

# 생물반응기 배양을 통한 두릅나무 (*Aralia elata*)의 체세포배 및 유식물체 대량증식

이원석, 최은경, 김재훈\*  
(주) 마이크로플랜츠 부설연구소

## Mass Propagation of Somatic Embryos and Plantlets of *Aralia elata* through Bioreactor Culture

Won Seok Lee, Eun Gyung Choi, Jae Whune Kim\*  
Microplants Co., Ltd., Palbokdong, Jeonju 561-203, Korea

**ABSTRACT** Embryogenic calli were induced from petioles of *Aralia elata* on MS solid medium supplemented with 1.0 mg/L 2,4-D. When embryogenic calli were transferred to MS liquid medium supplemented with 1.0 mg/L 2,4-D, embryogenic cells and embryogenic cell clusters were developed after 2 weeks of culture. Embryogenic cells were filtered through a 250  $\mu$ m sieve and the passed cells were proliferated and maintained in MS liquid medium supplemented with 1.0 mg/L 2,4-D. Embryogenic cell clusters entrapped on the sieve were transferred to 1/2 MS liquid medium without plant growth regulators, globular-shaped embryos were developed from embryogenic cell clusters after 2 weeks of culture. Numerous early stage somatic embryos could be developed to heart-shaped, torpedo-shaped, cotyledonary embryos and plantlets in 5 L bioreactor. Above results suggest that effective somatic embryo proliferation can be achieved via bioreactor culture systems in *Aralia elata*.

**Key words:** Cotyledonary embryos, embryogenic cells, liquid culture

### 서 론

두릅나무 (*Aralia elata*)는 두릅나무과에 속하는 낙엽활엽의 관목으로 산과 들에 자생하고, 봄철의 새순은 대표적인 산채로서 오래전부터 식용으로 널리 사용해 왔다. 두릅나무의 뿌리 및 나무껍질은 4~5월에 채취하여 약용으로 사용하는데 해열, 강장, 거담작용과 위암 및 당뇨병 치료에 효능이 있고 특히 두릅나무의 가시는 고혈압의 특효약으로 민간요법에서 널리 알려져 있다. 일반적인 번식방법인 근삽법은 삼목시기가 초봄의 1~2개월로 국한되고, 근의 절단이 치명적인 입고역병의 발병원인 (Amemiya et al. 1992)이 되는 문제점 때문에 기내 배양에 의해 두릅나

무 품종에 대한 대량증식 연구가 보고된 바 있다. 특히, 염조직 (Jhang et al. 1993, 1994; Park et al. 1994), 정아 (Moon et al. 1998, 1999, 2001)에서 체세포배 유도 및 식물체 재분화에 관한 연구는 두릅나무의 기내배양에 관한 충분한 기초적 자료를 제시하고 있다. 최근 기내에서 배양된 산삼의 부정근 이용은 배양체의 산업화 가능성을 제시하고 있다. 따라서 두릅나무를 비롯한 다른 약용식물들을 기내배양하여 생산된 배양체내 약용 성분을 최대화하여 유용물질을 추출하거나 그 밖의 다른 여러 가지 산업화를 위해서 저비용 대량생산 체계 확립에 관한 연구가 매우 중요하리라고 생각된다.

저비용 순화체 확보 및 배양체 자체의 산업화를 위해서는 두릅나무의 경우 한번에 많은 양의 체세포배를 얻는 묘의 대량생산이 중요하며, 이때 생물반응기를 이용하는 것이 가장 적절할 것으로 사료된다. 생물반응기는 교반식

\*Corresponding author Tel 063-211-6005 Fax 063-211-6012  
E-mail jwkim@microplants.com

(stirred jar), 기포식 (bubble column), 공기부양식 (air lift) 등이 있으며, 식물의 세포배양이나 기관배양에는 공기부양식 반응기가 주로 이용되고 있다. 최근 들어 생물반응기를 이용하여 가시오갈피 (Kim and Kim 2001), 미나리 (Kim et al. 2002) 등의 체세포배를 대량생산하였고, 산삼의 부정근 (Choi et al. 2000) 이나 인삼 세포 (Hibino and Ushiyama 1997)를 대량배양하여 산업화에 성공한 사례가 보고되고 있는데, 생물반응기를 이용하면 증식속도가 빨라 배양기간이 짧아지고, 균일한 배양체의 안정적 대량 공급이 가능하다. 식물 배양체의 산업화를 위해서는 배양체의 증식속도가 느리고 많은 노동력과 시간이 소요되는 기존 대량증식의 단점을 극복하여 짧은 시간에 대량공급이 가능하도록 해야 한다.

본 연구는 두릅나무의 엽병을 배양 재료로 사용하여 캘러스를 유도한 후 현탁배양하여 반복적으로 배발생세포를 유지 및 증식시켜 균일한 체세포배를 대량으로 유도하여 생물반응기에 투입되는 양을 확보한 후, 생물반응기를 이용하여 체세포배와 유식물체를 대량으로 생산하는 시스템을 개발하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 배지조제

전라북도 산림환경연구소의 온실에서 생육하는 2년생 두릅나무 (*Aralia elata*)의 엽병을 채취하여 흐르는 물에 수세한 후, 70% 에탄올에 30초, 1% sodium hypochlorite에 10분간 표면살균하고 멸균수로 4회 세척하였다. 배발생캘러스를 유도하기 위해 살균된 엽병을 5~7 mm 크기로 잘라 배지에 옮겨 24±1°C, 암소에서 배양하였다. 배지는 0.5, 1.0, 2.0 mg/L 2,4-D, 3% sucrose 그리고 0.4% gelrite가 포함된 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지를 사용하였다. 배발생캘러스 유도 배지를 포함한 모든 배지는 pH를 5.8로 조정하고 121°C에서 15분간 고압멸균 하였으며, 멸균된 페트리디쉬 (87 × 15 mm)에 배지를 25 mL씩 분주하였다.

### 배발생캘러스 유도 및 배발생세포 현탁배양

두릅나무 엽병 절편을 2,4-D가 함유된 MS 고체배지에서 배양하면 비배발생캘러스와 함께 배발생캘러스가 엽병 절단면으로부터 유도되는데 노란색의 부서지기 쉬운 배발생캘러스만 선별하여 고체배지에서 계대배양하여 증식시켰다. 이 배발생캘러스를 MS 액체배지에서 배양하면 각각의 세포로 분리되는 배발생세포와 여러개의 배발생세포가 서로 엉겨 분리되지 않은 배발생세포괴로 분리되며 이를 유지 및 증식시키기 위해 0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L의 2,4-D를 처

리하여 비교하였다. 250 mL 플라스크에 50 mL의 배지를 넣고, 생중량 2.0 g의 배발생캘러스를 접종하여 22±2°C에서 110 rpm 속도로 2주간 암배양하였다. 얻어진 배발생세포는 전과 동일한 조건의 MS 액체배지에서 배양하고, 배발생세포괴는 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 1/2 MS 액체배지로 옮겨 20 μm·m<sup>-2</sup>·sec<sup>-1</sup>의 형광등 하에서 16시간 조명하며 체세포배를 유도하였다.

### 생물반응기를 이용한 체세포배 및 유식물체 생산

현탁배양을 통해 유도한 구상형의 체세포배는 5 L bioreactor에 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 1/3 MS, 1/2 MS, 1 MS, 2 MS 액체배지 4 L를 넣고, 체세포배 10 g을 접종하여 2주간 배양 후 체세포배 발달 양상을 비교하였고, 주기적으로 시료를 채취하여 생중량을 측정하고 성장률을 조사하였다. 자엽형 배까지 발달한 체세포배는 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 1/2 MS 배지의 bioreactor에서 2주간 배양하여 유식물체를 대량생산 하였다. 공기의 주입은 체세포배가 원활히 순환하도록 콤퓨레서 혹은 수족관용 에어펌프를 사용하여 용기 밑에서 계속해서 뿜어지도록 장치하여 압력이 0.05~0.1 vvm이 유지되도록 하였다. 배양실은 22±2°C의 온도로 하고, 40 μm·m<sup>-2</sup>·sec<sup>-1</sup>의 형광등하에서 24시간 명배양하였다.

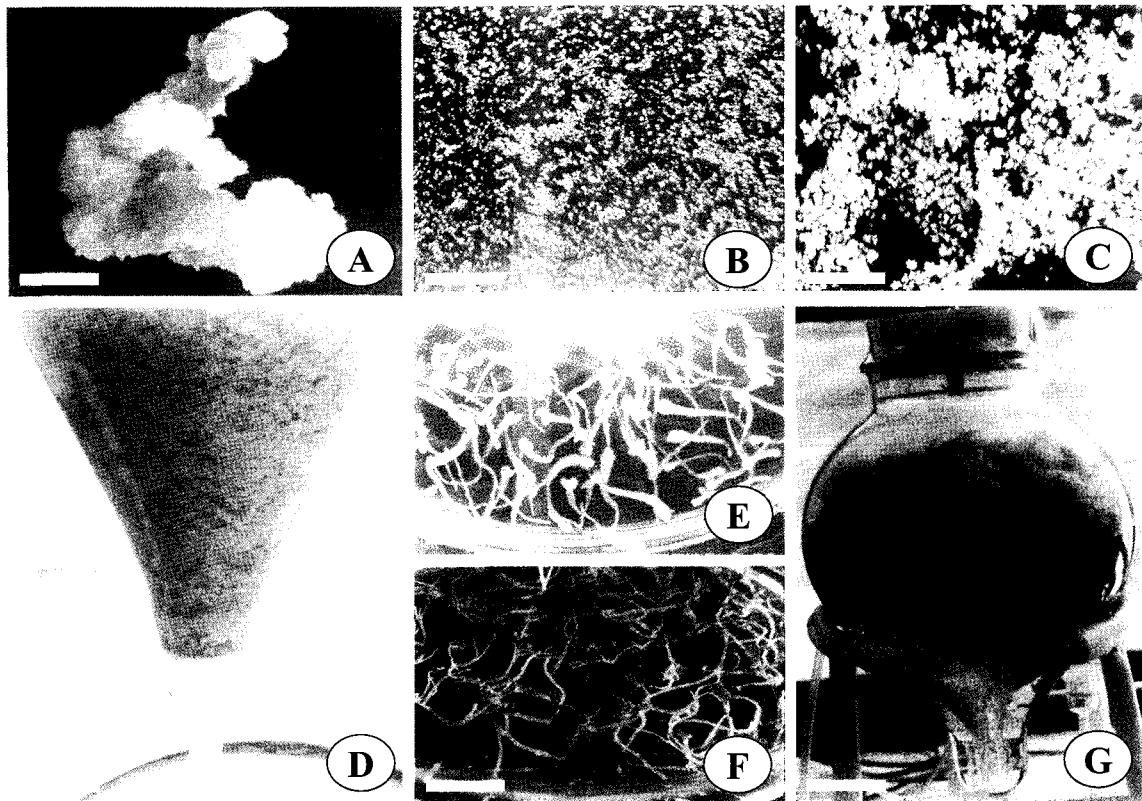
## 결과 및 고찰

### 고체배지에서 배발생캘러스 유지 및 증식

두릅나무의 엽병을 2,4-D가 포함된 MS 고체배지에서 배양하면 배양 3주째에 조직이 부풀어 올라 캘러스를 형성하기도 하고, 검게 변하는 조직도 관찰되었다. 배발생캘러스는 배양 5주째에 형성되기 시작하였는데, 검게 변한 조직의 상부에서 노랑고 등글등글한 형태로 발생하였고 2,4-D의 농도가 낮을수록 형성율이 높았다 (Table 1). 두릅나무의 어린잎과 엽병을 배양하면 2,4-D 농도가 높을수록 캘러스 유도량과 유도율은 양호하였으나 배발생캘러스의 빈도는 저조하다고 보고하였다 (Jhang et al. 1994). 형성된 모든 배발생캘러스는 1.0 mg/L 2,4-D가 포함된 고체배지에서 2주

**Table 1.** Effect of 2,4-D on callus induction of *Aralia elata* cultured on MS solid medium for 6 weeks.

2,4-D (mg/L)	Formation of callus (%)	Formation of embryogenic callus (%)
0.5	55.0	18.0
1.0	60.0	13.0
2.0	75.0	5.0



**Figure 1.** Bioreactor culture of somatic embryos and plantlets from embryogenic callus of *Aralia elata*. A, Embryogenic callus induced on MS solid medium (bar=5 mm); B, Embryogenic cells formed from suspension culture in MS liquid medium with 1.0 mg/L 2,4-D (bar=2 mm); C, Embryogenic cell clusters formed from suspension culture in MS liquid medium with 1.0 mg/L 2,4-D (bar=2 mm); D, Mass production of somatic embryos by culturing in 5 L bioreactor (bar=3 cm); E, Cotyledonary embryos plated on 1/2 MS solid medium (bar=1 cm); F, Germinated plantlets (bar=1.2 cm); G, Mass production of plantlets after subcultured in 5 L bioreactor (bar= 5cm).

간격으로 8주간 계대배양 하였을 때 거의 단일 세포상태로 쉽게 유리될 수 있는 부서지기 쉬운 형태로 증식되었다 (Figure 1A). 이 배발생캘러스는 1.0 mg/L 2,4-D가 포함된 배지에서 2주 간격으로 계대배양 함으로써 배발생능이 소실되지 않고 지속적으로 5년 이상 유지 및 증식시킬 수 있었다. 일단 배발생캘러스가 만들어지면 2,4-D 첨가 배지에 계대배양하면서 배발생캘러스를 유지, 증식하는 것이 효과적인 것으로 알려져 있다 (Choi et al. 1999; Jansen et al. 1990; Parrott 1991).

액체배지에서 배발생세포 유지 및 증식

배발생캘러스를 MS 액체배지에 0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L

2,4-D를 첨가하여 2주간 배양한 결과 배발생세포와 배발생 세포피가 모든 농도에서 정상적으로 증식하였으나, 1.0 mg/L의 농도가 가장 효과적이었다 (Table 2). Kim과 Kim (2001)은 가시오갈피 배발생세포를 250 μm 스테인레스 그물망을 이용하여 배발생세포와 배발생세포피로 분리하고, 배발생 세포피를 생장물질이 첨가되지 않는 MS 액체배지로 옮겨 체세포배를 유도하였다. 본 연구에서도 증식된 배발생캘러스를 액체배지에서 배양한 후, 250 μm 그물망을 이용하여 동질화 하였을 때 250 μm 그물망을 통과하는 배발생세포 (Figure 1B)와 통과하지 못한 배발생세포피로 분리하였는데 (Figure 1C), 그물망을 통과한 배발생세포는 1.0 mg/L 2,4-D의 처리구에서 계속 배양하면 배발생세포와 배발생세포피의 비율이 일정하게 유지되며, 배발생능이 소실되지 않

**Table 2.** Effect of 2,4-D on cell growth (after 2 weeks) and rate (after 6 weeks) of *Aralia elata* cultured in liquid medium.

2,4-D (mg/L)	Cell growth (g FW)		Rate (g FW)	
	Initial volume	Packed cell volume	Embryogenic cells	Embryogenic cell clusters
0.0	2.0	3.6	0.2	2.9
0.5	2.0	3.4	0.6	2.6
1.0	2.0	3.4	1.1	2.2
2.0	2.0	3.2	1.8	0.8

고 지속적으로 유지, 증식되었다 (Table 2). 그러나 0, 0.5 mg/L 2,4-D의 농도에서는 계대배양 횟수가 늘어남에 따라 배발생세포의 비율이 줄어들었고, 배양 8주째 (계대배양 4 회)에 접어들어 대부분의 배발생세포가 배발생세포괴로 발달하여 지속적으로 유지 및 증식시킬 수 없었다. 2.0 mg/L 2,4-D에서는 0, 0.5 mg/L 농도와는 반대로 배발생세포의 비율이 증가하였으나 같은 농도에서 계속 배양하면 배발생 세포가 갈변되었다.

체세포배의 발달과 유식물체 대량생산

두릅나무의 체세포배의 발아에는 배지 내 염류농도가 영향을 미치며 따라서 현탁배양에 의한 체세포배 생산에는 1/2 MS 배지가 가장 양호한 것으로 알려져 있다 (Jhang et al. 1994; Moon et al. 1999). 본 실험에서 그물망을 통과하지 못한 배발생세포괴를 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 1/2 MS 액체배지에 옮겨 형광등 하에서 2주간 배양하면 배발생세포괴와 구상형배가 혼재되어 나타났다. 이들을 그물망을 이용하여 동조화하려고 했지만 크기가 비슷하여 용이하지 못했다. 그래서 1/2 MS 액체배지를 50~100 mL를 플라스크에 넣어 플라스크를 흔든 후 약 20초간 기다리면 구상형배는 가라앉고 배발생세포괴는 배지면 위에 떠있으므로 서서히 따라내면 대부분 구상형배만 남게 되었다. 구상형의 체세포배를 1/2 MS 액체배지에서 2주간 더 배양하여 bioreactor에 투입할 수 있는 충분한 양을 확보하였다.

구상형 (globular-shaped)의 체세포배는 5 L의 bioreactor를 이용하여 2주간 배양하면 심장형 (heart-shaped), 어뢰형 (torpedo-shaped), 자엽형 (cotyledonary-shaped)의 배로 발달하였다 (Figure 1D). 염류의 농도가 낮은 배지 (1/3 MS, 1/2 MS)에서 정상적인 배 형태를 갖춘 체세포배의 발달 빈

도가 높았으며 생중량도 높게 나타났다 (Figure 2). 반면 염류 농도가 너무 높으면 (2 MS) 체세포배가 비대 되거나 다배를 형성하여 정상적으로 발달하지 못하고 증식량도 적어 낮은 염류 농도보다 생중량이 감소하였다 (Figure 3). 이는 낮은 염류농도가 고체배지에서 체세포배 발아 및 기관생장에 양호하고, 높은 염류 농도에서 발아 및 재분화가 억제된다는 결과와 일치하였다 (Park et al. 1994; Jhang et al. 1994; Moon et al. 1999). 체세포배는 배양 5일째까지 서서히 증식하다가 이후 급속히 성장하였고 배양 12일째가 지나면서 증식율이 감소하였다. 본 연구에서는 1/2 MS 액체배지가 체세포배 발달에 가장 효과적이었고, 초기 접종농도 10 g보다 약 62배 증가하여 620 g까지 증식하였다 (Figure 3). Bioreactor에서 배양된 자엽형태의 체세포배 (Figure 1E)의 정상적인 발아를 확인하기 위하여 1/2 MS 고체배지에 평판배양한 결과 대부분 유식물체로 발달하였고 (Figure 1F) 5 L bioreactor로 계대배양하여 2주간 배양하면 유식물체가 많이 발달하였다 (Figure 1G).

본 연구에서는 두릅나무의 배발생캘러스를 고체배양과 현탁배양을 통해 배발생능을 소실시키지 않고, 지속적으로 유지 및 증식시켜 생물반응기에 접종하여 2주, 4주만에 반복적으로 체세포배와 유식물체를 대량생산 할 수 있는 체계를 확립하였다. 페트리디쉬나 플라스크를 이용한 체세포배 생산은 대량증식에 한계가 있고 많은 노동력과 시간을 필요로 하기에 생물반응기를 이용한 체세포배 대량증식은 저비용에 순화개체를 확보하고, 배양체 자체를 직접 사용하여 산업화 할 수 있는 기본 자료를 제공할 것으로 사료된다. 또한, 체세포배와 유식물체를 이용한 효율적인 재분화 시스템이 확립된다면 묘의 대량생산이나 품질개량에 유용하게 이용될 수 있고, 외래 유전자 도입에 의한 형질전환 연구에도 효율적으로 이용할 수 있을 것이다.

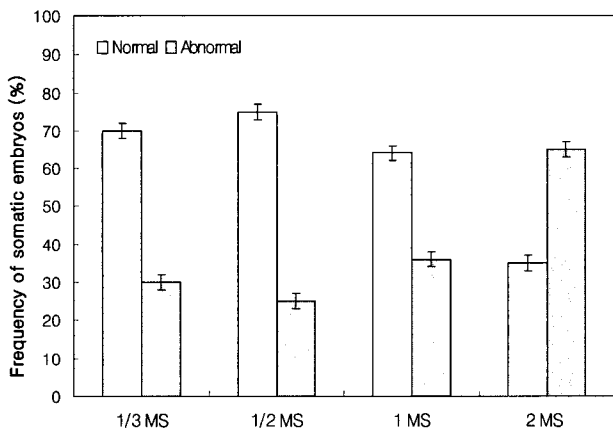


Figure 2. Frequency of normal and abnormal of somatic embryos in 5 L bioreactor after 2 weeks of culture.

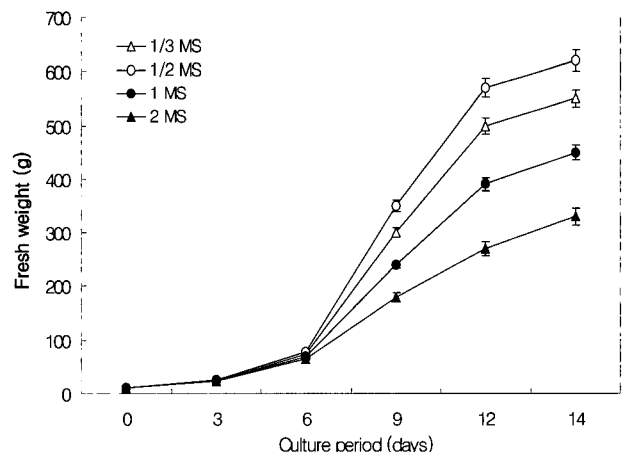


Figure 3. Effect of medium strength on the growth of somatic embryos in 5 L bioreactor during 2 weeks of culture.

**적 요**

두릅나무의 엽병을 1.0 mg/L 2,4-D가 포함된 MS 고체배지에서 배발생캘러스를 유도하였다. 배발생세포와 배발생세포괴는 1.0 mg/L 2,4-D가 포함된 MS 액체배지에서 배발생캘러스를 2주간 현탁배양하여 대량으로 얻었다. 그물망을 통과한 배발생세포는 1.0 mg/L 2,4-D가 포함된 MS 액체배지에서 배양하면 배발생능이 소실되지 않고 지속적으로 유지 및 증식시킬 수 있었다. 그물망을 통과하지 못한 배발생세포괴를 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 1/2 MS 액체배지에 옮겨 2주간 배양하면 구상형의 체세포배로 발달하였다. 구상형의 체세포배는 5 L의 bioreactor를 이용하여 배양하면 심장형, 어뢰형, 자엽형의 배와 유식물체로 발달하였다. Bioreactor 배양을 통해 두릅나무의 체세포배를 효과적으로 대량증식시킬 수 있었다.

**사 사**

본 연구는 과학기술부 자생식물이용기술개발사업 (PF0330602-01)과 농촌진흥청 바이오그린21 사업의 연구비 지원에 의해 수행되었음.

**인용문헌**

Amemiya K, Fujiki T, Hyuga S (1992) Mass propagation by tissue culture in *Aralia elata* S. Yamanashi Prefectural Agricultural Research Center. vol. 5, Japan, pp 11-22  
 Choi SM, Son SH, Yun SR, Kwon OW, Seon JH, Paek KY (2000) Pilot-scale culture of adventitious roots of ginseng in a bioreactor system. *Plant Cell Tiss Org Cult* 62: 187-193  
 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 Bot* 83: 309-314

Hibino K, Ushiyama K (1997) Commercial production of ginseng by plant cell culture technology. In: Fu TJ, Singh G, Curtis WR, *Plant Cell and Tissue Culture for the Production of Food Ingredients*, Kluwer Academic/Plenum, New York, pp 215-224  
 Jansen MAK, Booij H, Schel JHN, De Vries SC (1990) Calcium increases the yield of somatic embryos in carrot embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Rep* 9: 221-223  
 Jhang HH, Park CH, Cho DH, Shin YB (1993) Callus induction and plant regeneration from leaf tissue culture of *Aralia elata* Seem. *Kor J Crop Sci* 38: 366-370  
 Jhang HH, Park CH, Lee YS, Shin YB (1994) Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of *Aralia elata* S. *Kor J Plant Tiss Cult* 21: 167-171  
 Kim JA, Lee BY, Lee YH, Son SH (2002) Scale-up and stable production of somatic embryos by bioreactor in *Oenanthe stolonifera* DC. *J Kor Soc Hort Sci* 43: 173-177  
 Kim JW, Kim HS (2001) Mass production of siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*) somatic embryos by cell culturing. *Ori Pha and Exp Med* 1: 34-38  
 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, Oh KE, Son SH (1999) Factors influencing somatic embryo induction and plant regeneration in *Aralia elata* Seem. *Kor J Plant Tiss Cult* 26: 275-280  
 Moon HK, Youn Y, Yi JS (1998) Somatic embryogenesis, plant regeneration, and field establishment from tissue culture of winter buds of 10-year-old *Aralia elata*. *J Kor For Soc* 87: 57-61  
 Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *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* SEEM. *Kor J Med Crop Sci* 2: 241-245  
 Parrott WA (1991) Auxin-stimulated somatic embryogenesis from immature cotyledons of white clover. *Plant Cell Rep* 10: 17-21

(접수일자 2004년 8월 9일, 수리일자 2004년 9월 16일)