

## 생물반응기에서 배양한 가시오갈피 유식물체의 순화 및 생육특성

이성호\* · 임정대\*\* · 김명조\*\* · 김나영\*\*\* · 유창연\*\*†

\*중국 동북임업대학 임목유전육종학과, \*\*강원대학교 농업생명과학대학, \*\*\*경희대학교 식품영양학과

### Acclimatization and Growth Characteristics of Plantlets of *Eleutherococcus senticosus* Maxim Cultured by Bioreactor

Cheng Hao Li\*, Jung Dae Lim\*\*, Myong Jo Kim\*\*, Na Young Kim\*\*\*, and Chang Yeon Yu\*\*†

\*Department of Forest Genetics and Tree Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China.

\*\*College of Agriculture & Life Sci., Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

\*\*\*Department of Food & Nutrition, Kyunghee University, Seoul 130-701, Korea.

**ABSTRACT :** Experiments were conducted to find the optimal acclimatization conditions for *Eleutherococcus senticosus* plantlets regenerated from bioreactor cultured somatic embryos, various acclimatizing conditions were compared regarding both survival rate and growth of the plantlets. Among the various temperature and artificial soil tested, the highest survival rate (88%) was observed when plantlets were acclimatized in Klamann bed soil at 10 °C. When in vitro plantlets directly transplanted to field environment, shading treatment was necessary and 50% shading was more effective than 30% shading. Transplanting season were also important for successful acclimatization of in vitro cultured plantlets, transplanted on March 20 with 50% shading exhibited the best survival rate and further growth.

**Key words :** shading net, transplanting, bioreactor culture, somatic embryo

## 서 언

체세포배발생은 실용화만 가능하다면 단기간에 형태적으로 균일한 식물체를 대량 생산할 수 있는 가장 효과적이고 저렴한 방법으로 인식되고 있다. 또한 생물반응기를 이용한 배양 규모의 확대는 집중적인 노동력 투입을 극복할 수 있는 경제적으로 효과적인 대량증식 시스템을 제공할 수 있다 (Indra, 1991). 지난 몇십년간 다양한 식물종에서 체세포배의 유도 및 식물체 재생 및 배양의 최적화를 위한 많은 연구가 진행되어 왔으나 체세포배발생을 이용한 식물체 대량생산의 실용화까지는 아직도 많은 문제점이 남아있다 (Stasolla & Yeung, 2003).

기내에서 재 분화된 식물체의 기외이식은 기내 대량증식에서 필수적인 과정이지만 이 과정이 많은 작물의 상업적인 기내 대량 생산을 제한하는 요인이기도 하다 (Fuchigami *et al.*, 1981). 기내 식물체는 작고 거의 밀폐된 공간에서 성장하였기 때문에 일반 식물체에 비해 큐티클 왁스층의 감소, 기공 개폐능의 부족 등 표피조직과 엽육조직의 발달이 미약한 상태

여서 직접 기외에 이식하면 생존하지 못하기 때문에 순화의 과정은 필수적이다.

가시오갈피의 번식은 주로 종자번식에 의존하는데 체중에 노력이 많이 들고 체중당시에 미숙배로 자연에서는 발아하는데 3년이란 긴 시간이 소요되며, 층적처리도 복잡하고 또한 개체간의 변이가 심하여 균일한 묘를 양성할 수가 없어 새로운 증식체계의 개발이 필요하다. 이에 따라 체세포 배를 이용하여 가시오갈피를 대량 증식시키려는 연구가 수행되었고 지금까지의 연구에서 많은 기초적 조건들이 밝혀졌으나 (Yu *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 1999, 2002; Li & Yu, 2002) 아직도 여러 가지 해결해야 할 문제점이 많아 실용화되지 못하고 있다. 특히 생물반응기 배양한 가시오갈피 기내식물체의 순화에 관한 연구는 보고된 적이 없다.

본 연구에서는 생물반응기 배양을 통해 대량생산된 가시오갈피의 체세포배 유래 식물체를 포장에 직접 순화하기 위한 기초연구로 순화에 적합한 온도조건과 순화도양을 조사하고 배양실조건과 차광막의 순화장소와 순화기간에 따른 묘목의 생존율과 생육상태를 비교하였다.

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6411 (E-mail) cyyu@kangwon.ac.kr

Received July 22, 2003 / Accepted July 31, 2005

## 재료 및 방법

### 1. 공시재료

한국 자생 가시오갈피를 사용하였다. 가시오갈피 엽병조직에서 유도한 배발생세포를 (Li & Yu, 2002) 성장조절물질을 첨가하지 않은 MS 액체배지에서 유지하면서 증식된 배발생세포는 잘게 부순 다음 200  $\mu$ m의 체를 통과한 세포로부터 체세포배를 유도하였다.

### 2. 체세포 배의 생물반응기 배양과 식물체 재분화

체세포배 유기를 위하여 가시오갈피 배발생세포 100 mg을 성장조절물질을 첨가하지 않은 1/3 MS 액체배지에 옮겨 배양하였다. 배양은 50 ml의 액체배지가 들어있는 250 ml 삼각플라스크에서 진행하였고 7일에 한번씩 새로운 배지로 갈아줄 때마다 배양중인 배발생세포를 4개의 삼각플라스크에 나누어 배양하였다. 배양 40일 후에 심장형 단계에 이른 체세포배 3g을 10 L 용량의 생물반응기에 접종, 배양하였다. 생물반응기에서 배양 1개월 후 발아초기단계에 이른 체세포 배를 30g 정도씩 새로운 10L 용량의 생물반응기에 옮겨 배양하였다. 배양 1개월 후에 생물반응기에서 배양하여 얻은 유식물체를 꺼내어 1/3 MS 고체배지가 들어있는 용기에 용기당 50-100개씩 담아 4°C의 저온저장상에 보관하였다. 저온에서 보관하던 유식물체는 1/4 MS 기본배지에 1%의 sucrose와 0.25%의 gelrite가 들어있는 고체배지에 옮겨 배양하여 완전한 유식물체를 유도하였다. 배양용기는 70 ml의 배지가 들어있는 플라스틱 용기(동양불산)를 사용하였고 용기당 10개의 유식물체를 치상하였다. 환경조건은 20  $\pm$  2°C에서 형광등으로 16시간 조명하였다. 배양 2개월 후에 잎과 뿌리의 분화가 양호한 식물체만 선별하여 순화실험에 사용하였다.

### 3. 배양식물체의 순화

고체배지에서 배양한 식물체를 수돗물로 배지를 깨끗이 씻어낸 후 상토가 담긴 플라스틱박스 (35\*55\*15 cm)에 정식하여 투명비닐로 밀폐시켜 순화하였다. 이 식후 관수는 박스 아래로 물이 흐를 정도로 충분히 하였으며 이후로는 순화기간동안에 비닐을 벗기지 않은 이유로 관수를 하지 않아도 충분한 수분이 유지되어 관수할 필요가 없었으며 버미큘라이트와 퍼라이트를 순화용 토양으로 사용할 경우에만 4일 간격으로 1/3 MS 무기염만 첨가한 액체배지로 충분한 관수를 하였다.

#### 가. 배양실 순화

체세포배 유래 기내 유식물체의 토양 활착율을 향상시키고자 버미큘라이트, 퍼라이트, 버미큘라이트와 퍼라이트를 동일하게 혼합한 것 그리고 바이오상토1호 (홍농종묘), Klasmann 상토 (Germany)를 이용하여 배양실에서의 식물체 활착율을 조사하였다. 순화에 적합한 온도조건을 조사하기 위하여 순화는

도를 10°C (생장상), 20°C와 26°C (배양실)로 달리하여 순화 2개월 후 생존율을 조사하였다. 배양은 50% 상대습도, 16시간 광조건으로 조절하였다. 기내재분화식물체의 크기가 순화생존율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 고체배지에서 2개월 배양한 후 재분화 식물체의 길이가 5 cm 보다 긴 것과 짧은 두 처리 구로 나누어 순화 2개월 후 생존율을 조사하였다.

#### 나. 차광막 순화

또한 기내식물체의 포장순화에 적합한 시기를 찾고자 순화 시기를 3월 10일, 5월 10일, 7월 10일로 하였고, 차광효과를 알고자 무차광 대비 30%와 50% 차광 처리하여 순화 2개월 후 생존율을 조사하였다. 포장 순화한 식물체의 생육 및 수량 조사는 9월 20일에 실시하였다. 조사항목은 엽면적, 엽수, 엽병길이, 줄기길이, 직경, 뿌리길이 직경, 그리고 생체중과 건물중을 각각 조사하였다.

순화실험은 처리당 50개체로 3반복으로 하였고, 생육조사는 각 처리 당 임의로 5개의 식물체를 선별하여 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 배양실 순화

생물반응기에서 가시오갈피의 체세포 배를 배양하여 얻은 기내 식물체를 순화 처리하여 토양활착율 향상에 적합한 조건을 찾고자 순화토양으로는 펄라이트, 버미큘라이트, 퍼라이트와 버미큘라이트를 같은 비율로 혼합한 것, 원예용상토를 사용하여 20°C 배양실에서 시험한 결과 순화 40일 후 생존율은 원예용 상토에서 41%로 가장 높은 반면 펄라이트와 버미큘라이트 단독처리와 조합처리 모두 생존율이 20%이하로 저조하였다(Table 1).

순화에 적합한 온도조건을 구명하고자 배양실과 성장상을 이용하여 순화온도를 10, 20, 26°C로 조절하여 2개월 후 생존율을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 순화 온도가 낮을수록 식물체 생존율이 높은 결과를 보였다. 생존율은 10°C에서 86%로 가장 높았고 20°C에서는 42%로 절반 이상 감소하였으며 26°C에서는 대부분 식물체가 괴사하였다.

**Table 1.** Effect of different artificial soils on survival rate of *E. senticosus* plantlets regenerated from somatic embryos in normal culture room at 20°C

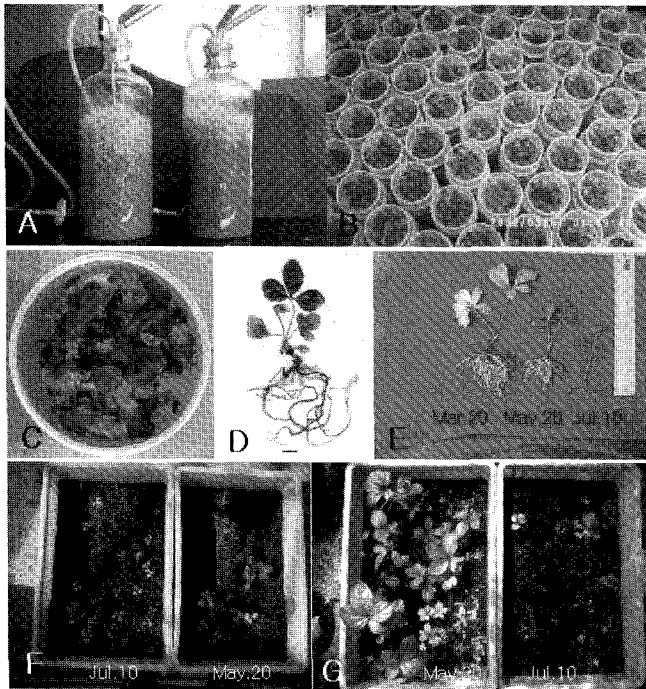
Soil	Days after acclimatization						
	0	4	8	12	16	24	40
Bio-1 soil	100	100	100	89	85	61	34
Vermiculite(50)+Perlite(50)	100	100	95	82	64	22	16
Klasmann	100	100	100	99	99	68	41
Vermiculite	100	99	86	56	44	23	8
Perlite	100	100	96	81	66	39	14

**Table 2.** Effect of temperature on survival rate of *E. senticosus* plantlets regenerated from somatic embryos 2 months after transplanting

Temperature	No. of transplanted	No. of survived	Survival rate (%)
10°C	50	44.0	88.0
20°C	50	22.0	44.0
26°C	50	2.3	4.6
LSD 5%		4.96	

**Table 3.** Effect of *in vitro* plantlets size on survival rate of *E. senticosus*. 2 months after transplanting

Plantlet length (cm)	No. of plantlets transplanted	10°C		20°C	
		No. of survived	Survival rate(%)	No. of survived	Survival rate(%)
3-5	50	34.0	68	7.0	14
>5	50	46.0	92	21.3	42.6
LSD 5%		3.80		11.21	



**Fig 1.** Process of somatic embryo production, plantlet regeneration and acclimatization of *E. senticosus* A: germinated embryos in bioreactor; B, C, D: regenerated somatic embryos in bioreactor; E: acclimatized plantlets, *in vitro* regenerated plantlets were acclimatized in Mar. 20, May. 20, Jul. 10 respectively; F: acclimatized plantlets in soil; G: New year sprouting plantlets.

10°C에서 순화할 경우 식물체의 잎은 탈락되는 현상이 없이 가을까지 정상적으로 성장하였으나 20°C 이상에서는 순화과정에서 기내에서 형성된 원래의 잎은 모두 탈락하고 새로운 잎이 나오게 된다 (Fig. 1).

생물반응기에서 배양한 유식물체를 1/3 MS 고체배지에 옮겨 잎과 뿌리를 유도한 결과 식물체 재분화율은 평균 35% 미만으로 매우 저조하였다. 재분화식물체의 생육상태도 큰 차이를 보였는데 생육이 왕성한 식물체가 40% 정도이고 재분화는 되었지만 생육이 완만한 식물체도 거의 60% 정도를 차지하였는데 이들의 순화가능성을 검토하기 위하여 재분화 식물체의 지상부 길이를 5 cm를 기준으로 두 부분으로 나누어 배양실

조건에서의 온도별 순화생존율을 조사한 결과 (Table 3) 10°C와 20°C 모두에서 기내에서 5 cm 이상으로 건설하게 자란 식물체는 생육이 다소 부진한 식물체 보다 순화후에도 높은 생존율을 보여 기내 식물체 품질이 순화 후 생존율에 중대한 영향을 미침을 알 수 있다. 따라서 순화 후 생존 가능한 건설한 기내식물체를 대량으로 얻을수 있는 배양시스템의 확립이 우선 중요한 일이라고 생각된다.

위의 실험에서 10°C의 순화온도에서는 최고로 92%의 높은 순화생존율을 보여 생물반응기 배양한 가시오갈피 조직배양묘의 상업적 순화가 충분히 가능함을 보여준다. 10°C 이하의 저온을 이용한 순화방법은 conifer류와 두릅나무와 같은 목본류에서 순화생존율의 제고에 효율적임이 증명되었으며 이 외에도 조직배양묘의 순화는 광 강도 (Kadlecck *et al.*, 2001), CO<sub>2</sub> 농도 조절 (Deshardins *et al.*, 1987), 환기와 상대습도 (Diaz-Perez *et al.*, 1995)등의 조절을 통하여 효율을 높여왔으나 이러한 방법은 시설비용이 많이 들어 실험실용으로만 사용범위가 한정되어 있는 실정이다.

따라서 기내 배양한 유식물체를 직접 포장에서의 순화가 가능하다면 순화과정에 필요한 배양시설의 설비비용을 줄일 수 있어 더욱 실용적인 순화방법으로 될 수 있을 것이다.

## 2. 차광막순화 실험

가시오갈피 순화 묘의 적정 광조건을 구명하기 위하여 포장에서 차광실험을 수행한 결과 차광을 하지 않은 비닐로 비가림만 한 상태에서는 모든 식물체가 생존하지 못하여 포장에서의 순화에는 차광처리가 반드시 필요함을 나타내었다 (Table 4). 50% 차광 에서는 90%의 생존율을 보여 30% 차광처리에 비하여 4배이상 높은 게 나타났다. 생육상황도 50% 차광 하에서는 순화 5일째부터 새로운 뿌리가 형성되기 시작하였으나 30% 차광에서는 30일이 넘어도 뿌리 성장이 저조하였다. 위의 실험결과 차광정도가 너무 낮아도 순화에 불리하게 작용하는 것으로 판단되었다.

50% 차광 막에서 3월 20일 순화를 시작한 식물체는 배양 50일 후 90% 이상의 높은 생존율을 보였고 5월 20일에 순화를 시작한 식물체도 70%에 가까운 높은 생존율을 보였으나 7월 20일에 순화한 식물체의 순화생존율은 21.4%로 저조하여 (Table 5) 순화시기가 순화식물체의 생존에 큰 영향을 줌을 알

**Table 4.** Effect of shading treatment on survival rate of *E. senticosus* plantlets regenerated from somatic embryos 2 months after transplanting in shading net

Shading rate (%)	No. of transplanted	No. of survived	Survival rate (%)
30	50	12.0	24
50	50	45.0	90
LSD 5%		6.57	

**Table 5.** Effect of transplanting date on survival rate of *E. senticosus* plantlets regenerated from somatic embryos 2 months after transplanting in 50% shading net

Acclimatization date	No. of transplanted	No. of survived	Survival rate (%)
March 20	50	45.0	90.0
May 20	50	33.7	67.4
July 10	50	10.7	21.4
LSD 5%		3.29	

수 있었다. 따라서 가시오갈피 기내식물체의 순화는 생존율이 높은 3월 말에서 5월 20일 전 사이의 기간에 집중적으로 수행하는 것이 비용도 절감하고 효율적인 것으로 생각된다.

50% 차광막에서 순화한 묘목의 생육상태는 순화시기에 따라 큰 차이를 보였다 (Table 6). 줄기는 순화기간동안에 생장이 명확하지 않아 3월 20일 처리구만 유의성이 있고 5월 20일과 7월 10일 처리구사이에는 큰 차이를 보이지 않았으나 줄기 직경은 큰 차이를 보여 3월 20일 순화 묘가 7월 10일 순화 묘의 2배 이상 굵어진 것으로 나타났다. 따라서 생체중과 건물중도 상응하게 3월 20일 순화묘가 5월 20일과 7월 10일 순화묘 보다 각각 2배와 4배이상 높았다. 엽수는 세 처리구에서 큰 차이를 보이지 않았는데 그 원인은 기내배양과정에서 형성된 잎들은 순화기간 중에 전부 탈락하고 새로운 잎이 나오는데 있다. 새로 나온 잎은 생육기간 중에 계속 성장하여 엽면적은 큰 차이를 보였으며 3월 20일 순화묘목은 7월 10일 순화묘목보다 5배의 엽면적을 나타냈고 상응한 엽생체중과 건물중도 거의 6배의 차이를 보였다.

뿌리의 생육정확을 비교해보면 세처리구에서 뿌리 길이와 직경은 모두 3월 20일 처리 구에서 가장 높게 나타났고 뿌리 생장량도 큰 차이를 보여 생체 중은 3월 20일과 5월 20일 순

**Table 7.** Characteristics of under-ground parts by different transplanting date in *E. senticosus* plantlets regenerated from somatic embryos

Acclimatization date	Root			
	Length (mm)	Diameter (mm)	Fresh weight (mg)	Dry weight (mg)
March 20	11.8	2.4	1370.3	308.0
May 20	10.1	1.4	686.0	126.5
July 10	7.2	1.1	117.3	21.9
LSD 5%	1.40	0.51	187.15	36.58

화 묘는 7월 10일 순화 묘보다 11.9배와 5.9배 높게 나타났고 건물중도 비슷한 경향을 보였다. 이러한 생육의 차이는 다음 해의 월동묘목의 발아에도 영향을 미치는데 3월 20일과 5월 20일 순화묘목은 90% 이상의 높은 발아율을 보였으나 7월 10일 순화묘목은 21%의 식물체만 발아하였고 나머지 식물체는 생존은 해있으나 6월까지도 발아하지 못하였다.

이상의 실험결과를 종합해보면 배양실조건에서는 20°C에서의 생존율이 40% 정도로 저조하고 또한 뿌리의 활착도 늦게 진행되고 또한 10°C의 순화온도에서는 식물체 생존율은 높으나 실제로 실용화단계에서는 이렇게 낮은 온도를 유지하는데는 많은 곤란이 있어 배양실에서의 순화는 부적절한 것으로 나타났다. 반면에 포장실험에서는 비가림을 하지 않은 50% 차광막처리에서 3월 20일에서 5월 20일 사이에 순화를 시작한 기내식물체는 67.4-90%의 높은 순화생존율을 나타내 이를 생물반응기 배양한 가시오갈피 기내식물체의 대량순화에 충분히 적용할 수 있음을 시사하며 특히 순화하는데 간단한 차광시설만 필요하여 온실이나 배양실에 의존하는 기존의 순화시스템에 비해 많은 비용을 절약할 수 있을 것으로 기대된다.

### 적 요

가시오갈피 체세포 배를 이용한 우량종묘의 대량생산체계를 확립할 목적으로 체세포 배의 생물반응기 배양을 통해 얻은 식물체의 순화에 관한 기초시험을 수행하였다. 가시오갈피 기내배양 식물체의 토양활착은 밀폐된 공간보다 비가림 하지 않은 차광막조건에서 양호하였고 순화에는 Klasmann 상토와 원예용상토가 좋았다. 배양실 10도와 차광막에서 3월20일 순화

**Table 6.** Characteristics of aerial parts by different transplanting date in *E. senticosus* plantlets regenerated from somatic embryos

Acclimatization date	Stem					Leaf				
	Length (cm)	Diameter (mm)	Fresh weight (mg)	Dry weight (mg)	Petiole length (cm)	No. (ea)	Area (mm <sup>2</sup> )	Fresh weight (mg)	Dry weight (mg)	
March 20	2.7	4.3	300.0	103.3	7.5	2	3820.5	639.0	127.0	
May 20	1.9	3.0	122.8	42.3	5.4	2.3	2667.3	357.0	88.6	
July 10	17.3	1.9	62.7	20.7	5.1	2.5	742.3	104.3	23.5	
LSD 5%	7.77	0.42	29.35	12.40	0.38	NS	274.17	58.59	13.14	

NS: Nonsignificant

한 기내식물체의 순화율은 모두 90% 이상으로 양호하였다. 배양실조건에서는 26°C의 순화온도에서는 10% 이하의 극히 저조한 순화 생존율을 보였으나 포장 차광막조건에서는 최고 온도가 30°C를 넘는 5월20일 순화 처리구에서도 68%의 높은 순화생존율을 보여 불리한 환경조건에서 차광막순화가 순화에 더욱 적합하였다. 차광조건으로는 50% 차광망 처리가 적합하였다. 차광막에서 순화한 식물체의 묘 소질은 3월10일 순화를 시작한 식물체가 가장 좋았다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 Biogreen21 연구비와 강원대학교 한방바이오소재연구센터 지원에 의하여 이루어진 것으로 감사를 표한다.

## LITERATURE CITED

- 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.
- Choi YE, Lee KS, Kim EY, Kim YS, Han JY, Kim HS, Jeong JH, Ko SK** (2002) Mass production of siberian ginseng plantlets through large-scale tank culture of somatic embryos. Plant Cell Rep 21:24-28.
- Desjardins Y, Gosselin A, Yelle S** (1987) Acclimatization of ex vitro strawberry plants in CO<sub>2</sub>-enriched environments and supplementary lighting. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 112:846-851.
- Diaz-Perez JC, Sutter EG, Shackel KA** (1995) Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. Physiol. Plant. 95:225-232.
- Indra KV** (1991) Rationale for the scale-up and automation of plant propagation. In: Indra KV, Scale-up and automation in plant propagation. Academic Press. pp:1-5.
- Kadlecck P, Ticha I, Haesel D, Caphonia V, Schefer C** (2001) Importance of *in vitro* pretreatment for ex vitro acclimatization and growth. Plant Science 161:695-701.
- Li CH and Yu CY** (2002) Effect of Genotype and explant on somatic embryogenesis and acclimatization of *Acanthopanax senticosus*. Korean J. Medicinal Crop Sci. 10(3):217-221.
- Stasolla C, Yeung EC** (2003) Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 74:15-35.
- 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.