

두릅나무 체세포배 유래 소식물체의 순화에 미치는 배양토 및 공급액의 효과

문흥규* · 배찬호¹ · 김용욱 · 이재순 · 이재선¹
임업연구원 생물공학과, ¹강원대학교 산림자원학과

Effect of Artificial Soils and Aqueous Solutions for Plantlet Acclimatization of Somatic Embryos of *Aralia elata*

MOON, Heung Kyu* · BAE, Chan Ho¹ · KIM, Yong Wook · LEE, Jae Soon · YI, Jae Seon¹

Biotechnology Div., Korea Forest Research Institute (KFRI), Suwon, Omokdong 44-3, Kyonggido, 441-350, Korea

¹Division of Forest Resources, College of Forest Sciences, Kangwon National University, Chunchon, 200-701, Korea

ABSTRACT In order to develop effective acclimatization methods for *Aralia elata* plantlets regenerated from somatic embryos, various acclimatizing conditions were compared regarding both survival rate and growth of the plantlets. The plantlets were transplanted into plastic boxes containing artificial soil in the presence of either several levels of MS liquid media, distilled water, 2% sucrose or 0.1% hyponex solution. They were then cultured by spraying of distilled water twice a week and maintained in the normal tissue culture room. Perlite was proved to be better than vermiculite on survival rate and growth of the plantlets. As the size of perlite (larger than 0.2 cm in diameter) increased, both the survival rate and growth of the plantlets improved. Among the various MS liquid media and different aqueous solutions tested, distilled water appeared to result in the best survival rate and growth. MS media were also effective in increasing survival rate and supporting growth when diluted to 1/4 and/or 1/8. The acclimatized plantlets could be transplanted directly onto the nursery bed and grown normally. The above results suggest that plantlets regenerated from somatic embryos of *Aralia elata* be effectively acclimatized using a plastic box containing perlite with distilled water treatment.

Key words: Distilled water, diluted MS salt solution, plastic box, artificial soil

서 론

조직배양 기술을 이용한 묘목생산은 배양시설의 설비에 많은 비용이 필요하고 노동집약적인 기술로서 여러 단계의 배양과정을 거치기 때문에 실생번식이나 접삽목 등 전통적인 방법으로 육성하는 묘목보다 일반적으로 가격이 비싸다 (Pierik 1987). 따라서 조직배양 과정을 성력화하고 증식된 기내묘를 효율적으로 순화시키는 방법은 상업적인 측면이나 실용화 의미에서 중요하다 (Driver and Suttle 1987; Wilson 1995; George 1996).

기내 배양과정을 단순화시키는 방법으로는 1차 배양으로 줄기 및 발근을 동시에 유도하는 방법 (Herrera et al. 1990), 줄기의 기외 삽목법 (Kwon et al. 1990), peat plug나 plug를 사용하여 기내줄기나 체세포배를 이식시키는 방법 등 (Moon et al. 1993; McElroy and Brown 1992)이 있으며, 최근에는 생물반응기의 이용, 체세포배의 인공종자화 및 로봇시스템에 의한 자동화 system이 도입되고 있다 (Aitken-Christie et al. 1995; Wilson 1995).

두릅나무는 여러 절편을 사용하여 체세포배 유도를 통한 묘목의 대량생산이 가능한 수종으로 보고되고 있으나 (Jhang et al. 1994; Park et al. 1994; Moon and Youn 1999; Moon et al. 2001) 캘러스 유도에서 식물체의 재생까지 여러 단계의 계대배양 과정이 필요하고 이에 따라 묘목의 생산까지 최소

*Corresponding author. Tel 031-290-1199

E-mail: jesusmhk@hanmail.net

수개월이 소요되고 있다. 따라서 보다 실용적인 번식을 위해서는 계대배양 과정의 단축 혹은 재분화 식물체의 효율적인 순화 기술이 요구되고 있다. 본 연구는 두릅나무의 체세포배유도 및 식물체 생산에 있어 배양기간의 단축 및 새로운 순화기술의 개발을 목적으로 수행되었다.

재료 및 방법

식물체

본 시험의 식물재료는 체세포배 유도를 통해 재분화된 두릅나무의 어린 식물체로 (Moon et al. 2001) 자엽이 2~4개로 전개되고, 배축의 길이가 1.5 cm 정도이며, 뿌리는 1~3 cm로 자란 것을 재료로 사용하였다.

인공배양토 효과

순화에 미치는 인공배양토의 효과를 조사하기 위해 vermiculite와 입자 크기가 다른 세 종류의 perlite (Table 1)를 반투명한 플라스틱 용기에 넣어 시험하였다. 플라스틱 용기는 5.5 (H)×17.5 (W)×17.5 (L) cm 크기로 일반 슈퍼에서 판매되는 것을 구입하여 사용하였다. 상토는 용기 당 90 g씩 넣고 2차 증류수를 150 ml씩 주입하여 혼합한 다음 사용하였다. 식물체는 용기 당 50개씩 상 전체에 골고루 배치되도록 이식하였으며 이식시에는 건조하지 않도록 2차 증류수로 분무하였다. 이식 후 용기를 유니랩으로 완전히 봉한 다음 조직배양실 (온도 24±2°C, 1일 16시간 일장)에서 순화하였다. 이식 후 매주 2회씩 유니랩을 열어 2차 증류수를 분무해 주었고, 4주간 배양한 후에 생존율 및 성장상태를 조사했다. 처리 당 반복은 플라스틱 3개로 3반복하였다.

액체배지 처리효과

실험 1과 동일한 용기에 perlite (입자 크기 0.2~0.4 cm)을 상토로 MS (Murashige and Skoog 1962) 액체배지 등 7가지 수용액을 처리하여 활착률 및 성장 정도를 조사하였다 (Table 2). 배지는 MS 기본배지 (sucrose 무처리) 혹은 염류의 농도를 1/2, 1/4 및 1/8 낮추어 처리하였고, 2% sucrose 수용액, 2차 증류수 및 0.1% 하이포넥스 수용액을 각각 처리하여 비교하였다. 용기당 상토는 90 g, 액체배지는 150 ml씩 주입하고 혼합 후 사용하였다. 식물체의 이식 및 배양방법은 실험 1의 방법과 동일하게 실시하였고, 용기당 50개씩 처리당 3반복으로 시험하였다.

결과 및 고찰

인공배양토 효과

배양용기에서 꺼낸 어린 식물체 (Figure 1 A)는 쉽게 건조되었으나 증류수로 분무하며 이식하였기 때문에 건조로 인한 피해는 나타나지 않았다. 배양 후 2주까지는 외견상 식물체가 모두 건전하게 생존하였고 잎의 위조 등 피해가 관찰되지 않았으나 배양 후 3주부터는 일부 잎이 황화되거나 괴사되는 현상이 나타났다. 식물체에 따라서는 곰팡이가 발생하여 심한 경우에는 고사되기도 하였다 (결과 생략). 4주간의 배양 결과 상태에 따라서 생존 및 성장에 차이가 크게 나타났다. 전반적으로 perlite를 사용한 경우 vermiculite보다 2배 이상 활착

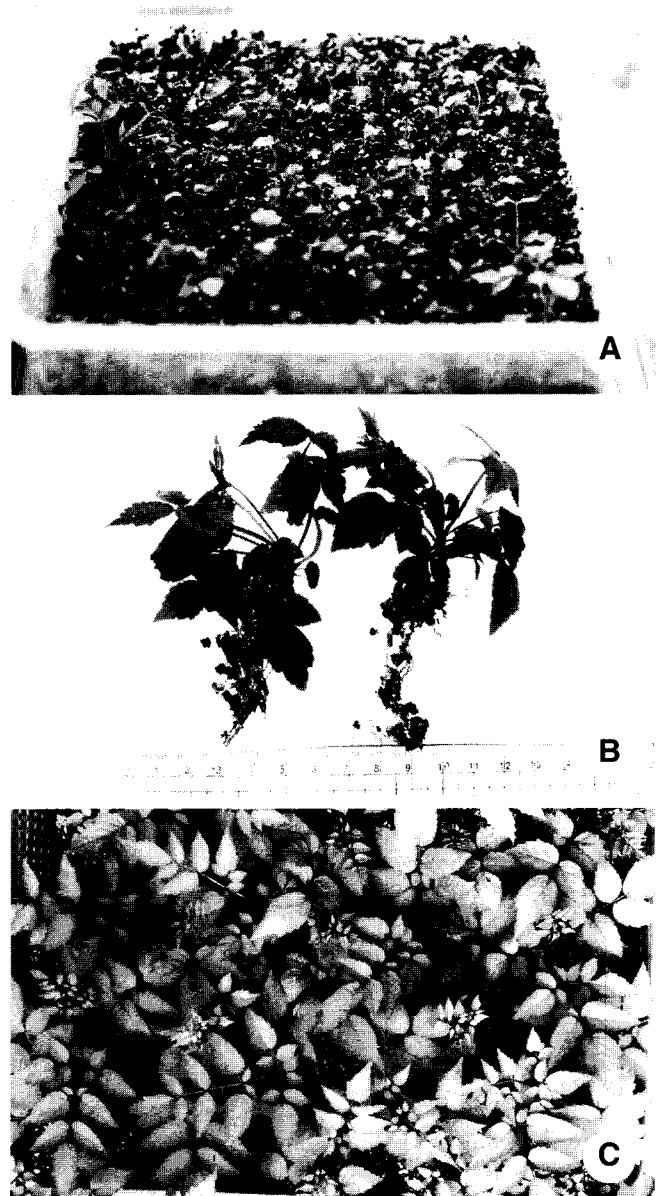


Figure 1. Acclimatizing plantlets regenerated from somatic embryos of *Aralia elata*. A : Small plantlets transplanted in plastic box, B : Four weeks old acclimatized plantlets, C : Plantlets growing normally in pots after transplanting outside.

Table 1. Effect of different artificial soils on survival and growth of plantlets regenerated from somatic embryos of *Aralia elata* in plastic box after 4 weeks *ex vitro* culture.

Artificial soil ^a	No. of transplanted plants	No. of survived plants (%)	Plant height (cm)
Vermiculite	150	66 (44.0)	1.2~1.5
Perlite (0.1~0.2cm)	150	126 (84.0)	2.0~3.0
Perlite (0.2~0.4cm)	150	141 (94.0)	2.0~3.0
Perlite (0.4~0.6cm)	150	144 (96.0)	2.0~4.0

^aDistilled water was sprayed twice a week.

이 좋게 나타났으며 입자의 크기가 클수록 양호하여 입자 크기가 0.1~0.2 cm는 84%, 0.2~0.4 cm는 94%, 그리고 0.4~0.6 cm에서는 96%로 높은 활착률을 나타냈다 (Table 1). 이 같은 결과는 입자가 큰 상토의 통기성이 양호하여 뿌리의 호흡 및 생장이 양호하고 그 결과 활착에 유리하도록 작용한 것으로 추정되었다. 한편 vermiculite 상토에서는 생존율이 평균 44%로 매우 저조할 뿐만 아니라 식물체의 생육도 매우 저조한 것으로 나타났다. 이것은 입자의 크기가 작고 높은 보습력을 지닌 vermiculite의 특성으로 인해 오히려 뿌리의 호흡과 생장이 방해받았기 때문으로 추정되었다.

4주 후에 용기 내에서 순화된 식물체는 뿌리의 발달이 양호하였고 (Figure 1 B) 식물체에 따라서는 용기의 밑바닥까지 길게 자라는 뿌리가 관찰되었다. 이렇게 순화된 식물체는 뿌리가 배양토를 지탱하여 운반하기에 용이하였고, 더 이상의 순화가 필요없이 실외 토양으로의 이식이 가능하였다. 이상의 결과는 두릅나무의 체세포배로부터 재분화된 식물체는 자엽이 2~4개로 전개되고 배축의 길이가 1.5 cm 정도만 되면 토양 이식 후 순화가 가능하다는 것을 보여주는 것으로 자동화된 fogging system의 온실을 사용한다면 순화의 효율성을 더욱 높힐 수 있을 것으로 기대되었다.

액체배지 처리 효과

MS 액체배지 및 기타 수용액의 처리는 두릅나무 기내묘의 활착에 있어 많은 차이를 나타냈다. MS 기본배지 및 1/2 MS 배지에서는 저조한 생존율을 보인 반면 1/4 및 1/8 MS 배지는 높은 생존율을 보였다 (Table 2). 생장은 MS 기본배지에서 다소 저조한 것으로 나타났으나 기타 농도에서는 처리에 따른 차이를 보이지 않았다. 반면 1/4 혹은 1/8 MS 배지로 처리한 경우 일부 잎이 황화되었다. 가장 높은 생존율은 2차 증류수 처리로 96%의 생존율을 보였다. 증류수의 처리는 다른 처리에 비하여 생장은 비교적 저조한 반면 (Table 2) 배양 6주 후까지도 잎의 황화 없이 생존하였다 (결과 생략). 2% sucrose 혹은 0.1% hyponex 수용액의 처리는 각각 76%,

Table 2. Effect of various aqueous solutions on survival and growth of plantlets regenerated from somatic embryos of *Aralia elata* in plastic boxes after 4 weeks *ex vitro* culture.

Treatment ^a	No. of transplanted plants	No. of survived plants (%)	Plant height (cm)
MS medium	150	66 (44.0)	1.5~3.0
1/2 MS medium	150	81 (54.0)	2.0~4.0
1/4 MS medium	150	138 (92.0)	2.0~4.0
1/8 MS medium	150	138 (92.0)	2.0~4.0
2% sucrose solution	150	114 (76.0)	1.5~3.0
Distilled water	150	144 (96.0)	1.5~3.0
0.1% hyponex solution	150	126 (84.0)	2.0~4.0

^aAqueous solutions were sprayed twice a week

84%의 활착률을 나타내 MS 기본 액체배지보다는 양호한 결과를 보였지만 다른 처리구에 비하여 효과가 뚜렷하지 않았다. 한편 MS 기본배지, 1/2 MS 배지, 2% sucrose 및 0.1% hyponex 용액을 처리하였을 때는 곰팡이가 자주 발생하였으며 곰팡이가 발생하면 심한 경우 식물체가 고사되어 주의가 필요하였다. 증류수 처리나 1/4 혹은 1/8 MS 배지의 처리는 곰팡이가 거의 발생하지 않았다. 이상의 결과는 두릅나무의 체세포배 유래 기내묘의 순화는 입자가 큰 perlite를 사용하고 증류수나 염류를 낮춘 MS 배지를 처리하면 1~2 cm의 작은 식물체라도 효과적인 순화가 가능하다는 것을 보여 주었다.

일반적으로 조직배양묘의 순화과정에는 상대습도의 조절, 고농도 이산화탄소의 유지, 광원의 조절이 요구되며 이러한 조건을 충족시키기 위해서 건조제의 처리, 적절한 배양용기의 선택, 상대습도 감소를 위한 냉각 system의 사용, 통풍의 조절, 투과성 배양용기의 사용이 언급되고 있다 (Kirdmanee et al. 1995; Ziv 1995). 이러한 처리는 결국 기내식물체를 광독립배양체 (photoautotrophic culture)로 만들기 위한 것인데 (Kozai 1991), Ziv는 (1992) 기내식물체 순화의 가장 좋은 방법으로 liquid medium-plug system을 제시한바 있다. 그러나 두릅나무의 순화는 본 실험과 같이 적절한 배양토의 사용과 액체배지 특히 증류수만을 처리하여 효과적인 순화가 가능하고, 용기에서 순화된 묘목은 직접 실외의 토양으로 이식이 가능하였기 때문에 (Figure 1 C), 상기에서 제시한 방법보다 훨씬 간편하다고 생각되었다. 더욱이 플라스틱 용기는 일반 슈퍼에서 쉽게 구입할 수 있고, 가격이 저렴하며, 순화 후에는 뚜껑을 덮어 운반할 수 있기 때문에 대량으로 운송하기에 유리한 장점도 있다. 또한 이 방법은 식물체의 크기나 특성을 고려하여 다양한 용기를 사용할 수 있으므로 효율성이 클 것으로도 기대되었다. 본 시험으로 두릅나무의 기내묘를 순화시킬 경우 기존의 방법에 비하여 최소한 3~5주의 배양 기간을 단축시킬 수 있는 것으로 나타나 비용절감은 물론 육묘 기간

단축을 통한 실용화에도 유용할 것으로 생각되었다. 그러나 이식 및 순화과정에서 식물체의 건조에 유의해야 하고, 어린 식물체의 뿌리집에 주의가 필요하며, 뿌리를 내리기 전까지는 용기내의 배양토가 쉽게 흩어지기 때문에 조심해서 상자를 다룰 필요가 있다. 더욱이 한사람의 이식 분수는 1일 약 1,500개 정도로 나타나 보다 효율성을 높이기 위해서는 이식 공정 작업의 기술개발이 필요하고 fogging system이 갖추어진 온실에서 직접 순화시키는 방법의 개발이 필요하다.

적 요

두릅나무의 체세포배 유래 소식물체의 효과적인 순화 방법을 개발하고자 플라스틱 용기를 사용 4가지 인공배양토 및 MS 액체배지 등 7가지 수용액 처리를 통해 활착률 및 생장을 조사하였다. 상토는 perlite가 vermiculite보다 활착 및 생장에 양호하였고, 입자가 클수록 활착률 및 생장이 좋았다. 액체배지는 2차 증류수 처리가 가장 양호하여 96%의 활착률을 나타냈으며, 염류농도를 1/4 및 1/8로 낮춘 MS 배지는 각각 92%의 활착률을 보인 반면 기본배지 및 1/2 MS 배지는 활착률이 저조하였다. 한편 0.1% hyponex와 2% sucrose 처리는 84% 및 76%의 활착률을 각각 나타냈다. 결론적으로 두릅나무의 체세포배 유래 소식물체의 순화는 입자가 큰 perlite를 사용하고 증류수 처리 혹은 염류 농도를 낮춘 MS 배지 처리로 효과적인 순화가 가능함을 보여주었다.

인용문헌

- Aitken-Christie J, T Kozai, S Takayama (1995) Automation in plant tissue culture - general introduction and overview. In: J Aitken-Christie, T. Kozai and M. Lila Smith (eds.), Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture, pp 1-8, Kluwer Academic Pub
- Driver JA, GRL Suttle (1987) Nursery handling of propagules. In: Bonga and Durzan (eds.), Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol 2, pp 320-335, Martinus Nijhoff Pub
- George EF (1996) Plant propagation by tissue culture. Part 2, In Practice. Exegetics Limited
- Herrera MT, M Cacho, MP Corchete, J Fernandez-Tarrago (1990) One step shoot tip multiplication and rooting of *Digitalis thapsi* L. Plant Cell Tiss Org Cult 22:179-182
- Jhang HH, Park CH, Lee YS, Shin YB (1994) Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of *Aralia elata*. Kor J Plant Tiss Cult 21:167-171
- Kwon YJ, Youn Y, Lee SK, Hyun YI, Lee JJ, Lee MH (1990) *In vivo* rooting of shoots propagated by bud culture of *Juglans*. Res Rep Inst For Gen Kor 26:63-68
- Kirdmanee C, Y Kitaya, Y Kozai (1995) Effects of CO₂ enrichment and supporting material on growth, photosynthesis and water potential of *Eucalyptus* shoots/plantlets cultured photoautotrophically *in vitro*. Environ Cont Biol 33:133-140
- Kozai T (1991) Photoautotrophic micropropagation. In Vitro Cell Dev Biol 27:47-51
- McElroy AR, DCW Brown (1992) A transplant plug technique for production of alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants from somatic embryos. Can J Plant Sci 72:483-485
- Moon HK, Hong YP, Kim YW, Lee JS (2001) Genotype effect on somatic embryogenesis and plant regeneration of 15 *Aralia elata*. Kor J Plant Tiss Cult 28:129-134
- Moon HK, Youn Y (1999) Somatic embryogenesis from winter buds of 10-year-old *Aralia elata*. In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Vol 5, pp 129-134, Kluwer Academic Pub
- Moon HK, Youn Y, Son SH, Lee SK, Yi JS (1993) *In vitro* shoot proliferation by pulse treatment from shoot cultures of *Q. acutissima* and *ex vitro* root induction using peat plug systems in *Quercus* spp. J Kor For Soc 82:221-226
- Murashige T, F Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15:473-479
- Park CH, Lee YS, Jhang HH, Kim NS, Shin YB (1994) Effects of media and plant growth regulators on germination of somatic embryos of *Aralia elata* S. Kor J Med Crop Sci 2:241-245
- Pierik RLM (1987) *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Pub, Dordrecht
- Wilson K (1995) Commercialization of tissue culture and automated systems. In: J Aitken-Christie, T. Kozai and M. Lila Smith (eds.), Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture, pp 273-300, Kluwer Academic Pub
- Ziv M (1992) Micropropagation of *Cucumis*. In: YPS Bajaj (ed), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 19, pp 72-90, Springer Verlag, Berlin
- Ziv M (1995) *In vitro* acclimatization. In: J Aitken-Christie, T. Kozai and M. Lila Smith (eds.), Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture, pp 493-516, Kluwer Academic Pub