

## 두릅캘러스의 현탁배양에서 체세포배발생과 식물체 재분화

장한호 · 박철호\*<sup>1</sup> · 이윤수<sup>1</sup> · 신영범  
강원대학교 농과대학 농학과, 강원대학교 농과대학 자원식물개발학과

### Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Suspension Cultures of *Aralia elata* S.

Han Ho JHANG, Cheol Ho PARK\*<sup>1</sup>, Yun Soo LEE<sup>1</sup> and Young Boum SHIN

Department of Agronomy; and Department of Plant Resources<sup>1</sup>, College of Agriculture, Kangwon  
National University, Chuncheon, 200-701. \*Corresponding author.

This study was carried out to investigate the possibility of plant regeneration through somatic embryogenesis in suspension culture of *Aralia elata* S. Callus was induced from the explants of leaf and petiole cultured in the MS media containing 2,4-D and TDZ. More embryogenic calli were formed from petiole and with combination treatment of 2,4-D and TDZ. The quarter strength MS medium was effective for increasing number of somatic embryos. Mannitol, supplemented to the quarter strength MS medium, reduced somatic embryo formation but inositol increased. Normal plantlets(86%) were regenerated from mature somatic embryos in MS basal medium and 50% of those survived when transplanted to the vermiculite in greenhouse.

Key words: TDZ (Thidiazuron)

두릅나무는 두릅나무과(Araliaceae)의 다년생 낙엽관목으로서 옛부터 새순은 독특한 맛과 많은 영양소를 가지고 있어 산채로서 식용되어 왔고 根皮나 樹皮는 한약재로 이용해 왔다(Park and Lee, 1991). 종전에는 대부분 자연채취에 의존하여 왔으나 수요증가로 자원이 고갈되고 출하량이 저하하면서 근년에는 산채자원의 보호와 증식을 목적으로 두릅의 노지재배 및 축성재배가 이루어지고 있다. 1993년에 전국에서 105ha의 면적에 두릅을 재배하여 344M/T을 생산하였으며 이는 전년도 대비 20%의 증가를 가져온 것이다.

두릅나무의 번식은 종자와 根插으로 가능하나 종자번식은 장기간 노천매장을 해야하고 발아율이 낮으며 근삽은 최야 가능한 根菜時期가 초봄의 1-2개월에 국한되고 근의 절단이 치명적인 두릅의 입고역병의 발생원인이 되기도 한다(Amemiya et al., 1990). 또한 농촌의 노동력 부족과 자생 근락지 보호 등 야생채취에 따르는 여러 가지 제약으로 말미암아 건전한 두릅종묘의 효율적인 인공대량생산은 필요 불가결한 과제이다. 따라서 최근 조직배양기술의 발달로 다

수의 목본식물에 있어서도 조직배양에 의한 식물체의 분화가 보고되고 있으므로(Park and Kim, 1992) 두릅도 조직배양에 의한 대량증식의 방법이 확립되면 년중 안정생산이 가능할 것이며 자생지에서의 남획도 방지하여 자연보호에도 기여할 수 있을 것으로 생각된다. 한편 두릅나무의 체세포배양에 의한 번식은 엽병 또는 엽육 캘러스로부터 부정아(Kaimori, 1986) 및 부정배(Amemiya et al., 1990; Jhang et al., 1993)의 형성을 통하여 가능한 것으로 보고되었다.

본 연구는 기내 현탁배양에서 체세포배 형성을 통하여 두릅의 종묘를 대량증식할 목적으로 배발생 캘러스 유도 및 체세포배발생에 적합한 배양조건을 구명하기 위하여 실시하였다.

#### 재료 및 방법

배발생 캘러스 유도

온실에서 생육하던 두릅의 어린 잎과 엽병을 채취하여 증류수로 3-4회 수세 후 70% ethanol에 30초간 침지하고, 0.5% sodium hypochlorite 용액에 10분간 흔들어서 표면 살균한 후 멸균수로 4-5회 세척하였다. 5-7 mm 크기의 절편체를 배지에 각각 40개씩 치상하였다. 배지는 MS (Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에 3% sucrose와 0.8% agar를 첨가하였고 2,4-D를 0.1, 0.5, 1, 2 mg/L 단독처리하거나 TDZ 0.1 mg/L씩을 혼합처리하였다. 배지의 pH는 5.7로 조절하였으며 시험관 (24 × 15 cm)에 10 ml의 배지를 분주하고 고압멸균하였다. 배양조건은 25°C에서 1,500 Lux의 형광등하에서 16시간 일장으로 배양하였다. 캘러스 유도율은 치상조직 중에서 유도된 조직의 수를 조사하였고, 배발생 캘러스의 빈도는 유도된 캘러스 중에서 노랑고, 조직이 치밀하면서 둥근 형태의 부위를 백분율로 조사하였다.

### 현탁배양에 의한 체세포배 생산

배발생 캘러스를 잘게 부수어 60 mesh의 체를 통과시켜 현탁배양 시료로 사용하였고 100 mL 삼각플라스크에 배양액(처리된 MS 기본배지) 20 mL과 시료 3 mL(약 0.01 g)씩 가하여 3반복으로 배양하였다. 교반속도는 100 rpm으로 하였고 배양조건은 위의 실험과 동일하였다. 7일 간격으로 새로운 배지에 계대배양하였고, 체세포배발생은 3일 간격으로 해부현미경하에서 관찰하였다. 현탁배양에서 체세포배 발생에 적합한 MS배지농도 및 삼투조절제 처리조건을 규명하기 위하여 MS배지의 농도를 2 × MS, 1 × MS, 1/2 × MS, 1/4 × MS, 1/8 × MS로 처리하였다. 삼투조절제는 1/4 × MS 배지에 sucrose를 1.5%씩 처리하고 inositol과 mannitol을 각각 0, 0.5, 1, 2, 3%씩 첨가하였다.

### 식물체 재생 및 이식

현탁배양에서 형성된 성숙한 체세포배를 성장조절제를 첨가하지 않은 MS 기본배지에 치상하여 4주간 배양하여 식물체를 재생시켰고 재생된 식물체를 버미큐라이트포트에 이식하여 온실에서 재배하였다.

## 결과 및 고찰

### 배발생 캘러스 유도

배발생 캘러스를 유도하기 위해 2,4-D 농도별 단독처리와 TDZ 0.1 mg/L씩 혼합처리된 MS 배지에 두릅나무의 어린 잎과 엽병을 배양한 결과 3주후에 절편부위로부터 캘러스가 형성되기 시작하였으며 6주후에는 조직이 부드럽고 하얀 캘러스와 조직이 단단하면서 노랑고 둥글둥글한 배발생

**Table 1.** Effect of plant growth regulators on callus induction from petiole culture of *Aralia elata* S. after 6 weeks.

Treatments (mg/L)	Fresh weight (mg/test tube)	Induction rate (%)	Frequency of EC <sup>a</sup> (%)
2,4-D 0.1	121	35	25
0.5	351	50	15
1	920	65	10
2	1160	70	10
2,4-D 0.1 + TDZ 0.1	143	75	45
0.5 + TDZ 0.1	317	80	50
1.0 + TDZ 0.1	794	90	55
2.0 + TDZ 0.1	958	90	50

<sup>a</sup>Embryogenic callus.

캘러스가 유도되었다. 배양조직은 어린 엽보다 엽병에서 캘러스 유도가 양호하였다. 2,4-D 단독처리에서는 농도가 높을수록 캘러스 유도량과 유도율은 양호하였으나 배발생 캘러스의 빈도는 저조하였다. 반면 TDZ 혼합처리에서는 캘러스 유도량은 전반적으로 줄었지만 배발생 캘러스의 빈도는 높은 편이었으며, 2,4-D 1.0, 2.0 mg/L + TDZ 0.1 mg/L 처리에서 캘러스 유도량과 배발생 캘러스의 빈도가 가장 양호하였다(표 1).

Kaimori (1986)과 Amemiya 등(1990)은 2,4-D 1.0 mg/L의 단독처리와 2,4-D 1.0 mg/L + BA 0.1-1.0 mg/L를 첨가한 배지에 두릅의 엽병을 배양하여 캘러스를 효과적으로 유도하였다. 반면 Jhang 등(1993)은 두릅의 엽육배양에서 2,4-D 첨가배지에서는 캘러스를 얻지 못하고 TDZ 1.0 mg/L 단독처리에서 71%의 캘러스 유기율을 보고하였다. *Aralia cordata* (Lee and Soh, 1993)와 *A. contionalis* (Choi and Park, 1991)는 잎과 엽병조직 및 상배축과 하자엽을 각각 배양한 결과 2,4-D 1.0-2.0 mg/L 처리에서 배발생 캘러스의 유도 및 생장이 양호하였다고 하였으며 Park과 Choi (1992)는 1.0 mg/L의 TDZ이 처리된 배지에서 매실나무의 미숙배를 배양하여 57%의 캘러스 유도율을 보고하였다.

본 실험에서는 2,4-D와 TDZ의 단독처리보다 혼합처리가 배발생 캘러스의 유도에 효과적이었다. 그러나 2,4-D와 TDZ의 혼합처리에서 2,4-D의 농도에 따른 배발생 캘러스의 빈도차가 인정되지 않는 점은 간접적으로 TDZ가 배발생 캘러스 유도에 효과가 있음을 시사하는 것이다(Jhang et al., 1993).

### 현탁배양에서 체세포배 형성

2,4-D 1.0 mg/L + TDZ 0.1 mg/L 처리에서 유도된 배발

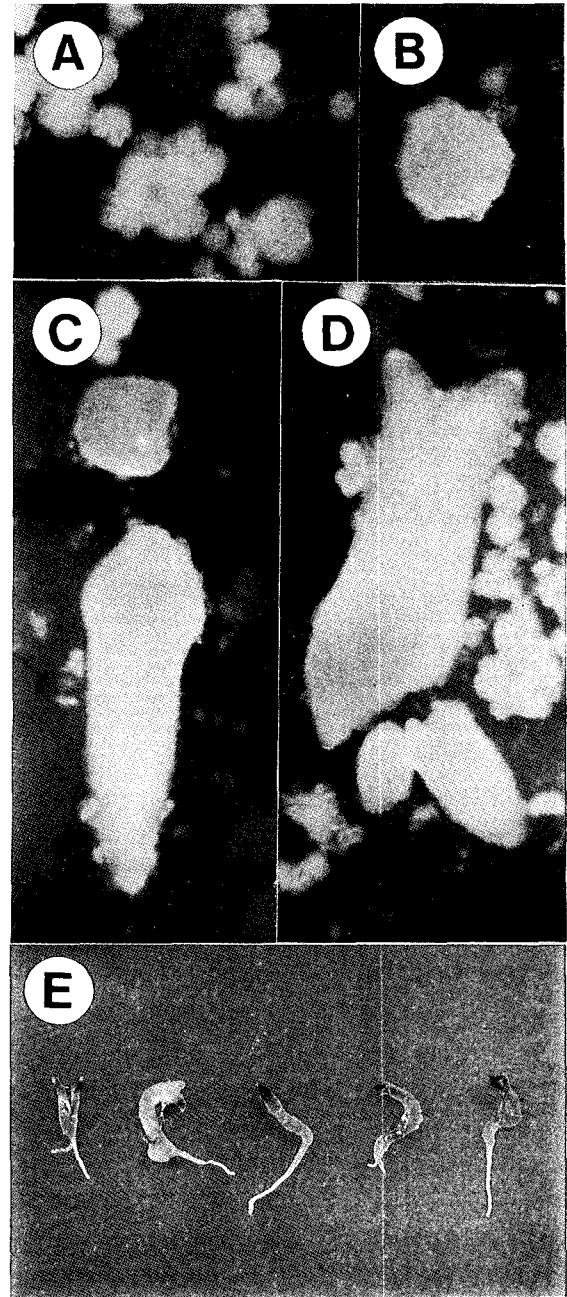
**Table 2.** Effect of strength of MS medium on somatic embryos formation in suspension culture of *Aralia elata* S. after 3 weeks.

Medium strength	Average no. of mature somatic embryos	Fresh weight /embryo (g)
2 × MS	0	
1 × MS	21	0.09
1/2 × MS	33	0.08
1/4 × MS	39	0.08
1/8 × MS	10	0.16

생 캘러스를 MS배지 농도별로 처리하여 3주간 현탁배양한 결과는 MS 기본배지의 농도를 1/4으로 줄인 1/4 × MS배지가 배형성과 생육에 가장 효과적이었으며 2 × MS, 1/8 × MS에서는 배형성이 억제되는 경향을 보였다(표 2). 2 × MS배지에서는 심장형배 이상의 배발육은 보이지 않았다. Litz와 Conover (1983)는 *carica*를 현탁배양할때 MS배지에서 캘러스 유도 및 증식을 시킨 후 1/2 × MS배지에서 효율적으로 체세포배를 형성한 반면 Kim 등(1993)은 구기자나무의 엽육캘러스 배양에서 2,4-D (0.6 μM)와 BA (0.001 μM)가 첨가된 3/2 × 배지를 사용하여 가장 많은 수의 체세포배를 형성하였다. *Triticum aestivum* L.의 체세포배 발생에서는 MS배지의 무기염류 농도를 2배로 하였을때 더욱 효과적임을 보고하였다(John et al., 1988).

두릅캘러스의 현탁배양에서 체세포배의 발달과정을 살펴보면 배양 7일 후 배발생 세포괴와 구형배가 형성되었고 14일후에는 심장형배와 어뢰형이 관찰되었으며 20일후에는 자엽형배와 완전히 성숙한 배들이 형성되었다(Figure 1). Amemiya 등(1990)과 Jhang 등(미발표)은 성장조절제가 첨가되지 않은 MS 고체배지에 배양된 두릅의 배발생 캘러스로부터 구형배-심장형배-어뢰형배-성숙배로 생육하는 부정배를 관찰하였으나 본 연구에서는 액체진탕배양으로 급속히 대량의 체세포배를 형성할 수 있었다.

1/4 × MS 배지에 sucrose 1.5%와 inositol 0.5%, 1%를 각각 혼합처리한 배양액에서 체세포배의 발생이 가장 양호하였다(표 3). 그러나 inositol 1%처리에서는 배발생 단계가 비교적 균일하고 체세포배의 발육이 대체로 정상적인 반면 무처리와 0.5%처리에서는 비정상적인 체세포배가 많았으며 배발생 단계가 균일하지 못하였다. Sucrose 1.5%에 inositol 농도를 2, 3%로 높였을 경우에는 체세포배 발생이 억제되었다. 그러나 체세포배의 개당 생체중은 다른 처리에 비하여 높았다. 일반적으로 에너지공급원과 삼투압조절을 목적으로 배지에 첨가하는 sucrose는 첨가농도에 따라 체세포배 형성 양상에 영향을 미치며 sucrose 농도는 3-6%가 적당하고 6% 이상의 고농도에서는 체세포배 발생이 억제되며 흔히 비정상적인 체세포배가 발생한다(Kim et al., 1987;

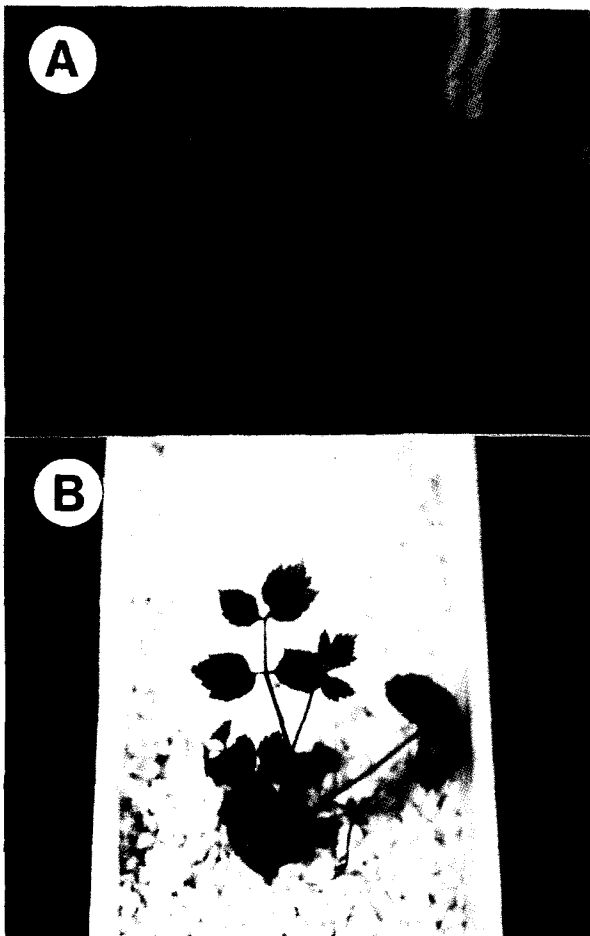


**Figure 1.** Developmental stages of somatic embryos during suspension culture of *Aralia elata* S. A: Cell clusters and proembryos, B: Globular stage embryo, C: Early Heart and torpedo stage embryo, D: Cotyledonary stage embryo, E: Mature embryos.

Ammirato, 1977). 본 연구에서도 유사한 경향을 보여 inositol 1% 처리가 체세포배 형성의 촉진 뿐만 아니라 배발생의 동조화 및 비정상적인 배발생의 억제효과를 나타내어 두릅나무의 체세포배발생에 효과가 있는 것으로 생각된다. 그러나 mannitol 처리는 체세포배 발생이 전혀 이루어지지 않아

**Table 3.** Effect of 1.5% sucrose with various concentration of inositol and mannitol on somatic embryos formation in suspension culture of *Aralia elata* S. after 3 weeks.

Osmoticum (%)	Average no. of mature somatic embryos	Fresh weight /embryo (g)
Sucrose only	34	0.09
Inositol 0.5	41	0.09
1	46	0.07
2	16	0.13
3	5	0.18
Mannitol 0.5	0	
1	0	
2	0	
3	0	



**Figure 2.** Plant Regeneration of *Aralia elata* S. A: Regenerated plantlets from somatic embryos. B: A plant transplanted in the pot.

innositol과 상반된 결과를 나타냈다. 이와 같은 결과는 Susan과 Leela(1990)가 *Eleusine coracana* G. (finger millet)배양에서 sucrose와 sorbitol이나 mannitol을 혼합처리하여 오히려 sucrose 단독처리보다도 체세포배 발생이나 식물체분화가 저조함을 보인 것과 유사하였으며 비의 장기배양에서 sucrose와 sorbitol 또는 mannitol을 혼합처리하여 식물체분화가 촉진된 (Kavi Kishor, 1987) 경우와는 상반되므로 여러 수준의 농도에서 sucrose와 mannitol의 혼용효과를 재검토해 볼 필요가 있다.

**식물체 분화 및 이식**

식물체 분화는 현탁배양에서 형성된 성숙한 체세포배를 성장조절제가 처리되지 않은 MS 기본배지에 치상하여 배양 4주후에 정상적인 유식물로 발달하였다(Figure 2-A). 200개의 체세포배를 재분화배지에 치상하여 40일후에 172개(86%)의 정상식물체가 재분화하였다. 그러나 나머지 28개체는 재분화 도중에 엽병의 투명화가 심하여 정상적인 유식물로 발달하지 못하였다. Amemiya 등(1990)은 고체배지에서 형성된 부정배를 성장조절제가 첨가되지 않은 MS 기본배지에 치상하여 96%의 식물체를 재분화하였으나 그 중 59%만이 정상인 유식물로 발달하였음을 보고하였다. 본 실험에서는 그밖에 재분화 식물체로부터 직접 캘러스나 체세포배가 이차적으로 발생하여 Amemiya 등(1990)의 연구결과와 유사한 경향을 보였다. 또한 60일후에 정상의 재분화식물체는 순화과정을 거쳐 온실로 옮겨 버미큐라이트에 이식한 결과 50%의 토양활착율을 보였다(Figure 2-B). 따라서 체세포배를 이용하여 두릅의 건전한 종묘를 안정적으로 생산하기 위해서는 체세포배의 기내분화과정에서 투명화 및 캘러스화를 억제하고 토양활착율을 증대시키기 위한 실험이 보충되어야 할 것이다.

**적 요**

두릅나무의 현탁배양에서 체세포배 형성과 식물체 재생의 가능성을 알아보고자 배발생 캘러스 유도조건과 배지농도 및 삼투조절제의 영향을 조사하였다. 어린 엽보다 엽병에서 캘러스 유도가 양호하였고, 2,4-D 단독처리보다는 2,4-D 1.0, 2.0 mg/L + TDZ 0.1 mg/L 처리에서 캘러스 유도량과 배발생 캘러스의 빈도가 가장 양호하였다. MS 기본배지의 농도를 1/4으로 줄인 1/4 × MS배지가 배형성과 생육에 가장 효과적이었으며 2 × MS, 1/8 × MS에서는 배형성이 억제되는 경향이였다. 1/4 × MS 배지에 sucrose 1.5%를 처리하고 mannitol을 첨가했을 때는 체세포배 발생이 억제되었지만 inositol의 경우 체세포배 형성을 촉진할 뿐만 아니라 배발생의 동조화와 비정상적인 배발생의 억제효과도 있었

다. 식물체 분화는 현탁배양에서 형성된 성숙한 체세포배를 생장조절제가 처리되지 않은 MS 기본배지에 치상하여 배양 4주 후에 86%의 정상식물체를 얻을 수 있었고 분화식물체를 순화과정을 거쳐 버미큐라이트에 이식한 결과 50%의 토양활착율을 보였다.

## 인 용 문 헌

- Amemiya K, Fujiki T, Hyuga S (1990) Mass propagation by tissue culture in Japanese Angelica tree (*Aralia elata* S.). Annual Report of Yamanashi Agricultural Experiment Station 5: 11-22
- Ammirato PV (1977) Hormonal control of somatic embryo development from cultured cells of caraway. Plant Physiol 59: 579-586
- Choi EG, Park HB (1991) Effect of regulators on the callus formation and organogenesis in *Aralia continentalis* Kitagawa. Bulletin of the Agricultural college, Chunbuk National University 22: 153-159
- Jhang HH, Park CH, Cho DH, Shin YB (1993) Callus induction and plant regeneration from leaf tissue culture of *Aralia elata* S. Korean J Crop Sci 38: 366-370
- John GC, Nancy EJ, William FC (1988) Induction of embryogenic *Triticum aestivum* L. calli. I. Quantification of genotype and culture medium effects. Plant Cell Tiss Org Cult 12: 83-95
- Kaimori N (1986) Mass propagation of Japanese Angelica tree (*Aralia elata* S.) through biotechnology. Agri Horti 61: 75-77
- Kavi Kishor PB (1987) Energy and osmotic requirement for high frequency regeneration of rice plants from long term cultures Plant Sci 48: 189-194
- Kim BW, Choi MS, Roh KS, Park YG (1993) Somatic embryogenesis from leaf callus of *Lycium chinese* Mill. Korean J Plant Tissue Culture 20: 91-96
- Kim YH, TY Chang, WY Choi (1987) Effects of sucrose and ABA on somatic embryogenesis in celery (*Apium graveolens* L.). Korean J Plant Tissue Culture 14: 123-130
- Lee KS, Soh WY (1993) Somatic embryogenesis and structural aberrancy of embryos in tissue cultures of *Aralia cordata* Thunb. Korean J. Plant Tissue Culture 20: 77-83
- Litz RE, Conover RA (1983) High frequency of somatic embryogenesis from *carica* suspension cultures. Ann Bot 51: 683-686
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15: 473-497
- Park CH, Lee KC (1991) Principle of edible wild vegetables production. Sunjin Pub. Co., Seoul pp 164-165
- Park HB, Choi EG (1992) Plant regeneration and somatic embryogenesis from immature embryo of Japanese Apricot (*Prunus mume* Sieb et Zucc). Korean J. Plant Tissue Culture 19: 261-266
- Park YG, Kim JH (1992) Tissue culture in forest plant biotechnology. In JD Chung, Kyungbuk National University Press, Taegu, pp 451-502
- Susan E, Leela G (1990) Influence of phytohormones, carbohydrates, aminoacids, growth supplements and antibiotics on somatic embryogenesis and plant differentiation in finger millet. Plant Cell Tiss Org Cult 22: 87-93

(1994년 4월 1일 접수)