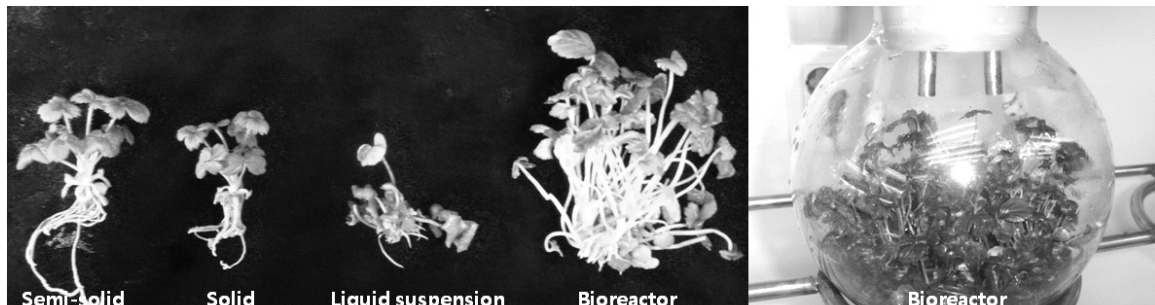


Fig. 1. Comparison of in vitro growth according to culture methods of new ever-bearing strawberry ‘Goha’.

양의 엽수와 엽면적은 각각 39.3개와 38.6cm²로 다른 배양 방법에 비해 생육이 좋았다. 관행고체배양의 생체중과 건물중은 각각 773mg, 95mg이었으나, bioreactor배양은 생체중이 2,261mg, 건물중이 525mg으로 관행배양에 비해 높은 생체중과 건물중을 나타냈고 D/F율도 23.2%로 다른 배양방법에 비해 높았다.

액체배지에서 식물체의 성장반응은 식물의 속과 종에 따라 다양하게 나타난다. Takayama와 Akita(2008)는 친수성 환경에서 잘 자라는 Begonia와 같은 식물은 반고체배양나 고체배양보다 현탁배양이나 bioreactor배양에서 생장률이 증가하는 반면, 소수성 환경에서 잘 자라는 딸기와 같은 식물은 반고체배양이나 고체배양에서 생장률이 증가한다고 보고하였다. 그러나 액체배지 내에 공기를 주입하면 소수성 식물종 또한 생장이 활발하게 증가하는 경향을 보이기도 한다(Takayama, 2000; Takayama와 Akita, 2008). 특히 딸기의 경우 공기주입형 bioreactor를 이용하면 액체배지에서도 식물체의 생장률과 최종 생장량이 증가되고 또한 공기주입량에 따라 생장이 비례적으로 변화한다는 보고 (Takayama와 Akita, 2008)와 같이 본 실험에서도 bioreactor배양 시 지속적으로 공기를 주입해 주었기 때문에 식물체의 지상부 생장량이 증가한 것으로 판단된다.

뿌리수는 bioreactor배양이 48.5개로 가장 많았으나, 뿌리 길이는 1.1cm로 가장 짧았다. Bioreactor배양에서 생산된 신초는 뿌리가 거의 없어도 토양으로 이식 후에 90%이상의

신초가 성공적으로 활착했다는 보고(Takayama와 Akita, 2008)가 있기 때문에 본 실험의 bioreactor배양에서 생산된 딸기 유식물체도 토양순화가 잘 될 것으로 예상된다. 그러나 순화 시 뿌리활착을 빠르게 하고 생존율을 높이기 위해서는 뿌리발달을 유도하는 방법을 모색해야 할 것으로 생각된다.

액아 발생은 반고체배양 0.4개, 고체배양 0.8개, 현탁배양 1.2개로 거의 발생하지 않았으나, bioreactor배양은 7.0개로 가장 많이 발생하였다(Table 1). Takayama와 Akita(2008)는 bioreactor배양의 경우 식물체가 항상 움직이므로 정단우세 현상이 타파되어 하나의 식물체에서 많은 수의 신초가 발생한다고 하였는데, 본 실험도 같은 결과를 보였다(Fig. 1). 딸기 기내배양 시 호르몬을 첨가하지 않고 고체배지에 배양할 경우, 증식효율이 매우 낮아 생산비용이 많이 드는 단점을 가지고 있어 딸기 bioreactor배양 시 대부분 호르몬을 첨가하여 다량의 액아발생을 유도하였다(Hanhineva와 Kärenlampi, 2007; Takayama 등, 1985). 그러나 딸기의 경우 배수성(2n = 8x = 56)이 높아 호르몬을 사용하면 변이개체가 발생할 확률이 높기 때문에 대량증식시 호르몬 사용에 유의해야 한다. 그러나 본 실험의 bioreactor배양은 호르몬을 첨가하지 않았음에도 불구하고 많은 수의 액아가 발생되어 타 배양방법에 비해 증식효율이 높게 나타났기 때문에(Table 1), 호르몬 첨가 없이도 딸기 무병묘의 급속대량증식이 가능할 것으로 판단되었다.

기본식물 1,000주 생산을 기준으로 하였을 때, 관행 고체

Table 2. Comparison of the specifications of ever-bearing strawberry propagation on bioreactor with liquid medium and in culture bottle with solid medium (one thousand production).

Items	Bioreactor		Culture bottle	
	Requirements	Price (won)	Requirements	Price (won)
Meristem culture	No. of meristem	125 ea	556ea	-
	Medium volume	1.25 L	5.56 L	33,194
	No. of vessel ^w	125 ea	556ea	44,952
	Labor cost ^z	-	63,000	280,224
Sub-culture	Propagation rate	8.0	1.8	-
	Inocula ^y	125(30) ea	556(1) ea	-
	Vessel volume	5,000 ml	250 ml	-
	No. of vessel ^w	4 ea	556ea	51,986
	Medium volume	10.4 L	16.6 L	99,446
	Labor cost ^x	-	82,212	335,570
Total		302,489	845,345	

^zLabor cost (40,300 won/day/person) included meristem extraction (80 ea/day/person) cost and medium making (300 ea of test-tube/day/person) cost.

^yInocula (number of plantlets per vessel).

^xLabor cost included medium making cost (bioreactor-10L/day/person; culture bottle-6L/day/person) and operation cost (bioreactor-4 ea of vessel/day/person; culture bottle-100 ea of vessel/day/person).

^wVessel price was calculated on the basis of average 10-year-use.

배양의 증식률은 약 1.8배이고, bioreactor배양의 증식률은 약 8.0배로 고체배양에 비해 증식률이 약 4배에 달하며, 이에 따라 증식에 필요한 성장점도 bioreactor배양이 126개로 관행 고체배양의 556개에 비해 약 1/4 수준으로 적게 필요한 것으로 나타났다(Table 2). 또한 각 배양방법에 따라 치상 식물체수가 달라 관행 고체배양은 배양용기당 1주를 치상하기 때문에 배양용기는 556개, 배지는 16.6L가 소요되며, bioreactor배양은 용기당 30개의 유식물체를 치상할 수 있기 때문에 배양용기는 4개가 필요하며, 10.4L의 배지가 소요되었다(Table 2).

경제성 분석결과 무병주 1,000주를 생산할 때, 관행 고체배양은 845,345원으로 bioreactor배양의 302,489원보다 2.08배 더 많이 소요되었다. 따라서 bioreactor배양은 관행고체배양에 비해 무병주 생산 비용을 약 1/3 수준으로 낮출 수 있었다. 이와 같은 결과는 Takayama와 Akita(2005)의 실험에서 bioreactor배양에 의한 유식물체의 대량증식효율이 현탁배양이나 고체배양에 비해 매우 높아 노동비용도 약 1/12.5로 줄일 수 있다는 분석결과와 일치하였다.

따라서 딸기 조직배양에 bioreactor배양방법을 이용하면 노동력 절감, 공간이용 극대화 및 생산비용을 낮춰 대량의 조직배양묘 생산을 가능케 할 것으로 판단된다. 그러나 앞으로 딸기 조직배양묘의 안정적인 대량생산을 위해 bioreactor배양 조건 및 방법을 구명하는 실험이 지속적으로 이뤄져야 할 것으로 생각된다.

초 록

본 실험은 여름딸기 무병묘 대량증식을 위해 bioreactor배양의 증식 및 경제성 효과를 비교하고자 실시하였다. 배양 방법은 반고체, 고체, 현탁배양 및 bioreactor 배양 등 4가지 방법을 이용하였다. 배양 6주 후, 식물체의 초장은 고체배양이 3.6cm로 가장 짧았으며, bioreactor 배양이 8.3cm로 가장 길었다. 생체중과 건물중은 bioreactor 배양이 2,261mg과 525mg으로 다른 배양방법에 비하여 가장 무거웠다. 액아는 반고체, 고체 및 현탁배양은 거의 발생하지 않았으나, bioreactor 배양은 주당 7개의 액아가 발생하였다. 경제성 분석 결과 기본식물 생산 시 bioreactor배양이 303원/주으로 고체배양의 845원/주보다 542원/주 적었다. 따라서 딸기 무병묘 생산 시 bioreactor배양이 대량증식 및 경제적인 면에서 효율적이었다.

추가 주요어 : 액아, 배양방법, 고품, 대량증식, 생산비

- Akita, M. 2000. Bioreactor culture of plant organs In: Spier, R.E.; B. Griffiths and A.H. Scragg (Eds.) The Encyclopedia of Cell Technology. John Wiley & Sons, Inc., New York, p.129-138.
- Akita, M. and S. Takayama. 1994a. Induction and development of potato tubers in a jar fermentor. *Plant Cell Tissue 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.
- Ammirato, P. 1983. Handbook of plant cell cultures. p. 82-123 In: D.A. Evans., W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada (eds.). Embryogenesis. Mac Millan, New York.
- Bajaj, Y.P.S. 1986. Biotechnology in Agriculture and Forestry. p. 1-2. In: Y.P.S. Bajaj. (ed.). Biotechnology of tree improvement for rapid propagation and biomass energy production. Springer, Berlin Heidelberg, New York.
- Bajaj, Y.P.S., M. Furmanova, and O. Olszowska. 1988. Biotechnology in agriculture and forestry. p. 60-103. In: Y.P.S. Bajaj. (ed.). Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. Springer, Berlin, Heidelberg, New York..
- Boxus, P.H. 1974. The production of strawberry plants by in vitro micropropagation. *J. Hort. Sci.* 49:209-210.
- Boxus, P.H. 1976. Rapid production of virus-free strawberry by 'in vitro' culture. *Acta Hort.* 66:35-38.
- Boxus, P.H., M. Quoirin, and J.M. Laine. 1977. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. p. 130-143. In: J. Reinert. and Y.P.S. Bajaj (eds.). Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Damiano, C. 1980. Proceedings of the conference on nursery production of fruit plants through tissue culture. Applications and feasibility. p. 93-101. In: Planning and building a tissue culture laboratory. USDA.
- Hanhineva, K. and S.O. Kärenlampi. 2007. Production of transgenic strawberries by temporary immersion bioreactor system and verification by TAIL-PCR. *BMC Biotechnology.* 7:11.
- Manosh, K.B., M. Hossain, and R. Islam. 2007. Virus free plantlets production of strawberry through meristem culture. *World Journal of Agricultural Sciences.* 3:757-763.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-479.
- Takayama, S. 2000. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol.17. p. 495-515. In: Y.P.S. Bajaj. (ed.). Mass propagation of plants through shake and bioreactor culture technique. Springer-Verlag, Berlin.
- 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, p. 60-62.
- Takayama, S. and M. Akita. 1994. The types of bioreactors used for shoots and embryos. *Plant Cell Tissue 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. 2005. Liquid culture systems for in vitro plant propagation. p. 61-78. In: A.K. Hvoslef-Eide and W. Preil (eds). Practical aspects of bioreactor application in mass propagation of plants. Springer. Netherlands.
- Takayama, S. and M. Akita. 2008. Plant tissue culture engineering. p. 83-100. In: S. Dutta Gupta and Y. Ibaraki (eds.). Bio-engineering aspects of bioreactor application in plant propagation. Springer-Verlag, Berlin.
- Takayama, S., T. Amo, M. Fukano, K. Nakazawa, and K. Oosawa. 1985. Mass propagation of strawberries by jar fermentor culture. (2) Studies on the optimum conditions in a liquid medium and the establishment of mass propagation scheme using a jar fermentor. Abst. 1985 Spring meeting of Japanese society for horticultural science. Jpn. Soc. Hort. Sci. Tokyo. p. 210-221.
- Takayama, S. and M. Misawa. 1981. Mass propagation of *Begonia hiemalis* plantlets by shake culture. Plant Cell Physiol. 22:461-468.
- Takayama, S., Y. Arima, and M. Akita. 1986. Mass propagation of plants by fermentor culture techniques. In: Abst. 6th International congress of plant tissue and cell culture, Int. Assoc. Plant Tissue Cult. Univ. of Minnesota. p. 449.