J Plant Biotechnol (2015) 42:388−395
DOI:http://dx.doi.org/10.5010/JPB.2015.42.4.388
ISSN 1229-2818 (Print)
ISSN 2384-1397 (Online)

Research Article

저온저장 음나무 배발생 캘러스로부터 체세포배 유도와 식물체 재생

이나념 · 최용의 · 문흥규

Somatic embryo induction and plant regeneration from cold-stored embryogenic callus of *K. septemlobus*

Na Nyum Lee · Yong Eui Choi · Heung Kyu Moon

Received: 15 October 2015 / Revised: 27 November 2015 / Accepted: 21 December 2015
ⓒ Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Somatic embryogenesis is as an excellent technology for potential use in plant mass production, germplasm conservation, or genetic engineering. We examined the effect of cold storage using 3 embryogenic callus lines with different levels of embryogenesis competence derived from immature zygotic embryo cultures of *Kalopanax setemlobus*. Somatic embryo induction, germination and plant conversion were evaluated after 1, 3 and 6 months storage at 4°C in the dark. Most cold-stored embryogenic calli formed somatic embryos normally even after 6 months; however, the induction rate was gradually decreased by increasing the storage period. The most competent line tended to show a slight decline in somatic embryo induction rate, as compared with other lines after cold storage. In general, cold storage resulted in reduced somatic embryo germination and plant regeneration, although 93% somatic embryo germination and 91% plant conversion were achieved regardless of the storage period. Cold storage led to cell browning and degradation. Additionally, the cell structures were confirmed by the aceto-carmine and evans blue dye evaluation. Collectively, our results showed that embryogenic callus of *K. septemlobus* could be preserved at 4°C without subculture for 6 months, and suggested the need for storage of relatively more competent embryogenic calli lines to support somatic embryo induction.

Keywords Cold storage, Embryogenic callus, Somatic embryo germination, *Kalopanax setemlobus*, Plant conversion

N. N. Lee
국립산림과학원 산림생명공학과
(Division of Biotechnology, National Institute of Forest Science, Suwon 441-350, Korea)
강원대학교 산림자원학과
(Department of Forestry, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea)

Y. E. Choi
강원대학교 산림자원학과
(Department of Forestry, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea)

H. K. Moon (✉)
국립산림과학원 산림생명공학과
(Division of Biotechnology, National Institute of Forest Science, Suwon 441-350, Korea)
e-mail: mhkmoon@korea.kr

서 론

식물의 조직배양에서 특정 cell line의 유지 및 보존은 안정적인 배양 프로토콜의 확립뿐만 아니라 다양한 유전자원의 확보 및 보전의 측면에서 중요하다(Martínez et al. 2003). 생식질 보존을 위한 저온저장과 초저온저장 기술은 정단조직(Lambardi et al. 2000; Pennycooke et al. 2000; Xu et al. 2002), 캘러스(An et al. 2003), 체세포배(Ford et al. 2000; Shiota et al. 1999) 등을 재료로 다수의 식물에서 연구가 수행되어 왔다(Sheng-Hui et al. 2008; Teresa et al. 2008).

일반적인 저온저장은 온도범위 1 ~ 9°C의 상온에서 수행하는데, 사과나무(Kim et al. 1986), 키위(Monette 1986), 포플러류(Moon et al. 1987) 등에서 보고되었다. 초저온저장은 가장 이상적인 장기저장 방법이지만, 여러 가지 설비 및 예냉조건, 초저온보호제 등의 첨가가 요구되는 등 그 방법이 제한적이고 비용이 매우 비싸며(Park and Chae 1993), 냉동 보관 시 세포의 동결과 융해 시 세포의 손상 등 장애가 생길 수 있다는 단점이 있다(Richard et al. 1991).

식물 유전자원 보존을 위한 기내 배양체는 매우 다양한 배양기술이 적용되고 식물마다 요구되는 저장기간이 다르기 때문에 적용하는 기술 또한 다르다(Beatrice et al. 1993). Beatrice et al. (1993)은 짧게는 수개월에서 길게는 1 ~ 2년까지 생장억제의 목적으로 저온저장이 필요하다고 하였으며, Banerjee et al. (1985)은 온도에 민감한 열대식물에서 15 ~ 20°C로 온도를 낮추어 생장억제의 목적으로 저온저장이 가능하다고 하였다. 캘러스 등 기내배양체의 저온저장은 대체로 온도범위 5 ~ 15°C의 조건에서 수행되며(Augereau et al. 1986; Caruso et al. 1987) 주기적인 계대배양으로 인한 오염방지, 배양체의 기형화 억제, 인건비 등 제반 소요경비의 절감이 가능한 장점이 있는 것으로 보고되었다(Caruso et al. 1987; Engelmann 1991; Withers 1991; Maurizio et al. 2013). Hiraoka and Kodama (1984)는 식물 세포는 주기적인 계대배양으로 유전적 변이가 종종 관찰되고, 이러한 변이를 최소화하기 위한 저온저장 연구가 필요하다고 하였다.

Mingliang et al. (2011)은 manilagrass의 배발생조직을 재료로 4°C 저장을 통해 효과적인 캘러스 유지 및 경비절감이 가능함을 보고하였으며, Hiraoka and Kodama (1984)는 *Bupleurum falcatum*의 배발생조직을 1년 이상 저온저장 한 후, 재생된 식물체에서 뿌리가 형성됨을 관찰하였다. 그러나 대조구(25°C)의 배발생조직은 계대배양을 하지 않을 경우 6개월 후 식물체 재생 능력을 완전히 상실했다고 하였다. Gebhardt et al. (1993)은 성숙 참나무류의 미세번식에서 배양온도를 26°C에서 4°C로 조절하여 4주간의 계대배양 주기를 8 ~ 20주 까지 연장할 수 있다고 하였다. El-Ashry et al. (2013)는 *Phoenix dactylifera* L.에서 배발생조직의 저온저장(5°C) 효과를 보고하였고, Kulkarni and Ganapathi (2009)는 *Musa* spp.에서 배발생조직을 8°C에서 4개월 간 계대배양 없이 현탁 배양으로 유지됨을 보고하였다.

음나무(*Kalopanax septemlobus* Koidz.)는 두릅나무과에 속하는 낙엽활엽 교목으로 목재는 물론 한약재 및 산채로도 이용되는 유망한 수종이다(Moon et al. 2008). 최근에는 여러 종류의 Saponin 및 항산화 물질에 관한 연구(Shao et al. 1990; Porzel et al. 1992), 항류머티즘(Choi et al. 2002a, b), 항당뇨병(Park et al. 1998), 항염증성(Kim et al. 2002; Lee et al. 2001) 등의 약리적인 효과가 보고되어 산업적인 측면에서의 이용 가능성을 크게 하고 있다. 음나무의 조직배양은 기관형성과 체세포배 유도에 의한 대량증식 연구가 수행되었으나(Moon et al. 2002, 2005, 2008, 2015), 배발생 캘러스의 저온저장에 관한 연구는 아직까지 수행되지 못했다.

음나무 조직배양체의 토양이식은 주로 봄철의 시업 시기에 맞추어 수행되므로 배양체를 일정기간 저온저장하였다가 적정한 시업시기에 묘목을 생산한다면 경비절감 등 여러 가지 측면에서 장점이 있을 것이다. 본 연구는 음나무의 3개 세포주의 배발생 캘러스를 재료로 4°C의 일반 냉장고에서 암배양 조건으로 저온저장 기간에 따른 발아 및 식물체 재생에 미치는 요인을 검토하고자 수행하였다.

재료 및 방법

배발생 캘러스의 저온저장

체세포 배발생 캘러스는 2011년 8월에 성숙 음나무에서 채취한 미숙종자로부터 Moon et al. (2005, 2008)의 방법으로 유도하였다(Fig. 6A). 배발생 세포주 15개를 유도하였는데 그중에서 체세포배발생능이 가장 좋은 세포주(ZE 10), 보통인 세포주(ZE 6), 가장 저조한 세포주(ZE 15)의 3개 세포주를 본 시험에 사용하였다. 배발생 캘러스의 저장은 MS배지(Murashige and Skoog 1962)에 1.0 mg/L 2,4-D, 1 g/L L-glutamine, 4% sucrose를 첨가하고 0.3% gelrite로 경화하여 사용하였다. 약 0.5 g의 배발생 캘러스를 1회용 샤레(90 x 15 mm, SPL, Korea)에 각각 plating하여 3주간 배양 후 유니랩으로 밀봉하여 4±0.4°C의 냉장고에 저온 저장하였다. Petri-dish는 3개씩 묶음 처리하였고, 빛을 차단하기 위하여 알루미늄 호일로 감쌌다. 건조를 방지하기 위하여 폴리에틸렌 지퍼백에 넣어 플라스틱 용기(535 x 370 x 170 mm)에 담아 암 저장하였다. 0, 1, 3, 6개월 간 각각 저장하였으며 저장 기간별로 캘러스를 꺼내어 체세포배 유도를 시험하였다.

체세포배 유도

체세포배 유도는 1/2 MS배지에 0.1 mg/L abscisic acid (ABA), 7% polyethylene glycol (PEG), 0.02% activated charcoal, 3% sucrose를 첨가하고, 0.5% gelrite로 경화하여 사용하였다. 대조구로는 배양실의 상온에서 유지하고 있는 배발생캘러스를 사용하였다. 체세포배 유도는 4 ~ 6주간 실시하였고, 실체현미경(Leica M205 C, Wetzlar, Germany) 하에서 주기적으로 관찰하였다. 처리 당 10 plates로 3반복으로 실험하였다. 배양은 냉백색 형광등(FL 40D, 40W, OSRAM) 하에서 1일 16시간 조명(40 μm m^{-2} s^{-1}), 온도는 25±2°C로 유지되는 배양실에서 실시하였다. 이하의 실험에서도 동일한 환경조건 하에서 실험하였다.

발아 및 식물체 재생

체세포배의 발아 및 재생은 비교적 동일한 발달단계의 어뢰형 배를 선발하여 시험하였다. 발아용 배지는 1/2MS

배지(2% sucrose, 0.3% gelrite 첨가)를 사용하였고, 발아 촉진을 위해 1.0 mg/L GA_3 처리 혹은 기본배지를 사용하였다. 4주간 배양 후 뿌리가 자라고 자엽이 형성된 것을 발아(germination)된 것으로, 그 다음 정아의 신초가 생장하고 본엽이 자라는 것을 재생(conversion)된 것으로 조사하였다. 처리 당 10 plates로 3반복을 두었고, 배양은 체세포배 유도와 동일한 조건으로 수행하였다.

순 화

기내에서 재생된 약 5 cm 자란 어린 식물체를 피트모스와 펄라이트가 혼합된 상토(1:1, v/v)에 이식하여 순화하였다. 상토는 원예 삽목용 플라스틱 상자(50 x 30 cm)에 2/3정도 상토를 채워서 사용하였다. 순화실은 조명 20 μmol m^{-2} $s^{-1,}$ (16시간 광주기), 온도 25±2°C로 유지하였다. 4주 후에 생존율을 조사하였다.

미세구조 관찰

저장기간에 따른 캘러스(ZE 10)를 1.6% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, 0.05M phosphate buffer로 구성된 고정액에 pH 6.8로, 24 ~ 48시간 동안 침지시켜 고정시켰다. 탈수는 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 100% 에탄올로 단계별로 침지시킨 후, 각 단계마다 샘플이 공기 중에 노출되지 않도록 스포이트를 이용해 알코올을 바꿔주었다. 그 다음 60 cmHg, 30분 동안 진공상태로 만들고, 상온에서 3시간 동안 침지시켰다. 침투 과정은 Ethyl alcohol : Infiltration sol. (500 ml Liquid Hardener I + 5 g activator)을 2:1, 1:1, 1:2로 교체한 후 각 단계마다 4°C에서 24시간 동안 처리하였다. 경화는 Technovit 7100 (kulzer)을 사용하여 Infiltration sol. 15 ml + Hardner 1 ml을 이용해 경화시켰다. 절삭은 마이크로톰(LEICA RM2165, Wetzlar, Germany)으로 3 μm 절편을 만든 다음 잘라진 절편을 슬라이드글라스에 펼쳐 붙인 후 염색하였다. 0.1% Periodic acid 염색액에 30분, Schiff's 염색액에 30분, 0.05% TBO 염색액에 25분 염색 후 실체현미경 하에서 관찰하였다.

세포활력 조사

저장기간별로 약 50 mg의 캘러스(ZE 10)를 슬라이드 글라스에 올려놓은 후, 유리 막대로 가볍게 눌러주고 1% 아세토카민을 3방울 정도 떨어뜨려 세포를 염색하였다. 다음 알콜 램프로 수초 간 가열하고, 약 1분 후에 스포이드를 이용 1/2 MS 액체배지로 세척하였다. 여기에 0.05% 에반스블루를 같은 방법으로 염색하고 액체 배지로 씻은 다음 실체현미경 하에서 관찰하였다.

통계분석

모든 측정값은 5회 반복하여 평균값과 표준편차(mean±SD)를 표시하였고 통계 분석은 SPSS 프로그램(SPSS Inc., Chicago, USA)을 사용하였으며 Duncan 다중검정(DMRT) 및 t-test로 유의성 검정을 하였다.

결과 및 고찰

체세포배 유도

3개 세포주(ZE 6, ZE 10, ZE 15) 배발생 캘러스의 저온저장(4°C)에 따른 체세포배 유도 빈도는 Fig. 1과 6 B, C와 같다. 어느 라인에서나 저온저장 기간이 길어지면서 SE 유도율이 감소하는 경향을 보였으며, 감소율은 세포주에 따라 다르게 나타났다. 배발생능이 가장 좋았던 ZE 10 세포주는 대조구(25°C)에 비해 1개월 후에는 약 18.8%, 3개월 후에는 29.9%, 6개월 후에는 47.7% 감소되었다. 이러한 경향은 보통의 배발생능의 ZE 6 세포주에서도 유사하게 나타나 1개월 후에는 32.0%, 3개월 후에는 37.8%, 6개월 후에는 57.8%로 감소되었다. 한편 배발생능이 가장 저조한 ZE 15 세포주는 1개월 후 15.5%, 3개월 후 35.0%, 6개월 후 69.5%로 저장 기간에 따라 SE 유도율이 현저히 감소되었다.

한편 체세포배 유도에 소요되는 시간이 늦어지는 것으로 나타났는데, 대조구(25°C)의 캘러스는 SE 유도에 약 4주가 소요된 반면 1, 3, 6개월 저온저장된 캘러스는 저온저장 기간에 관계없이 약 2주 정도 늦게 SE 유도가 시작되었다. 이 같은 결과는 배발생 캘러스의 갈변화에 따른 세포 조직의 사멸 때문인 것으로 보이고, 이로 인해 SE 유도 빈도가 저장 기간에 따라 감소된 것으로 추정된다.

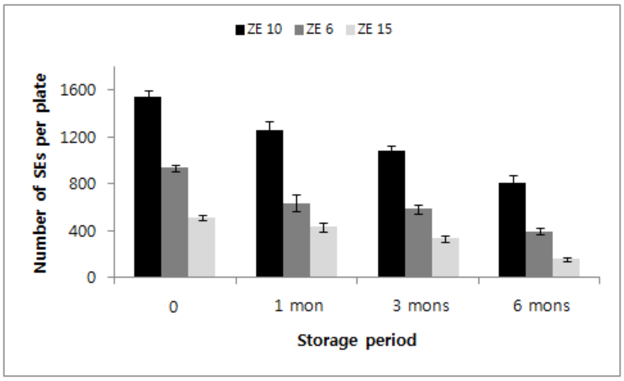

Fig. 1 Somatic embryo induction from 3 low temperature (4°C)-stored embryogenic callus lines of *Kalopanax septemlobus* (ZE 10 – most competent EC line, ZE 6 – average competent EC line, ZE 15 – least competent EC line)

Kim and Park (2002)은 캡슐화된 마늘 캘러스를 4°C에 40일간 저장한 결과 발아기간이 대조구에 비해 1주 정도 지연되고 발아율은 95%에서 88%로 감소한다고 하여 본 실험결과와 유사한 결과를 보여 주었다.

캘러스 등 기내 배양체의 저온저장은 식물에 따라 매우 다르게 보고된다. Souza et al. (2011)은 *Citrus sinensis*의 배발생캘러스를 4°C에서 4주간 저온저장 한 후 체세포배의 발아와 성숙을 관찰하였고, Park et al. (1993)은 *Mentha viridis* L.의 캘러스를 5°C와 10°C에서 5개월간 저장한 결과 5℃에서 세포의 생장은 다소 억제되었으나, 생존율은 오히려 높아졌다고 하였다. Mingliang et al. (2011)은 4°C로 저온저장된 manilagrass 캘러스로의 식물체 재생은 대조구(25°C)와 비교하여 감소하였으나, 식물재생율은 11개월까지 안정적으로 유지되었다고 보고하였다. El-Ashry et al. (2013)은 두 개의 *Phoenix dactylifera* L.품종의 배발생조직 저온저장에서 5°C의 조건에서 1년간 저장이 가능하며, Zych et al. (2005)은 Rhodiola kirirowii의 캡슐화된 액아 및 캘러스의 저온저장에서 4°C에서 6, 11, 15주간 배양결과 배양기간에 따라 액아의 발달이 100%, 83% 및 33%로 각각 감소됨을 관찰하였고, 캘러스는 1-2주 저장 후에 100% 줄기유도가 가능하지만 3 ~ 6주 후에는 95 ~ 99%의 줄기유도가 가능한 결과를 얻었다.

Park et al. (1993)은 *Mentha viridis*의 캘러스는 25°C에서 40일 후에 모두 고사하였고 저온(5, 10°C)에서는 150일까지 50% 이상의 캘러스가 생존하였다고 하였다. 본 실험에서 3개 세포주의 배발생 캘러스를 4°C에서 1년간 저장 후에는 체세포배가 유도되지 않았으며, 배양실(25°C)에서 4개월 저장한 경우에도 캘러스의 갈변화와 함께 점차 고사하였다(data미제시). 따라서 음나무 배발생 캘러스의 보존은 저온저장이 필요하며 이상의 결과에서 보여준 것처럼 일반 냉장고(약 4°C)를 이용하여 6개월 정도 저장이 가능한 것으로 생각된다.

SE 발아 및 식물체 재생

저온저장된 배발생 캘러스로부터 재생된 어뢰형~초기자엽형의 체세포배를 재료로 발아 및 식물체 재생을 실험한 결과는 Fig. 2, 3 그리고 6 D와 같다. 발아율은 대조구(미 저온저장)에 비해 다소 저조하였으나 ZE 10은 95.6%, ZE 6은 92.1%, ZE 15는 92.6%로 세포주에 관계없이 높은 발아율을 보였다. 따라서 배발생 캘러스의 저온저장에 따른 문제는 크지 않은 것으로 나타났다. 한편 발아 촉진을 위한 GA_3 처리 효과는 미미한 것으로 나타났다.

식물체 재생은 캘러스의 저온저장 기간이 길어지면서 다소 감소하는 경향을 보였으나 어느 세포주에서나 91% 이상 높은 식물체 재생율을 보였다. 배발생능이 가장 좋은 ZE 10은 6개월 저장 후에도 평균 94.3%의 재생율을 보인 반면 ZE 6과 ZE 15는 89.1%, 89.9%로 다소 감소하였다. GA_3 처리에 따른 식물체 재생 효과는 배발생 세포주 및 저장기간에 따른 차이가 크지 않았다.

한편 체세포배의 저온저장은 체세포배의 발아와 성숙, 그리고 식물체 재생에 효과적인 것으로 보고되고 있다. Corredoira et al. (2003)은 European chestnut의 체세포배를 4°C 저온저장으로 배발생율을 41%까지 증가시켰고, Teresa et al. (2008)은 *Quercus robur*의 체세포배를 4°C 저온저장으로 발아율이 증가되었으나 식물체 재생 및 생장은 거의 효과가 없었다고 하였다. Merkle et al. (2003)은 *Liquidambar styraciflua*의 체세포배를 재료로 저온처리(8°C)가 식물체 재생에 효과가 없었으나 재생된 식물체의 뿌리발달을 촉진한다고 하였다. 또한 Common ash (Capuana et al. 2007)와 밤나무에서는 체세포배의 식물체 재생에 저온저장(4°C)이 효과적이었으며(Corredoira et al. 2003; Andrade and Merkle 2005), Jayasankar et al. (2001)은 포도나무의 SE를 4°C에서 6개월 저온저장 시 식물체 재생율이 92%, 12개월 저장 시 95%로 향상되었음을 보고하였다. 이러한 체세포배의 저온저장에 따른 발아 및 식물체 재생 효과는 *Q. suber* 등 여러 참나무류에서 보고되었다(Manzanera et al. 1993; García-

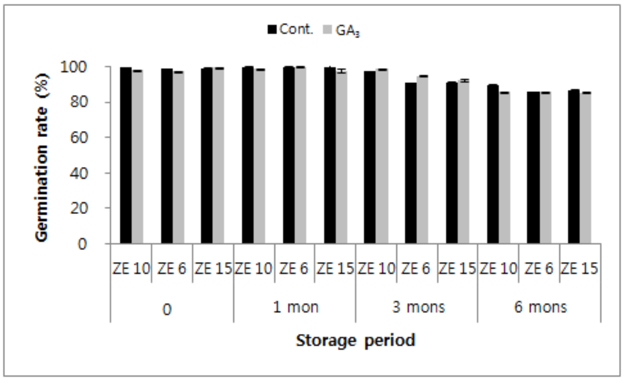

Fig. 2 Frequency of somatic embryo germination using torpedo stage SEs regenerated from cold-stored EC lines of *Kalopanax septemlobus*

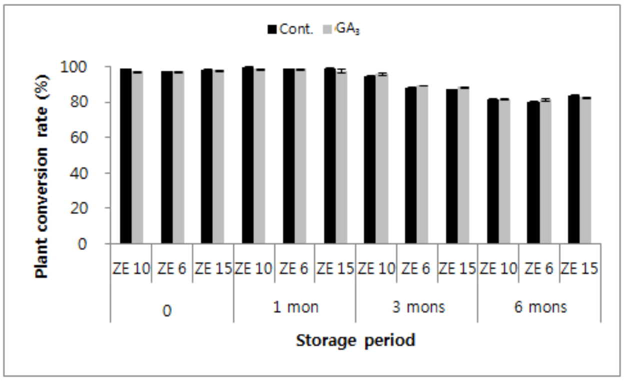

Fig. 3 Comparison of plant conversion rate using SEs derived from cold-stored EC lines of *Kalopanax septemlobus*

Martín et al. 2001; Mauri and Manzanera 2004). 결과적으로 저온저장된 음나무 배발생 조직에서 체세포배 유도 및 식물체 재생은 대조구에 비해 유도 빈도가 다소 떨어지고 체세포배 유도에 걸리는 시간이 2주 정도 더 소요되었다. 앞으로 다양한 배발생 조직의 저온저장을 통한 시간 및 노동력의 절감 효과의 가능함을 보여 주었다.

식물체 순화

정상적으로 재생된 약 5 cm길이의 어린 식물체를 인공상토에 옮겨 순화한 결과는 Fig. 4와 6 E와 같다. 4주 후

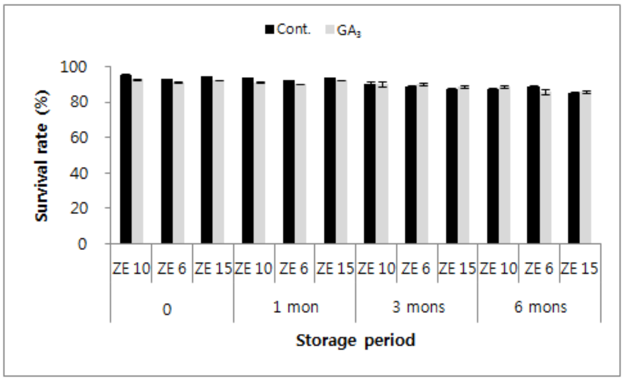

Fig. 4 Comparison of soil survival rate using plantlets regenerated from 3 cold-stored EC lines of *Kalopanax septemlobus*

의 생존율은 대조구 비해 다소 낮았으나, 세포주에 따라 88~90%의 생존율을 보였다. 이 같은 결과는 GA_3처리로 재생된 식물체에서도 유사하게 관찰되었다. 따라서 음나무의 저온저장된 배발생 캘러스로부터 재생된 식물체의 순화율은 90% 내외로 나타났고 큰 어려움 없이 순화되었다.

미세구조 관찰 및 염색반응

배발생능이 가장 좋았던 ZE 10 세포주를 재료로 저온저장별 세포 미세구조의 관찰결과는 Fig. 5와 같다. 음나무의 전형적인 배발생 캘러스는 희거나 노란색이며, 작고 구형으로 이루어진 세포로 구성되는데(Moon et al. 2008; Park et al. 2011) 미세구조에서도 비교적 균일한 크기의 세포 집단으로 세포내 함유물이 충만하고 많은 전분(amyloplasts)을 가졌으며(Fig. 5A, A-1), 아세토카민에 강하게 반응하여 붉은 색을 띄는 것으로 나타났다(Fig. 5A-2). Luciano et al. (2012)은 *Byrsonima intermedia*의 캘러스의 배양에서 배발생능을 알아내는 것은 체세포배발생 유도에 중요하며, 아세토카민과 에반스블루와 같은 간단한 염색 기술로 세포간의 활력 차이를 밝힐 수 있다며 배발생능을 가진 cell은 아세토카민에 강하게 반응하여 짙은 붉은색을 나타낸다고 하였다. 이와 유사한 염색 반응의 결과들이*Araucaria angustifolia* (Steiner et al. 2005), *Coffea arabica* (Gatica-Arias et al. 2008), *Carica papaya* L. (M. Munhoz et al. 2008)에서

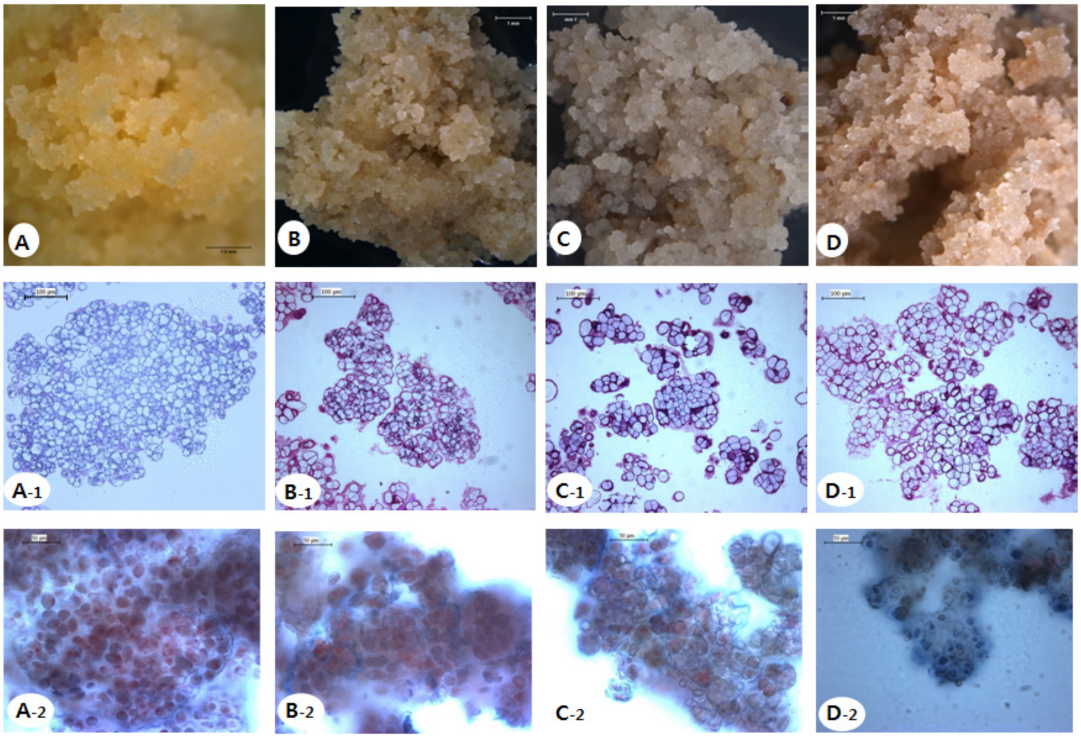

Fig. 5 Embryogenic cell types and morphological observation of *Kalopanax septemlobus* after cold storage (4°C). A, B, C and D designate the stored callus after 0, 1, 3 and 6 months, respectively. A, A1, A2 and the other series designate cell histology or staining response with aceto-carmine and Evans-blue

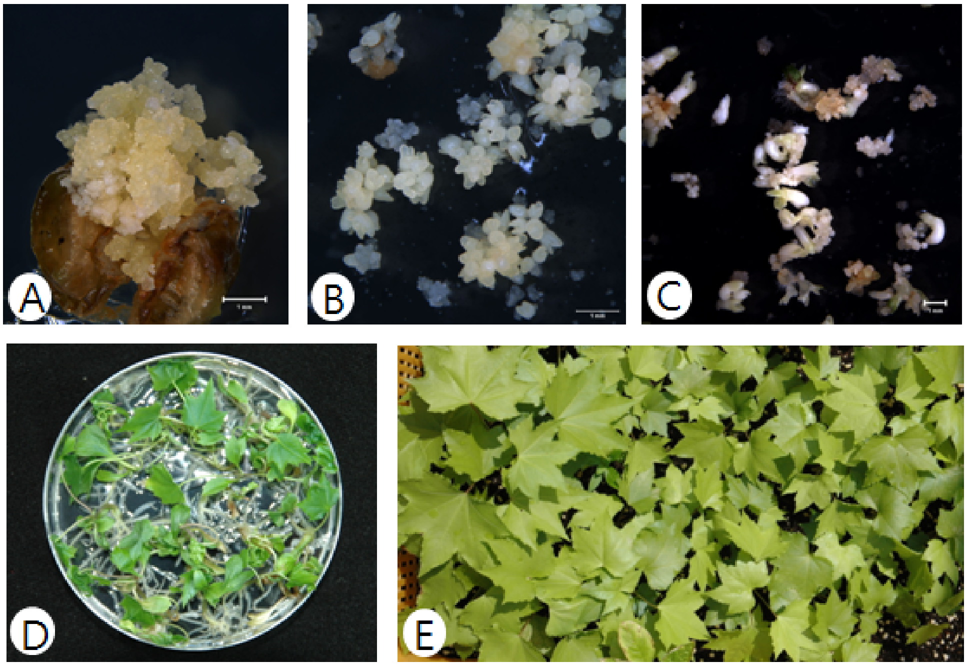

Fig. 6 Somatic embryogenesis and plantlets regeneration of *Kalopanax septemlobus*. (A) Embryogenic calli induced from immature seed, (B) Torpedo stage somatic embryos in normal culture room, (C) Torpedo stage somatic embryos regenerated from cold-stored embryogenic calli for 6 months at 4°C, (D) Normally converted plantlets from (C), (E) acclimatized plants of the (D) in greenhouse condition

보고되었다.

한편 저온저장한 캘러스는 시간 경과에 따라 갈변화가 나타났으며, 갈변화의 정도는 저장 기간에 비례하여 나타났고(Fig. 5B, C, D), 미세구조에서도 저장기간에 따라 세포내의 전분과 세포질이 소실되는 것으로 관찰되었다(Fig. 5B-1, C-1, D-1). 이 같은 결과는 Park et al. (1993)이 *Mentha viridis*의 캘러스를 저온저장 시 갈변화 정도가 저장 기간에 비례하고 온도에 있어서도 5°C보다 10°C에서 갈변화의 진행정도가 더 빠르게 진행되었다는 결과와 유사하였다. Kim et al. (2009)은 세포의 갈변화는 세포의 활력감소를 의미한다고 하였는데 본 실험에서 저온저장 기간이 길어지면서 세포의 갈변화가 진행되고 이로 인해 SE 유도빈도가 저조해진 것으로 생각된다(Fig. 5B-1, C-1, D-1). Park et al. (2011)은 음나무의 배발생능에 영향을 미치는 요인 중 하나가 캘러스의 노화에 있으며, 2년 이상 된 캘러스는 세포질이 거의 없고 액포가 많은 반면 6개월 된 캘러스는 세포질이 풍부함을 관찰하였다. Oropeza et al. (2001)도 사탕수수의 배발생 캘러스에서 이와 유사한 관찰을 보고하였다.

요 약

본 연구는 약용 및 식용으로 유망한 음나무의 대량생산 및 생식질 보존을 위한 기초 자료를 제공하기 위해 배발생 조직을 재료로 저온저장 기간별 SE 유도 및 식물체 재생을 시험하였다. 배발생 캘러스는 저온저장 6개월까지 정상적인 체세포배 형성이 가능하였으나 유도 빈도는 저장 기간에 따라 감소하는 경향을 보였다. 배발생능이 가장 좋은 ZE 10 세포주은 체세포배 유도 빈도에 있어 저장 기간에 따른 감소폭이 비교적 적은 것으로 나타났다. 체세포배의 발아 및 식물체 재생은 캘러스의 저장기간에 따라 다소 감소하는 경향을 보였으나 발아율은 93% 이상, 식물체 재생율은 91% 이상으로 저온저장에 따른 큰 문제는 없었다. 조직검경 결과 저장 기간에 따라 세포의 갈변화 및 활력 저하가 나타났으며, 아세토카민과 에반스블루의 염색을 통해서도 확인되었다. 이상의 결과로 볼 때 음나무 배발생 캘러스의 저온저장은 계대배양 없이 4°C의 냉장고에서 6개월 까지 가능한 것으로 나타났으며, 저장 후 체세포배 유도효율을 위해 배발생능이 양호한 세포주의 저장이 필요한 것으로 관찰되었다.

References

An CS, Wang XD, Yuan XF, Zhao B, Wang YC (2003) Optimization of cryopreservation of *Artemisia annua* L. callus. Biotechnol Lett 25:35-38

Andrade GM, Merkle SA (2005) Enhancement of American chestnut somatic seedling production. Plant Cell Rep 24:326-334

Beatrice Assy-Bah, Florent Engelmann (1993) Medium-term

conservation of mature embryos of coconut. Plant Cell Tiss Org 33:19-24

Capuana M, Petrini G, Di Marco A, Giannini R (2007) Plant regeneration of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) by somatic embryogenesis. In Vitro Cell Dev Biol Plant 43:101-110

Caruso M, Crespi-Perellino L, Garofano L, Guicciardi A (1987) Long-term storage of Vinca minor and Panax ginseng cell cultures. Proc Adv Stud Inst on Plant Cell Biol Albufeira (Algave) Portugal 29:1-4

Choi JW, Huh K, Kim SH, Lee KT, Lee HK, Park HJ (2002a) Kalopanaxsaponin A from *Kalopanax pictus*, a potent antioxidant in the rheumatoidal rat treated with Freund's complete adjuvant reagent. J Ethnopharmacol 79:113-118

Choi JW, Huh K, Kim SH, Lee KT, Park HJ, Han YN (2002b) Antinociceptive and anti-rheumatoidal effects of *Kalopanax pictus* extract and its saponin components in experimental animals. J Ethnopharmacol 79:199-204

Corredoira E, Ballester A, Vieitez AM (2003) Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill somatic embryos originated from leaf explants. Anal Bot 92:129-136

El-Ashry, AA, Shaltout AD, El-Bahr MK, Abd El Hamid, Matter MA, Bekheet SA (2013) *In vitro* preservation of embryogenic cultures of two Egyptian dry date palm cultivars at darkness and low temperature conditions. J Appl Sci Res 9(3):1985-1992

Engelmann F (1991) In vitro conservation of tropical plant germplasm-a review. Euphytica 57:227-243

Ford CS, Jones NB, Van Staden J. (2000) Cryopreservation and plant regeneration from somatic embryos of *Pinus patula*. Plant Cell Rep 19:610-615

García-Martín G, Gonzalez-Benito ME, Manzanera JA (2001) *Quercus suber* L. somatic embryo germination and plant conversion: pretreatments and germination conditions. In Vitro Cell Dev Biol Plant 37:190-198

Gatica-Arias AM, Arrieta-Espinoza G, Esquivel AME. (2008) Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuaí, Electron J Biotechnol 11:1-12

Gebhardt K, Fruhwacht-Wilms U, Weisgerber H (1993) Micropropagation and restricted-growth storage of adult oak genotypes. Ann Sci For 50(1)323s-329s

Hiraoka N, Kodama T (1984) Effects of non-frozen cold storage on the growth, organogenesis and secondary metabolism of callus cultures. Plan Cell Tiss Organ Cult 3(4):349-357

Ikeda-Iwai M, Umehara M, Satoh S, Kamada H (2003) Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. Plant J 4:107-114

Jayasankar S, Van Aman M, Li Z, Gray DJ (2001) Direct seeding of grapevine somatic embryos and regeneration of plants. In Vitro Cell Dev Biol Plant 37:476-479

Junaid Aslam, Mujib A, Sharma MP (2011) Influence of freezing and non-freezing temperature on somatic embryogenesis and vinblastine production in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Acta Physiol Plant 33:473-480

Kim DH, Bae EA, Han MJ, Park HJ, Choi JW (2002) Metabolism of kalopanaxsaponin K by human intestinal bacteria and antirheumatoid arthritis activity of their metabolites. Bio Pharm Bull 25:68-71

Kim JH, Moon HK, Park JI (1986) Haploid plantlet induction through anther culture of *Populus maximowiczii*. Res Rep Inst For Gen Kor 22:116-121

Kim MA, Park JK (2002) High frequency plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) calli immobilized in calcium alginate gel. Biotechnol Bioprocess Eng 7:206-211

Kim SJ, Moon HK (2009) Establishment of suspension culture condition for embryogenic callus proliferation and somatic embryo development of *Kalopanax septemlobus*. J Plant Biotechnol 36(1):7-12

Kim SJ, Yaser Hassan Dewir, Moon HK (2011) Large-scale plantlets conversion from cotyledonary somatic embryos of *Kalopanax septemlobus* tree using bioreactor cultures. J Plant Biochem Biotechnol 20(2):241-248

Kulkarni VM, Ganapathi TR (2009) A simple procedure for slow growth maintenance of banana (*Musa* spp.) embryogenic cell suspension cultures at low temperature. Curr Sci 96:1372-1377

Lambardi M, Fabbri A, Caccavale A. (2000) Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of in vitro-grown shoot tips. Plant Cell Rep 19:213-218

Lee EB, Li DW, Hyun JE, Kim IH, Whang WK (2001) Anti-inflammatory activity of methanol extract of *Kalopanax pictus* bark and its fractions. J Ethnopharmacol 77:197-201

Luciano Coutinho Silva1, Renato Paiva1, Diogo Pedrosa Corrêa Da Silva1, Sandro Barbosa, Raírys Cravo (2012) Characterization of pro-embryogenic calli and somatic embryogenesis of *Byrsonima intermedia* A. Juss. J Agr Sci Technol 2:962-970

Luo JP, Jiang S, Pan LJ (2003) Cold-enhanced somatic embryogenesis in cell suspention cultures of *Astragalus adsurgens* Pall.:relationship with exogenous calcium during cold pretreatment. Plant Growth Regul. 40:171-177

Manzanera JA, Astorga R, Bueno MA (1993) Somatic embryo induction and germination in *Quercus suber* L. Silvae Genet 42:90-93

Mauri PV, Manzanera JA (2004) Effect of abscisic acid and stratification on somatic embryo maturation and germination of holm oak (*Quercus ilex* L.). In Vitro Cell Dev Biol Plant 40:495-498

Maurizio Capuana, Sara Di Lonardo (2013) *In vitro* conservation of chestnut (*Castanea sativa*) by slow growth. In Vitro Cell Dev Biol Plant 49:605-610

Merkle SA, Battle PJ, Ware GO (2003) Factors influencing production of inflorescence-derived somatic seedlings of sweetgum. Plant Cell Tiss Org 73:95-99

Mingliang Chai, Yufang Jia, Shu Chen, Zhongshan Gao, Hefei Wang, Lulu Liu, Peijia Wang, Daqiang Hou (2011) Callus induction, plant regeneration, and long-term maintenance of embryogenic cultures in *Zoysia matrella* [L.] Merr. Plan Cell Tiss Organ Cult 104:187-192

Monette PL (1986) Cold storage of kiwifruit shoot tips in vitro. HortScience 21:1203-1205

Moon HK, Kim JH (1987) Cold storage of *Populus* spp. Shoot tips *in vitro*. Kor J Plant Tiss Cult 14:137-140

Moon HK, Kim SH, Kim BK (2002) Micropropagation of *Kalopanax pictus* Nakai via axillary bud cultures. J Kor For Soc 91:775-780

Moon HK, Kim YW, Lee JS, Choi YE. (2005) Micropropagation of *Kalopanax pictus* tree via somatic embryogenesis. In Vitro Cell Dev Biol Plant 41:303-306

Moon HK, Park SY, Kim YW, Kim SH (2008) Somatic embryogenesis and plantlet production using rejuvenated tissues from serial grafting of a mature *Kalopanax septemlobus* tree. In Vitro Cell Dev Biol Plant 44:119-127

Moon HK, Lee Hs, Paek KY, Park SY (2015) Osmotic stress and strong 2,4-D shock stimulate somatic-to-embryogenic transition in *Kalopanax septemlobus* (Thunb.) Koidz. Acta Physiol Plant 37:1710

Munhoz M, Luz CFP, Meissner Filho PE, Barth OM, Reinert F (2008) Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparcao metodológica. Rev Bras Bot 31(2):209-214

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497

Oropeza M, Marcano AK, Garcia ED (2001) Proteins related with embryogenic potential in callus and cell suspensions of sugarcane (*Saccharum* sp.). In Vitro Cell Dev Biol Plant 37:211-216

Park HJ, Kim DH, Choi JW, Park JH, Han YN (1998) A potent anti-diabetic agent from *Kalopanax pictus*. Arch Pharm Res 21:24-29

Park SY, Cho HM, Moon HK, Kim YW, Paek KY (2011) Genotypic variation and aging effects on the embryogenic capability of *Kalopanax septemlobus*. Plant Cell Tiss Organ Cult 105:265-270

Park SU, Chae YA (1993) Effects of subculture and cold storage on essential oil content and its composition in the callus of *Mentha viridis* L. Kor J Breed 25(2):128-132

Pennycooke JC, Towill LE (2000) Cryopreservation of shoot tips from in vitro plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by vitrification. Plant Cell Rep 19:733-737

Porzel ATV, Schmidt SJ, Lischewski M, Adam G. (1992) Studies on the chemical constituents of *Kalopanax septemlobus*. Planta Med 58:481-482

Richard W, Joy IV, Prakash P, Kumar, Trevor A, Thorpe (1991) Long-term storage of somatic embryogenic white spruce tissue at ambient temperature. Plant Cell Tiss Org 25:53-60

Shao CJ, Kassi R, Ohtani K, Kohda H (1990) Saponins from leaves of *Kalopanax pictus* Nakai, Harigiri. Stuctures of kalopanax-saponins JLa and JLb. Chem Pharm Bull 38:1087-1089

Sheng-Hui Xue, Xin-Juan Luo, Zhen-Hua Wu, Hui-Li Zhang, Xin-Yu Wang (2008) Cold storage and cryopreservation of hairy root cultures of medicinal plant *Eruca sativa* Mill., Astragalus membranaceus and Gentiana macrophylla Pall. Plant Cell Tiss Org 92:251-260

Shiota H, Tachibana K, Watabe K, Kamada H (1999) Successful long-term preservation of abscisic-acid-treated and desiccated carrot somatic embryos. Plant Cell Rep 18:749-753

Souza JMM, Tomaz ML, Arruda SCC, Demetrio CGB, Venables WN, Martinelli AP (2011) Callus sieving is effective in improving synchronization and frequency of somatic embryogenesis in *Citrus sinensis*. Biol Plantarum 55(4):703-707

Steiner N, Vieira FN, Maldonado S, Guerra MP (2005) Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. Braz Arch Biol Techn 48:895-903

Teresa Martínez, Elena Corredoira, Silvia Valladares, Lorena Jorquera, Ana M. Vieitez (2008) Germination and conversion of somatic embryos derived from mature *Quercus robur* trees: the effects of cold storage and thidiazuron. Plant Cell Tiss Organ Cult 95:341-351

Withers LA (1991) Tissue culture in the conservation of plant genetic resources. In: Zakri AH, Normah MN, Senawi MT & Abdul Karim AG (Eds) Conservation of plant genetic resources through *in vitro* methods (pp 1-18). Forest Research Institute Malaysia/Malaysian National Committee on Plant Genetic Resources, Kuala Lumpur, Malaysia1

Xu PW, Qu SS, Liu HY, Zhang J, Sun JB, Huang BY (2002) A preliminary study on in vitro conservation of the garlic germplasm resources in China. Scientia Agricultura Sinica 35(3):314-319

Zhang GQ, Zhang DQ, Tang GX, He Y, Zhou WJ (2006) Plant development from microspore-derived embryos in oil seed rape as affected by chilling, desiccation and cotyledon excision. Biol Plant 50:180-186

Zych Monika, Furmanowa Miroslawa, Krajewska-Patan Anna, Lowicka Anna, Dreger Mariola, Mendlewska Sylwia (2005) Micropropagation of *Rhodiola Kirilowii* plants Using encapsulated axillary buds and callus. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 47(2):83-87