藥作誌(Korean J. Medicinal Crop Sci.) 10(3) : 217-221(2002)

가시오갈피의 수집종과 배양조직에 따른 체세포배발생 및 재분화 식물체의 순화

이성호* · 유창연*†

* 강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부

Effect of Genotype and Explant on Somatic Embryogenesis and Acclimatization of *Acanthopanax senticosus*

Cheng Hao Li* and Chang Yeon Yu*†

* *Div. of Applied Plant Sci., Kangwon National University, Chunchon, 200-701, Korea*

ABSTRACT : Callus induction and embryogenesis were studied in three different genotypes of *Acanthopanax senticosus*, to develop a protocol for somatic embryogenesis and acclimatization. Young leaf, stem, node, petiole, peduncle, flower and root explants were collected from 3-year old trees of *A. senticosus* accessions (Korea, Russia and Japan). Callus was obtained from all cultured explants but showed the higher rate of callus formation in flower cultured. For the three *A. senticosus* accessions, callus was well formd on MS media containing 2mg/ *l* of 2,4-D and 2mg/ *l* of TDZ, 4mg/ *l* of 2,4-D and 1mg/ *l* of TDZ than other treatments. For three *A. senticosus* accessions, when callus transferred to MS medium with 2,4-D, embryogenic cell formed. For *A. senticosus* accession Korea, embryogenic cells were obtained on callus induced from petiole, stem, node and root explants, and induction rate was lower than 3%. 200mg of embryogenic callus was transferred to MS free liquid medium and somatic embryos of heart stage were obtained after 45days of culture. When somatic embryo of germination stage were transferred to solid medium, most of the embryos were regenerated into plantlets on 1/4 MS medium. Normal plants with both shoots and roots were transferred to greenhouse soil and were successfully acclimatized.

Key words : *Acanthopanax senticosus*, callus induction, somatic embryo

서 언

가시오갈피(*Acanthopanax senticosus* Max.)는 오갈피과에 속하는 다년생관목으로 중국 동북부, 일본 북해도, 러시아 사할린과 한국 백두대간의 고산지역에 소규모 자생한다. 예로부터 가시오갈피의 뿌리와 줄기의 껍질을 약으로 사용하여 왔으며 최근 그 수요가 늘어나면서 자생 가시오갈피나무는 무차별 남획으로 인해 멸종위기에 처해 있다. 가시오갈피는 변이가 많이 발생하며 자생지에 따라 유연관계(Kim 등, 1998; Yu 등, 2000)와 성분함량이 다르며 이러한 성분의 차이는 자생지의 환경조건과 더불어 유전적 배경에 기인한다고 한다(Ahn 등, 2000). 특히 지표성분인 Eleutheroside E 함량이 한국산이 중국이나 일본산보다 월등히 높다(Wagner 등, 1982). 그러므로 가시오갈피의 자원 확보를 위해서는 자생지별로 성분 및 약리 효능의 상호 비교 검토와 그중 개발가치가 큰 우수종을 선발하여 대량 생산을 위한 재배법의 개발이 필요하다. 가시오갈피는 삽목번식이 어렵

† Corresponding author (Phone) : Chang Yeon Yu, 033-250-6411, E-mail : cyyu@kangwon.ac.kr
Received 25 July 2002 / Accepted 22 August 2002

고 종자는 미숙배상태로 발아하기까지 오랜기간의 층적 저장과 후숙이 필요하다. 체세포배발생을 이용한 식물체 생산기술은 식물체의 대량생산에 다른 배양방법보다 효율적인 번식법으로 인식되고 있다. 가시오갈피의 조직배양에 관한 연구는 접합자배를 이용한 여러 결과가 발표된 바 있으나(Gui 등, 1991; Yu 등,1997; Choi 등, 1999) 가시오갈피의 결실율이 낮고 특히 한국자생 가시오갈피는 거의 종자를 맺지 않아(Park 등, 1995) 새로운 기내배양법의 개발이 필요하다. 본 실험은 우량한 가시오갈피의 효율적인 번식기술을 목적으로 한국산 가시오갈피를 중심으로 한국, 러시아, 일본 자생지별 가시오갈피의 잎, 줄기, 액아, 뿌리, 화기 등 여러 조직으로부터의 캘러스형성 및 체세포배발생을 통한 식물체 재생을 시도하였다.

재료 및 방법

배양재료

강원대학교 실험농장에서 재배중인 3년생 한국, 러시아 시베리아와 일본 북해도산 가시오갈피의 신초 정단부, 어린 잎, 뿌리, 개화전 꽃봉오리 등을 채취하여 배양재료로 이용하였다. 잎은 엽육과 엽병으로 구분하여 따로 배양하고 신초는 줄기와 액아를 포함한 마디, 꽃은 꽃봉오리와 꽃대로 구분하여 치상하였다. 재료들을 먼저 분리하여 흐르는 수돗물로 3~5시간 수세한 후 무균상에서 70% 에탄올에 30초, 0.5% NaOCl에 10분 표면살균하고 멸균수로 5회 수세하였다. 절편체는 5mm크기로 잘라 10ml배지가 들어있는 test tube에 치상하였고 처리당 20개로 3반복으로 배양하였다.

캘러스 및 배발생캘러스유도

캘러스 유도배지는 MS기본배지에 3% sucrose, 0.25% gelrite, 2,4-D 2㎎/ℓ와 TDZ 1, 2㎎/ℓ 혹은 IBA 10㎎/ℓ와 TDZ 0.01, 10㎎/ℓ를 함께 첨가한 배지를 사용하였다. 캘러스 형성빈도는 배양 4주 경과 후 조사하였다. 체세포배 유도를 위하여 캘러스를 동일한 캘러스유도 배지, 또는 2,4-D 0.1, 1, 2, 4 ㎎/ℓ를 첨가한 MS배지에 옮겨 암배양과 명배양으로 구분하여 배양하였으며 처리당 100개로 3반복으로 하였다.

액체배양에 의한 체세포배 생산

유도된 배발생세포는 액체배지에 옮겨 배양하였다. 적정 배양배지와 초기 체세포배 접종량을 결정하기 위해 MS와 SH기본배지와 0.1mg/l 2,4-D를 첨가한 배지를 사용하고 초기 배발생 캘러스 접종밀도는 100mg과 200mg으로 하여 현탁배양 45일후에 체세포배 증식율을 조사하였다. 액체배지는 250ml 삼각플라스크에 50ml씩 분주하여 pH는 5.8로 조절한다음 고압멸균하였다. 배양은 25℃, 회전속도 100rpm으로 16시간 광/8시간 암조건에서 진행하였다.

식물체 재분화와 순화

액체배지에서 발아하여 배축이 2cm이상 신장하였을때 체세포배를 고체배지에 옮겨 배양하여 완전한 유식물체를 유도하였다. 1/4MS기본배지에 1%의 sucrose를 첨가한 고체배지에서 배양한 식물체를 수돗물로 배지를 깨끗이 씻어낸 후 원예용상토가 담긴 플러그에 이식하였다. 순화는 온도, 습도, 광이 모두 조절되는 비닐하우스(23℃±2℃, 80%상대습도, 16시간 광조건)에서 진행하였다. 순화 30일 이후에 식물체의 생존율을 조사하였다.

결과 및 고찰

캘러스 및 배발생캘러스의 유도

고농도의 2,4-D와 TDZ, IBA와 TDZ를 조합처리하여 엽병 배양에서는 배양 10일부터 황녹색의 캘러스가 형성되기 시작하였다. 배양 30일후 가시오갈피 엽병배양에서 자생지별 캘러스 유기율을 비교한 결과 캘러스형성에 있어서 자생지별 가시오갈피는 생장조절물질에 대하여 비슷한 반응을 보였다. 한국, 러시아, 일본 모집종 모두에서 2,4-D와 TDZ조합처리에서 40%이상의 캘러스 형성율을 보였고 캘러스 증식속도도 가장 빠른 반면, IBA와 TDZ조합처리에서는 캘러스형성율이 30%이하로 저조하였다(그림 1.) 줄기를 캘러스 유기재료로 하였을 때에도 한국산 가시오갈피의 캘러스형성율이 러시아산과 북해도산보다 높았다(결과 미제시).

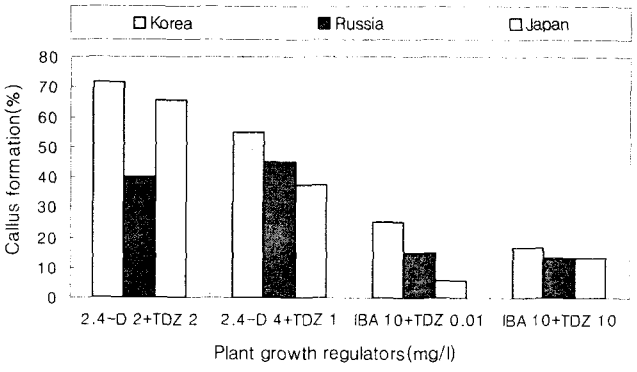

Fig. 1. Effect of growth regulators on callus formation from petiole culture of *A. senticosus* (Acession : Korea, Russia, Japan) after 30 days.

캘러스 유기재료를 한국산 가시오갈피의 잎, 엽병, 줄기, 마디, 꽃봉오리, 화경, 뿌리 절편체로 구분하여 배양 30일후에 유도된 캘러스의 수를 조사한 결과(그림 2) 식물생장조절물질의 처리조합별로 약간의 예외는 있으나 캘러스형성율은 대체적으로 꽃봉오리에서 가장 양호하였는데 2.4-D 2mg/ℓ +TDZ 2mg/ℓ 첨가배지에서는 85%의 캘러스가 유기되었다. 부위별 캘러스 형성율은 꽃봉오리, 줄기마디, 줄기, 엽병, 뿌리, 화경, 잎의 순이었다. 가시오갈피의 잎절편체는 캘러스 형성율이 너무 저조하고 캘러스의 증식속도도 느려 캘러스 유기재료로는 적합하지 않았다.

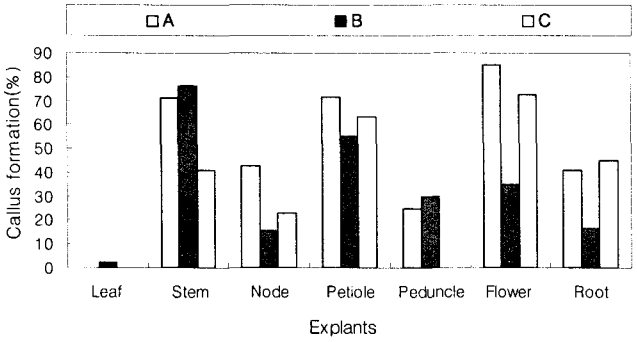

Fig. 2. Effect of explants type on callus formation of *A. senticosus*(Acession, Korea) after 30 days. A : 2.4-D 2mg/ℓ +TDZ 2mg/ℓ ; B : 2.4-D 4mg/ℓ +TDZ 1mg/ℓ ; C : 2.4-D 4mg/ℓ +TDZ 4mg/ℓ

캘러스 유기배지와 동일한 배지에 계대해 주었을 때 5개월 이상 경과 후에도 녹색 캘러스에서는 체세포배가 형성되지 않았고 캘러스 증식만 되였다. 체세포배 유도를 위하여 캘러스를 여러농도의 2,4-D를 단독처리한 배지에 옮겨 배양하였을 때 배양 3개월 후부터 캐러스가 갈변하면서 배발생 캘러스가 유도되었다. 이런 스트레스에 의한 또는 노화한 상태의 갈변된 캘러스로부터 체세포배의 유도는 치커리(Heiwegh 등, 1985)등에서도 보고된바 있는데 스트레스와 체세포배 형성과의 관계는 밀접한 관련성이 있음을 시사해 주고 있다. 본 실험에서는 2,4-D 0.1mg/ℓ 의 낮은 농도에서는 캘러스가 전부 고사하였으며 2.4-D농도가 너무 높으면 캘러스의 생장이 너무 왕성하여 배발생캘러스 유기에는 2.4-D 1mg/ℓ 가 적합하였다(그림 3A).

유도된 배발생 캘러스는 현미경으로 관찰한 결과 많은 작은 세포덩어리로 이루어졌으며 액체배지에 넣으면 쉽게 흩어졌다(그림 3B). 배발생세포를 0.1㎎/ℓ 의 2,4-D를 첨가한 MS액체배지에 옮겨 배양하였을때 매우빠른 속도로 분열 증식하였다. 배양 2주 후에 증식된 세포를 Choi 등(1999)의 방법에 따라 stainless sieve(200㎛사이즈)로 걸러 체를 통과한 것만 실험에 사용하였다(그림 3C). 이와 같은 방법으로 일본산 가시오갈피의 줄기와 러시아산 가시오갈피의 줄기로부터 각각 하나의 캘러스로부터만 배발생캘러스가 유기 되었으며 배발생 캘러스의 확보와 대량증식이 가능하였다.

한국산 가시오갈피의 엽병, 줄기, 액아, 뿌리; 북해도산 가시오갈피 엽병과 줄기; 러시아산 가시오갈피의 줄기 등 거의 모든 캘러스로부터 배발생 캘러스가 유기 되어 가시오갈피의 여러 조직절편이 모두 체세포배 유기재료로 사용할 수 있을 것으로 보인다(표 1, 2). 배발생캘러스의 형성율은 한국산 가시오갈피가 전체적으로 러시아산과 북해도산보다 높았으며 부위별로 보면 엽병부위에서 유기된 캘러스에서 가장 높은 배발생캘러스 형성율을 보였으나 모든 처리에서 배발생 캘러스형성율은 3% 이하로 매우 저조하였다. 또한 배양부위별로 보면 엽병, 마디, 줄기, 뿌리에서 유기된 캘러스에서만 배발생 캘러스가 유도되었다. 엽육, 꽃봉오리, 꽃대 등 부위에서 유기된 캘러스는 배양과정에 고사하거나 캘러스생장이 너무 저조하여 실험에 필요한 충분한 양의 캘러스를 얻지

Table 1. Effect of explant type and 2,4-D on embryogenic callus formation of *A. senticosus* accesions(Korea, Russia, Japan) after 5 months

Growth regulator (mg/ℓ)		Embryogenic callus formation(%)			
		Stem	Petiole	Node	Root
2.4-D	0.1	0	0	0	0
	1	2.0	3.0	2.3	0.3
	2	0.7	2.0	1.0	0
	4	0	1.3	0.3	0

Table 2. Effect of genotypes (Korea, Japan, Russia) on embryogenic callus formation of *A. senticosus* after 5 months

Growth regulator(mg/ℓ)		Embryogenic callus formation(%)		
		Korea	Japan	Russia
2.4-D	0.1	0	0	0
	1	2.0	0.3	0.7
	2	0.7	0	0
	4	0	0	0

못한 등 원인으로 실험에서 제외시켰는데 알맞는 배양조건을 찾으면 배발생캘러스의 유기도 가능할 것으로 사료된다. 캘러스가 유래한 절편체의 종류에 따라 배 발생능력이 차이를 나타낸다는 보고도 있으나 본 실험의 경우에는 절편체의 종류가 중요한 영향을 미치는 것 같지는 않았다.

액체배양에 의한 체세포배 생산

체세포배의 유기를 위해 배발생캘러스 100~200mg을 50ml의 액체배지가 들어있는 250ml의 삼각플라스크에 옮겨 현탁배양을 진행하였고 2주마다 배지를 갈아주었다. 배양 45일후에 여러 배지에서의 체세포배를 증식한 결과는 표 3에 나타내었다. 체세포배 증식과 분화에는 MS배지가 SH배지보다 효과적으로 나타났고 MS기본배지에 200mg의 배발생캘러스를 접종할 때 가장 양호하였으며 대부분의 배발생 캘러스는 구형배와 심장형배로 발달하였다. 낮은 접종밀도에서는 체세포배 수는 적으나 체세포배의 발달은 촉진되었다. MS기본배지에 0.1㎎/ℓ의 2.4-D를 첨가하였을 때에는 배발생 캘러스의 증식은 양호하였으나 배의 발달은 억제되었다.

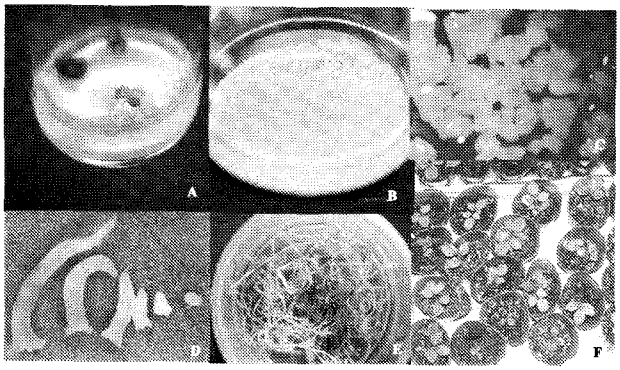

Fig. 3. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *A. senticosus* A : friable embryogenic callus induced from callus; B,C : heart stage somatic embryos cell in suspension culture. D : various stage of somatic embryos on suspension culture. E : germination somatic embryos. F : six-month-old plants after acclimation in green house

Table 3. Effect of suspension culture media on somatic embryo of *A. senticosus* acession Korea after 45 days

Culture media	Cell weight inoculated (mg/flask)	Final Embryo weight (g/flask)	Embryo stage
MS+2.4-D 0.1mg/ℓ	200	5.1	cell clumps
MS	100	4.5	heart
MS	200	8.8	heart+globular
SH	200	4.6	globular

식물체 재분화와 순화

단일세포상태의 배발생 세포를 생장조절물질을 함유하지 않은 MS액체배지에서 배양하였을 때에 단계적으로 구형, 심장형, 어뢰형배(그림 3C,D,E,F)를 거쳐 2cm이상 성장한 발아단계의 체세포배를 1/4MS기본 고체배지에 이식하면 다수의 식물체로 재분화되었으며(그림 3G) 상토에 옮겨 온실에서 순화한 식물체의 생존율은 기내에서의 성장상태에 따라 다르게 나타났는데(표 4) 기내배양 시에 생장이 저조하여 잎, 뿌리의 분화가 저조하고 식물체 크기가 2.5cm보다 작은 처리구에는 순화과정에서 5%의 생존률을 나타낸 반면, 기내에서 잎, 뿌리가 정상적으로 분화하고 성장이 양호했던 5cm이상 자란 식물체(그림 3H)는 99%의 높은 생존율을 보였다.

Table 4. Comparision of survival rate of *A. senticosus* plantlets after 30days acclimation

Plant size transferred	No. of plant transferred	No. of plant survived*	Survival rate (%)
〈 20mm	36	5±1.0	13.9±2.8
20-50mm	36	25±2.6	69.4±7.2
〉 50mm	36	35.7±0.5	99.1±1.3

* Data represents mean±S.E. of three independent experiment

적 요

가시오갈피의 꽃봉오리, 엽병, 줄기, 줄기마디, 뿌리, 꽃대, 잎 등 조직으로 부터 캘러스가 유기 되었으며 캘러스 유기재료로는 꽃봉오리, 엽병, 줄기, 줄기 마디, 뿌리 등이 적합하였다. 캘러스 유기율은 한국산 가시오갈피가 일본산과 러시아산보나 높게 나타났다. 캘러스 유기에는 2.4-D와 TDZ조합처리가 효과적이었으며 한국 가시오갈피의 엽병, 줄기, 액아, 뿌리절편으로부터 형성된 캘러스에서 배발생 캘러스가 형성되었으며 줄기에서 형성된 캘러스로부터 한국, 일본, 러시아산 가시오갈피 모두에서 배발생캘러스가 형성되었다. 엽병에서 형성된 캘러스로부터 배발생캘러스의 유기율이 가장 높았으며 2.4-D 1mg/l 처리가 가장 효과적이었다. 액체배지에서

의 체세포배의 생장에는 생장조절물질을 첨가하지 않은 MS기본배지가 적합하였다. 기내에서 잎과 뿌리 분화가 이루어지고 건실하게 자란 식물체를 온실에 옮겨 순화하였을 경우 99.1%의 생존율을 보였다.

LITERATURE CITED

Ahn JK, Lee WY, Oh SJ, Park YH, Hur SD, Choi MS (2000) The contents of Chlorogenic acid and Eleutheroside E in *Eleutherococcus senticosus*(Rupr. et Maxim.)Harms. J. Korean For. Soc. 89(2) : 216-222

Brekhman II (1960) A new medicinal plant of the family Araliaceae the spiny *Eleutherococcus*. Izvsibir Opdel. Akad Nauk. U.S.S.R. 9 : 113-120

Choi YE, Kim JW, Yoon ES (1999) High Frequency of Plant Production via Somatic Embryogenesis from Callus or Cell Suspension Cultures in *Eleutherococcus senticosus*. Ann. Botany 83(3) : 309-314

Gui Y, Guo Z, Ke S, Skirvin RH (1991) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acanthopanax senticosos*. Plant Cell Rep. 9 : 514-516

Heiwegh KM, Banerjee GN, Nerum KV, Langhe ED (1985) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in Cichorium intybus L(witloof, compositae). Plant Cell Rep. 4 : 108-111

Kim S, Kim KY, Park MS, Choi SY, Yun SJ (1998) Intraspecific relationship of *Eleutherococcus senticosus* Max. by RAPD markers. Korean J. medicinal Crop Sci. 6(3) : 165-169

Park MS, Kim YJ, Park HK, Chang YS, Lee JH (1995) Using air tenperature and sunshine duration data to select seed production site for *Eleutherococcus senticosus* Max. Korean J. Crop Sci. 40(4) : 444-450

Wagner H, Heur YH, Obermeier A, Tittel G, Bladt S (1982) Die DC- and HPLC-Analysis der *Eleutherococcus* Droge. J. Medicinal plant Res. 44 : 193-198

Yu CY, Lim JD, Seong ES, Kim JK (1997) Effect of embryo maturity and medium on callus formation and plant regeneration from immature embryos of *Eleutherococcus senticosus*. Korean J. Plant Res. 10(2) : 122-127

Yu CY, Kim JK, Ahn SD (1997) Callus formation and plant regen- eration from immature embryos of *Eleutherococcus senticosus*. Korean J. Medicinal Crop Sci. 5(1) : 49-55