

가시오갈피 미숙배로부터 Callus 형성 및 식물체 재분화에 미치는 배의 성숙정도 및 배지의 효과

유창연, 임정대, 성은수, 김재광
강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부

Effect of Embryo Maturity and Medium on Callus Formation and Plant Regeneration from Immature Embryos of *Eleutherococcus senticosus*

Chang Yeon Yu, Jung Dae Lim, Eun Soo Seong, and Jae Kwang Kim
Division of Applied Plant Sciences, College of Agriculture and Life Sciences,
Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to establish mass propagation system from the tissue culture using immature embryos in *Eleutherococcus senticosus*. Immature embryos from seeds were removed under the microscope and placed on modified SH and WPM medium containing several plant growth regulators. The calli were well formed on media containing 1mg/l of 2,4-D on modified SH medium and 1mg/l of 2,4-D and 3mg/l of TDZ on WPM medium. Shoot regeneration was better on modified SH or WPM medium with combination of high concentration of TDZ and low concentration of 2,4-D. Treatment of 2,4-D alone was better than treatment of TDZ alone in callus induction on modified SH medium but plant regeneration reversed. Treatment of 2,4-D and TDZ combination was better than treatment of 2,4-D alone in callus induction on WPM medium. The results of callus formation and shoot regeneration on WPM media differed to those of SH media. The rate of callus formation was nearly 83% when 2,4-D was added to SH medium on concentration of 1mg/l. The rate of callus formation was nearly 38% when combination treatment of 2,4-D 1mg/l and TDZ 3mg/l was added to WPM medium. Also, plant regeneration differed depending on the mature degree of immature embryo.

Key words : Immature embryo culture, embryo maturity.

서론

약용식물인 가시오갈피(*Eleutherococcus senticosus*)는 식물분류학상 인삼과 같이 오갈피과에 속하는 다년생 관목으로 강장, 혈당강하, 항스트레스, 스테미너보강, 항암효과 등이 있는 것으로 알려지고 있다.

일명 시베리아 인삼이라고도 하는 가시오갈피는 세계적으로 희귀하여 자생지역이 우리나라 지리산, 설악산, 오대산, 대관령 부근 등의 고산지대와 러시아 시베리아

동남부 지역, 일본 북해도 지방과 중국 일부지방으로 국한되어 있는 것으로 알려져 있다. 한약재가 가장 많이 거래되는 경동시장에서도 가시오갈피는 찾아보기 힘들며 일부 농가에서 소규모 재배하고 있는 것을 제외하고는 강남제약, 동신제약에서 원료를 수입하고 있으며 엘르르-F, 엘코크라는 이름으로 엑스를 제조 판매하고 있는 실정이다. 원료 수입량은 89년을 시작으로 매년 증가하고 있으며 그동안 여러가지 방법으로 번식시키려는 노력이 이루어져 왔으나 우리나라에서는 종자가 결실이 안될

본 연구는 한국과학재단 핵심전문연구비 지원에 의하여 수행되었음. 과제번호 9612-0602-018-2

뿐만 아니라 삼목율이 30%이하로 번식이 매우 힘든 식물 중의 하나이다(박 등, 1994). 가시오갈피에 대한 수요량은 계속 증가하여 제약회사에서 원료를 외국으로부터 수입을 하고 있으므로 가시오갈피의 대량번식 방법이 성공하여 표목대량생산 및 농가 재배면적이 증가한다면 의화절약 및 농가소득증대에 기여할 수 있을 것이다.

최근에 세포배양이 식물의 영양체 번식, 각종 저항성 선발, 돌연변이체 유기, 유용물질생산을 하는데 널리 활용되고 있다(Dyer 등, 1988; 유와 조, 1994). 그리고, 세포배양 중 배배양은 미숙배배양에 의한 육종년한의 단축, 반수체 생산, 교잡불화합성의 극복, 기내번식 배양재료 등에 널리 이용되고 있다(최, 1993; 김 등, 1994; 박 등, 1994). 또한, 배배양에서는 callus 유기와 식물체 재생의 효율을 높이는 데 중요한 목표가 되며 이를 위해 배의 성숙도와 호르몬의 효과에 관한 연구가 이루어지고 있다. Carla 등 (1996)은 *Alstroemeria spp.*의 endosperm이 연약할 때 half-ovules안의 미성숙배를 배양하여 배발생용 캘러스가 형성되었고 완전한 식물체를 재생산시키기 위해선 28주가 경과하였다고 보고하였다. 박 등 (1994)은 보리 미숙배배양시 배의 성숙정도가 식물체 분화에 영향을 미친다고 보고하였다.

따라서 본 연구는 가시오갈피의 조직배양을 통한 대량증식체계 확립의 일환으로 미숙배 배양시 배성숙정도 및 배지가 캘러스 형성 및 기관 분화에 미치는 영향을 구명하고자 실시되었다.

재료 및 방법

배배양의 재료로는 러시아 가시오갈피 종자를 사용하였으며 종자의 미숙배를 성숙시키기 위해 15℃ 조건하에 종자를 층적매장하여 60일 동안의 후숙과정을 거쳤다(그림 3-A). 후숙처리한 종자의 종피를 제거한 후 증류수로 2회 세척한 후 70% 에탄올에 30초정도 담가두었다. 멸균수로 수회 세척한 후 무균상에서 NaOCl 4%용액에 8분동안 소독하였고 소독한 재료는 다시 멸균수에 2-3회 세척한 후 광학현미경 하에서 배를 절취하여 배지에 치상하였다. 배지는 변형된 Schenk & Hildebrandt(SH salts + Woody Plant Medium vitamins) 배지와 WPM (Woody Plant Medium)배지, MS 배지를 기본으로하여 3%의 sucrose에 완전히 용해시킨 후 auxin류인 2,4-D 1, 2mg/l, cytokinin류인 TDZ 0.1, 1, 3, 10mg/l 의 농도로

단독처리하였고 2,4-D 0.1, 2mg/l, TDZ 0.1, 3mg/l 의 농도로 조합처리하였다. 생장조절물질 첨가 후 pH를 5.7로 조절하였으며 agar를 0.8% 첨가하였다. 각각의 배지는 10ml씩 시험관에 분주하였으며 이를 121℃, 1.5기압 이상의 조건으로 15분간 고압멸균하고 고체배지로 용고시켜 사용하였다.

위의 배지에 가시오갈피 배의 성숙크기에 따라 A, B, C로 구분하여 배를 절취하여 치상하고 23℃, 16시간 광조건하에서 배양하여 30일, 60일 후 캘러스 생성율과 분화된 식물체의 줄기수, 줄기길이 등을 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 미숙배 배양으로부터 callus 형성.

러시아 가시오갈피 종자를 60일 동안 층적매장하여 후숙처리하고 변형된 SH 배지, WPM 배지, MS 배지에 2,4-D와 TDZ를 단독처리하고 60일 경과 후 callus 생성율을 조사하여 본 결과 그림 1과 같이 SH 배지에 2,4-D 2mg/l 가 처리되었을 때에는 20%의 callus 형성율을 보였으며, WPM 배지에서는 2,4-D 1mg/l, 2,4-D 2mg/l 가 처리되었을 때 각각 20%, 22%의 callus 형성율을 보였다. MS 배지에 2,4-D 1mg/l, 2mg/l 처리시에는 각각 16.7%, 45.5%의 callus 형성율을 보였다.

TDZ 처리시에는 SH 배지, WPM 배지에서 10% 정도의 callus 형성율을 보였고 MS 배지에서는 callus 형성이 안되는 결과를 보여 가시오갈피의 미숙배 배양시에는 SH 배지에 2,4-D 1mg/l 를 처리하는 것이 가장 좋은 결과를 보였다. 이런 결과는 김 등 (1994)이 MS 배지에 2,4-D 1mg/l 처리시 양호한 callus의 생성을 보인 것

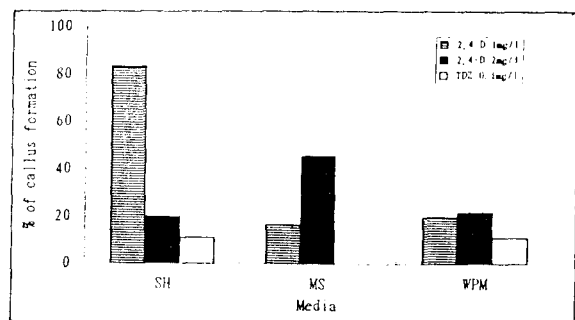


Fig. 1. The effect of plant growth regulators and media on callus formation from immature embryo culture in *E. senticosus*

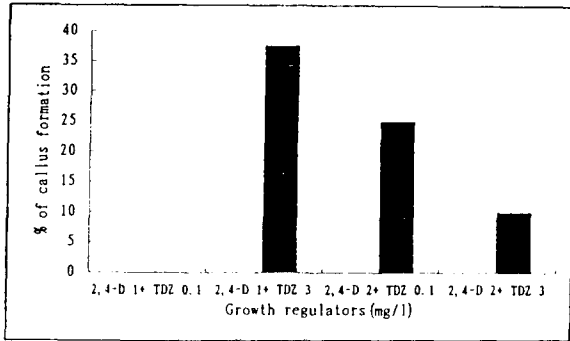


Fig. 2. The effect of plant growth regulators and media on callus formation on WPM medium from immature embryo culture in *E. senticosus*

과 일치하였지만 변형된 SH배지에서 MS배지에서 callus 생성보다 2배이상의 높은 callus 생성을 보였다(그림 3-B). WPM배지를 기본으로하여 2,4-D와 TDZ를 조합 처리한 경우의 실험결과(그림 2), 2,4-D 1mg/l 와 TDZ 3mg/l 가 조합처리되었을 경우에 가장 높은 callus 형성율인 37.5%의 callus 형성율을 보였으며 전체적으로 2,4-D를 첨가한 경우에 callus의 형성이 양호하였으나 WPM 배지에서는 SH배지보다 callus형성율이 저조하였다.

2. 배배양시 배의 성숙도에 따른 식물체 분화

러시아 가시오갈피 종자를 60일 동안 총적매장하여 후속처리하고 배의 성숙 정도를 A, B, C로 구분하여 2,4-D와 TDZ를 단독처리하여 변형된 SH배지와 WPM 배지에 60일 배양한 결과는 표 1과 같다. 전반적으로 신초 분화는 2,4-D를 처리했을 때 보다 TDZ를 처리했을 때 양호한 경향을 보였고 고농도인 2,4-D 2mg/l 처리에선 신초 분화가 저조하였다.

TDZ를 처리한 경우는 대체적으로 양호한 신초 분화를 나타냈지만 배의 성숙 정도가 C단계일 경우가 높은 신초 형성율을 보였고 SH 배지를 기본으로 2,4-D 1mg/l 에 배의 성숙정도가 C인 배를 배양했을 때 60일 경과 후 3.0개의 신초가 생성되어 배의 성숙 정도가 C인 배를 배양하는 것이 적합한 것으로 나타났다. 이런 결과는 김등 (1994)이 MS배지를 기본으로하여 2,4-D 1mg/l 에 가시오갈피의 미성숙배를 배양했을 때 배의 길이가 긴 것일수록 식물체분화가 잘 되었다는 결과와 일치하였다. WPM배지를 기본으로하여 TDZ 0.1mg/l가 함유된 배지에서 배성숙정도가 C인 배를 배양했을 때 4.7개의 줄기가 분화되어 가장 높은 신초 분화를 나타냈다.

따라서 가시오갈피의 미숙배 배양시에는 총적저장 후

Table 1. The effect of plant growth regulators, embryo maturity and media on shoot regeneration from immature embryo culture in *E. senticosus*.

Growth regulator (mg/l)	Embryo maturity	No. of shoot	
		SH medium	WPM medium
2,4-D	1	A*	1.0±0.0
		B	1.0±0.0
		C	3.0±0.2
	2	A	0.0±0.0
		B	1.0±0.0
		C	1.0±0.0
TDZ	0.1	A	2.7±0.3
		B	1.3±0.1
		C	2.0±0.0
	3	A	1.5±0.2
		B	2.0±0.0
		C	1.5±0.1
LSD (5%)		0.4	0.5

*A-Immature embryo less than 1mm, B-1~2mm immature embryo, C-Immature embryo more than 2mm.

Table 2. The effect of plant growth regulators and embryo maturity on shoot regeneration and growth on modified SH medium from immature embryo culture in *E. senticosus*.

Growth regulator (mg/l)		Embryo maturity	No. of shoot	Shoot length(mm)
2,4-D	TDZ			
0.1	0.1	A*	1.2±0.1	7.0±1.0
		B	1.0±0.5	5.0±1.1
		C	2.5±0.2	7.0±1.2
0.1	3	A	1.1±0.2	5.0±1.5
		B	1.2±0.2	5.0±1.0
		C	3.0±0.5	7.0±0.8
2	3	A	1.0±0.2	1.0±0.2
		B	1.1±0.2	4.0±0.6
		C	1.0±0.3	7.0±0.9
LSD		(5%)	0.8	2.4

*A-Immature embryo less than 1mm, B-1~2mm immature embryo, C-Immature embryo more than 2mm

미숙배의 크기가 2mm이상 되었을 때 배양하는 것이 미숙배의 크기가 2mm이하인 것을 치상하는 것보다 식물체 분화에 더 효과적이었다.

변형된 SH 배지를 기본배지로하여 2,4-D와 TDZ을 조합처리한 배지에 미숙배를 크기별로 치상한 결과(표 2), 2,4-D가 고농도인 2mg/l 를 처리하였을 때에는 신탄 분화는 저조하였다. 낮은 농도의 2,4-D 0.1mg/l와 고농도의 TDZ 3mg/l가 조합처리되었을 때 줄기의 분화가 양호하여 치상미숙배당 3개의 식물체가 분화되었다. 배의 성숙 정도가 C인 배를 2,4-D 0.1mg/l +TDZ 3mg/l

처리시 배의 성숙정도가 A, B인 미숙배를 치상하였을때 보다 식물체분화가 잘 되었다. 가시오갈피 미숙배 배양에 있어서 Thidiazuron첨가는 미숙배로부터 식물체 분화에 효과적이었는데 이러한 결과는 *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogaea*, *Solanum spp*, *Rehmannia glutinosa* 등 여러 종의 기내배양에서도 효과적이라는 것이 보고되었다(Capelle 등, 1983; Kanyand 등, 1994; 이 등, 1997; Mok 등, 1979; Yu 등, 1994).

WPM배지를 기본으로하여 식물생장조절물질 2,4-D와 TDZ을 조합처리한 실험결과(표 3), 배성숙정도가 B

Table 3. The effect of plant growth regulators on shoot formation and growth on WPM medium from immature embryo culture in *E. senticosus*.

Growth regulator (mg/l)	Embryo maturity	No. of shoot	Shoot length (mm)
2,4-D 2+TDZ 0.1	A*	0.0±0.0	0.0±0.0
	B	1.7±0.3	4.0±0.7
	C	1.0±0.2	3.0±1.2
2,4-D 1+TDZ 3	A	0.0±0.0	0.0±0.0
	B	2.5±0.6	6.0±1.5
	C	1.5±0.2	5.0±1.2
LSD		0.4	1.5

*A-Immature embryo less than 1mm, B-1~2mm immature embryo, C-Immature embryo more than 2mm

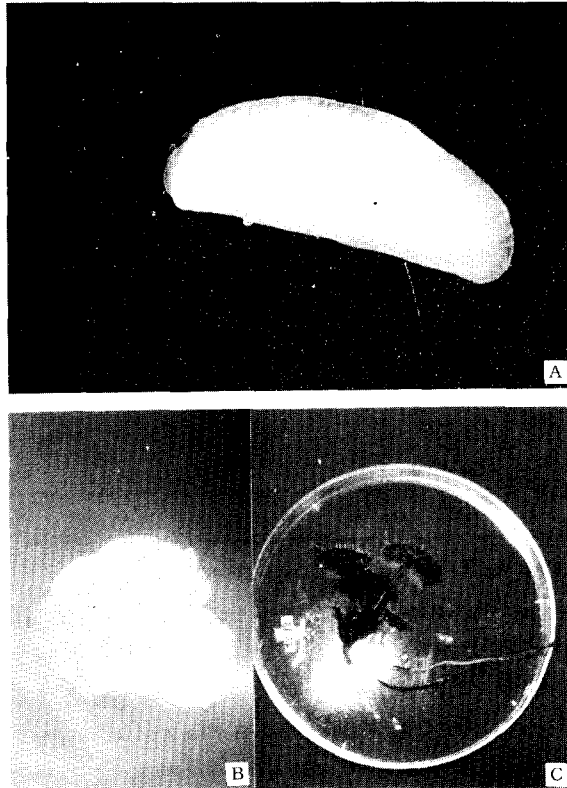


Fig. 3. Callus formation and plant regeneration from immature embryo culture of *Eleutherococcus senticosus*. A: Immature embryo, B: Callus formation, C: Plantlet regeneration.

인 배를 배양시 신초 분화가 나타났으며, 2,4-D의 농도가 높을수록 신초 분화와 신장이 억제되는 경향을 보였으며, 낮은 농도의 2,4-D와 고농도의 TDZ을 조합처리했을 때 신초의 분화가 촉진되어 SH배지를 기본으로 한 실험결과와 비슷한 경향을 보였다.

그러나, WPM배지를 기본배지로 하여 배양했을 때보다 SH배지를 기본배지로 하여 배양했을 때 식물체 분화가 더 효과적이었다(그림 3-C).

적 요

가시오갈피의 조직배양을 통한 대량증식방법체계 확립의 한 방법으로 미숙배 배양시 배성숙정도 및 배지의 종류가 callus 형성 및 식물체 분화에 미치는 영향을 구

명코자 실시한 실험결과는 다음과 같다.

1. 미숙배배양으로부터 캘러스형성은 MS, WPM배지보다 SH배지가 더 효과적이었으며, SH배지에 2,4-D 1mg/l를 첨가시 83.3%의 캘러스형성율을 보였다. SH배지에 TDZ을 단독처리하였을 때 보다 양호한 신초 분화를 나타냈고 배의 성숙정도가 C단계(2mm이상)인 미숙배를 치상하였을 때가 미숙배의 크기가 2mm이하인 A, B단계의 미숙배를 치상하였을 때보다 식물체분화가 더 잘되었다.
2. SH배지를 기본으로하여 2,4-D와 TDZ을 조합처리하였을 때 배의 성숙정도가 C(2mm이상)인 배를 2,4-D 0.1mg/l +TDZ 3mg/l 처리시 양호한 신초 분화를 보였다.
3. WPM배지를 기본으로 하여 2,4-D와 TDZ을 처리하였을 때 배의 성숙정도가 C(2mm이상)인 배를 TDZ 0.1mg/l 처리시 4.7개의 신초로 양호한 결과를 보였다.

인 용 문 헌

- Capelle, S. C., D. W. S. Mok, S. C. Kirehner, and M. C. Mok. 1983. Effect of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of N6-C2-isophenyl [8-14C] adenosine in callus tissues of *Phaseolus lunatus* L. *Plant Physiol.* 73:796-802
- Carla, E., V. Schaik, A. Posthuma, M. J. De Jeu, and E. Jacobsen. 1996. Plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on immature embryos of *Alstroemeria* spp. L. *Plant Cell Reports* 15:377-380
- 최상진. 1993. 식물의 조직세포배양. 대한교과서주식회사. p103-138
- Dyer, W. E., S. C. Weller, R. A. Bressan, and K. M. Herrman. 1988. Glyphosate tolerance in tobacco. *Plant Physiol.* 88:661-666
- Kanyand, M., A. P. Dessai, and C. S. Prakash. 1994. Thidiazuron promotes high frequency regeneration of peanut(*Arachis hypogaea*) plants in vitro. *Plant Cell Rep.* 14:1-5
- Kasha, K. J. 1974. Haploids from somatic cells. *Haploids*

- in higher plants.
- 김태수, 박호기, 박문수, 장영선, 김선, 김종호, 성충기. 1994. 가시오가피 번식에 관한 연구. Ⅲ. 미숙배 배양에 의한 캘러스 유기 및 식물체 재분화. 한국육종학회지 26(별책 1호):134-135
- 이화영, 허권, 김명조, 안상득, 유창연. 1997. 배지, 생장조절물질 및 치상조직이 지황 체세포조직으로부터 식물체분화에 미치는 영향. 한국자원식물학회지 10(1):94-99
- Mok, M. C., S. C. Kim, D. J. Armstrong, and D. W. S. Mok. 1979. Induction of cytokinin autonomy by N-diphenylurea in tissue cultures of *Phaseolous lunatus* L. Proc. Natl. Acad. Sci. 76:3880-3884
- 박용주, 유창연, 조동하, 장병호, 정일민, 안상득. 1994. 보리의 미숙배 배양시 배의 성숙정도, 생장조절물질 및 저온처리가 식물체 재생과 생육에 미치는 영향. 한국작물학회지. 39(6):571-576
- 박호기, 박문수, 김태수, 최인록, 장영선, 김규성. 1994. 가시오가피의 삼목번식방법. 약학지. 2(2):133-139
- 유창연, 조혜경. 1994. Acifluorfen 저항성 토마토 세포주 선발 및 식물체 분화. 한국육종학회지. 26(2):129-136
- Yu, C.Y., Y.A. Chae, S.D. Ahn, and D.H.Cho. 1994. Effect of thidiazuron, on regeneration from long-term cultured callus of *Solanum* spp. K. J. Med. Crop Science 2(1):38-43

(접수일 : 1997년 5월 15일)