

# 지리오가피 (*Acanthopanax chiisanensis*) 체세포배의 건조처리를 통한 식물체 증식

이강섭\*, 방극수<sup>1</sup>, 최용익<sup>2</sup>, 안병룡<sup>1</sup>

(주)파낙시아, <sup>1</sup>익산대학 생명과학과, <sup>2</sup>중앙대학교 인삼산업연구센터

## Plant Production from Desiccated Somatic Embryos of *Acanthopanax chiisanensis*

Kang-Seop Lee\*, Keuk-Soo Bang<sup>1</sup>, Yong-Eui Choi<sup>2</sup>, Byung-Yong Ahn<sup>1</sup>

Panax-Bio Institute, Center for Biotechnology and Bioventure, Jangdong, Deokjingu, Jeonju, Jeonbuk, 561-360 Korea

<sup>1</sup>Department of Life Science, Iksan National College, Iksan-shi, Jeonbuk 570-752, Korea

<sup>2</sup>Korea Ginseng Institute, Chung-Ang University, Anseong-shi, Gyeonggi 456-756, Korea

**ABSTRACT** An efficient method of plant regeneration from *Acanthopanax chiisanensis* somatic embryos was developed. Cotyledonary somatic embryos were obtained in liquid Murashige and Skoog (MS) medium from embryogenic cell suspension cultures. They were desiccated for 0 to 72 hr and then cultured on MS medium containing NAA, BA, GA<sub>3</sub> (0-0.5 mg/L). The highest multiple shoots formation (100%) was obtained from 72 hr desiccated somatic embryos on MS medium with 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L BA or 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L BA + 0.5 mg/L GA<sub>3</sub> after 6 weeks culture. Plant conversion from multiple shoots was not high. The highest plant conversion from multiple shoots was obtained on 1/3MS medium with 1.0 mg/L GA<sub>3</sub>. Converted plantlets were transferred to ex vitro condition and the highest survival rate (70%) of the plantlets was obtained on plastic pots containing vermiculite and sand. These results indicate that micropropagation procedure can be applied for an efficient mass propagation of *Acanthopanax chiisanensis*.

**Key words:** *Acanthopanax chiisanensis*, plant regeneration, somatic embryos, multiple shoot

### 서 론

지리오가피 (*Acanthopanax chiisanensis* Nakai)는 두릅나무과에 속하는 약용식물로서 주로 동북아시아에 분포하고 있다. 근피나 수피는 간과 신장을 보익하고 근육과 골격을 강하게 하는 등 범적응적 작용을 하는 약재로 한방에서 오랫동안 귀하게 사용되어 오고 있다. 그러나 수확기의 지리오가피 종자는 미성숙한 구형배의 상태이므로 일반적인 종자번식을 위해서는 18개월 이상의 오랜 시간이 걸리며 (Isoda and Shoji 1994), 삼목에 의한 번식 또한 그 효율이 저조한 실정이다. 따라서

이러한 번식방법의 문제점을 개선하기 위한 시도로서 조직배양기술을 활용하여 체세포배발생을 통한 식물체의 재생에 관한 연구가 오가피속내의 종에 따라 즉, 오가피 (Choi et al. 2002a; Lee et al. 2002a), 가시오가피 (Gui et al. 1991; Choi and Jeong, 2002; Choi et al. 2002b), 섬오가피 (Choi et al. 1997) 등에서 이루어진 바 있다.

체세포배는 산업적 이용의 가능성을 제공하지만 식물체로의 재생률이 저조한 실정이므로, 산업적으로 활용하기 위해서는 고효율의 정상적인 체세포배 발생체계의 확립과 이로부터 건설한 식물체 재생, 그리고 식물체의 토양순화체계의 확립이 병행되어야 한다 (Soh 1993; Lee et al. 2002b). 한편, 조직배양기간 중에 건조 (Yehoshua et al. 1992; Lee et al. 1997), 열 (Zimmerman et al. 1989), 저온처리 (Rajasekaran and Mullins

\*Corresponding author Tel 063-214-5571 Fax 063-214-5573  
E-mail kangsl@hanmail.net

1979)와 같은 스트레스가 체세포배의 식물체 재생률을 증가시키는 경우가 여러 식물에서 지적된 바 있으며, 또한 생리적으로 체세포배로부터 식물체의 발달과 순화에 중요한 영향을 미치는 경우가 있음이 보고된 바 있다 (Lee et al. 2001), 이러한 현상은 식물에 따라 배양조건이 달리 요구될 수 있으므로, 재료식물에 따른 기초적인 연구가 수행되어야 한다. 지리오가피 (*Acanthopanax chiisanensis*)의 체세포발생 및 식물체 재생에 관한 연구는 미지한 상태이므로, 본 연구에서는 지리오가피 (*Acanthopanax chiisanensis*)의 고효율의 체세포배발생 체계 및 식물체 재생체계의 확립을 위하여 특히 식물생장조절물질 및 건조처리의 효과를 구명하고자 시도되었다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

본 연구에 사용된 시료는 전북 진안군에 소재한 (주) 파낙시아의 오가피 재배포장에서 재배되어온 약 5년생의 지리오가피 나무 (*Acanthopanax chiisanensis* Nakai)로부터 채취된 종자를 사용하였다.

### 배발생 캘러스 유도

효과적인 배발생 캘러스 유도를 위하여 접합자배로부터 유도된 체세포배를 발아시켜 얻은 유식물체를 부위별 (잎, 줄기, 뿌리)로 세절하여 여러 농도 (1.0, 2.0, 4.0, 8.0 mg/L)의 2,4-D와 3% sucrose, 0.3% gelrite가 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962)와 SH (Schenk and Hildebrandt 1972)배지에 배양하여 배발생 캘러스의 형성률은 배양 11주 후에, 증식률은 배양 4주 후에 각각 조사하였다.

### 체세포배의 유도

배발생 캘러스는 종자에서 적출한 접합자배를 1.0 mg/L의 2,4-D, 3% sucrose, 0.3% gelrite가 첨가된 MS 배지에 약 2개월간 배양하여 유도하였으며, 유도된 캘러스는 shaker에서 120 rpm으로 현탁배양하며 약 2주 간격으로 동일배지에 계대배양하여 증식 및 유지하였고, 이를 2,4-D가 첨가되지 않은 액체배지로 옮겨서 현탁배양조건에서 자엽시기의 배를 유도하였다.

### Multiple shoots의 형성 및 식물체 재생

자엽기의 배를 무균대 내에서 멸균된 필터페이퍼를 넣은 petri dish 내에서 각각 0, 24, 48, 72시간 건조처리한 후, 0.1, 0.5 mg/L가 첨가된 GA<sub>3</sub>배지에 NAA (0, 0.1, 0.5 mg/L)와 BA (0, 0.1, 0.5 mg/L)를 첨가한 배지에 6주간 배양한 후 multiple

shoots의 형성률을 조사하였다. 식물체의 재생률은 전술한 여러 조건에서 배양된 배양체를 각각 1.0 mg/L의 GA<sub>3</sub>가 첨가된 1/3MS 배지에 이식하여 6주간 배양한 후 조사하였다.

### 식물체의 토양순화

전술한 각각의 조건에서 유도된 잎과 뿌리가 발달된 유식물체를 vermiculite와 sand가 1:1로 첨가된 플라스틱 포트에 이식하고 이를 비닐랩으로 밀봉하여 배양조건이 광도 40  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ , 광주기 16/8시간, 상대습도 80%, 온도 23 $\pm$ 2 $^{\circ}\text{C}$ 인 배양기에서 약 8주간 배양하여 식물체의 토양순화율을 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 배발생 캘러스의 유도 및 증식

유도된 체세포배로부터 성장한 유식물체를 부위별 (잎, 줄기, 뿌리)로 배양한 결과 MS배지와 SH배지 모두 배발생 캘러스 형성률은 뿌리부위가 각각 30%로 가장 양호하였다 (Figure 1). 줄기 부위는 저조한 편이며 잎에서는 대부분이 갈변되어 괴사하였다. 그러나 2,4-D 농도별 배발생 캘러스 형성률을 비교하였을 때 MS배지의 경우에는 8.0 mg/L의 고농도 2,4-D배지에서 형성률이 양호한 반면에, SH배지에서는 1.0, 2.0 mg/L의 비교적 저농도 2,4-D배지에서 양호한 형성률을 나타내어 두종류의 배지에서 서로 상반된 경향을 보였다 (Figure 1).

또한 형성된 배발생 캘러스의 증식을 위한 최적조건을 찾기 위해 실험한 결과, MS배지의 경우 1.0, 2.0 mg/L 2,4-D배지

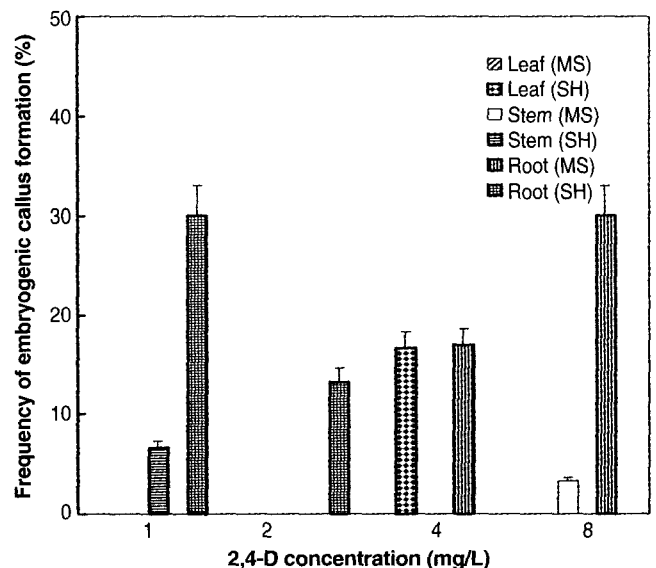


Figure 1. Frequency of embryogenic callus formation from various explants of plantlets on MS or SH medium containing 2,4-D after 11 weeks of culture. Vertical bars represent the mean  $\pm$  S.E. of triplicates.

에서 각각 85.1%와 85.7%의 증식률을 보였으며, SH배지에서는 1.0, 2.0, 4.0 mg/L 2,4-D배지에서 70%이상의 양호한 증식률을 보였다. 2,4-D가 고농도로 갈수록 MS와 SH 모든 배지에서 70%이하의 저조한 증식률을 보였다 (Figure 2).

MS와 SH배지를 비교해볼 때 MS배지에서는 배발생 켈러스의 증식만이 이루어진 반면 SH배지에서는 callus의 증식과 더불어 embryo 발달이 이루어졌는데, 1.0, 2.0 mg/L의 저농도의 2,4-D배지에서 embryo가 많이 발달하였다. 따라서 SH배지보다는 MS배지에서 배발생 켈러스의 증식이 양호함을 알 수 있다. 이러한 결과는 배발생 켈러스의 증식과 배의 발달과의 관계에 있어서 부의 상관관계가 있음을 암시하므로, 연구목적에 따라 배지조성을 달리할 필요가 있을 것으로 생각된다.

자엽기 체세포배로부터 multiple shoots 유도

체세포배의 형태형성에 미치는 식물생장조절물질의 영향을 구명하고자, 각 시간별 (0, 24, 48, 72 hr)로 건조처리한 자엽기의 배 (Figure 3B)를 0.1, 0.5 mg/L가 첨가된 GA<sub>3</sub>배지에 여러 종류의 NAA와 BA를 첨가하여 6주간 배양하였다. 그 결과 대부분 NAA, BA 혹은 GA<sub>3</sub>가 첨가된 경우에는 정상적인 shoot의 발생이 이루어지지 않고 multiple shoot (Figure 3C-D)가 형성되었다. multiple shoot는 72시간 건조처리 후 NAA, BA와 GA<sub>3</sub>를 각각 0.5 mg/L 처리하였을 때 100%의 multiple shoot형성을 보였다. 또한 72시간 건조처리하게 되면 GA<sub>3</sub>가 첨가되지 않고 NAA와 BA를 0.5 mg/L를 첨가하면 100%의 multiple shoot형성을 볼 수 있다. 반면 식물생장조절물질을 저농도 (0.1 mg/L)로 처리하였을 경우에는 건조시간이 24시간이었을 때 100%의 multiple shoot형성을 보이는 반면 건조시간이 길어질수록 감소하는 경향을 보였다. 또한 아주 미세하지만 좀

더 높은 농도 (0.5 mg/L)의 NAA와 BA 그리고 GA<sub>3</sub>를 첨가하면 건조시간을 72시간으로 길게 했을 경우에 multiple shoot형성이 양호해지는 것을 알 수 있었다 (Table 1). 오가피속 식물 중에서 체세포배의 발아를 위해 GA<sub>3</sub>를 단독처리 하는 경우가 오가피 (Choi et al. 2002a)에서 수행된 바 있으며, GA<sub>3</sub>처리시 charcoal을 첨가하는 경우는 오가피 (Lee et al. 2002a)에서 보고된 바 있는데, 이들의 경우에는 한 개의 체세포배에서 한 개의 shoot가 유도되는 것을 특징으로 하고 있다. 한편, *Panax ginseng*의 경우 single embryo와 multiple embryo가 유도되는데, 이들 간에 식물체의 재생율에 차이가 있음이 지적된 바 있다 (Choi et al. 1998). 이러한 결과로부터 체세포배의 발생양상이 식물체의 재생률에 영향을 미치는 것을 알 수 있다. 본 연구 결과에서 single embryo에서 multiple shoot가 유도되었는데, 이러한 현상은 식물생장조절물질 및 건조처리가 체세포배의 내재 hormone balance를 깬 결과로 해석된다. 지리오가피의 체세포배로부터 식물체의 재생시 산업적으로 활용하기 위해서는 효율면에서 single shoot를 갖는 것이 좋은지 multiple shoot를 갖는 것이 좋은지 추후에 검토할 필요가 있다고 생각된다.

Multiple shoots 형성을 통한 식물체 재생

고빈도의 식물체 재생을 위하여 각각의 조건에서 배양된 배양체를 1.0 mg/L GA<sub>3</sub>를 첨가한 1/3 MS 배지에 6주간 배양

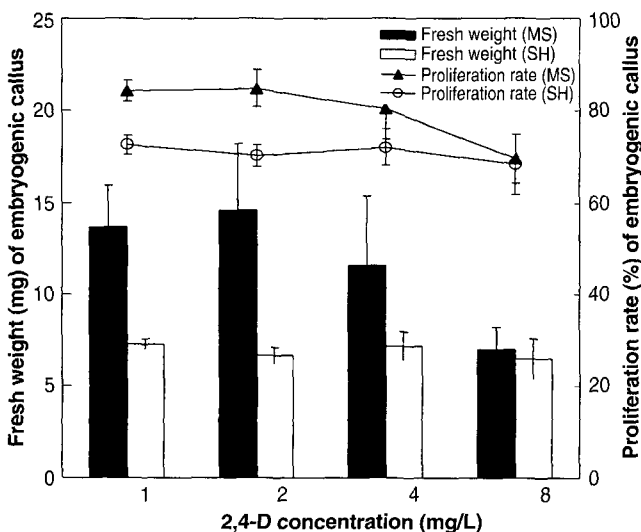


Figure 2. Fresh weight (mg) and proliferation rate (%) of embryogenic callus on MS medium containing 2,4-D after 4 weeks of culture. Vertical bars represent the mean ± S.E. of triplicates.

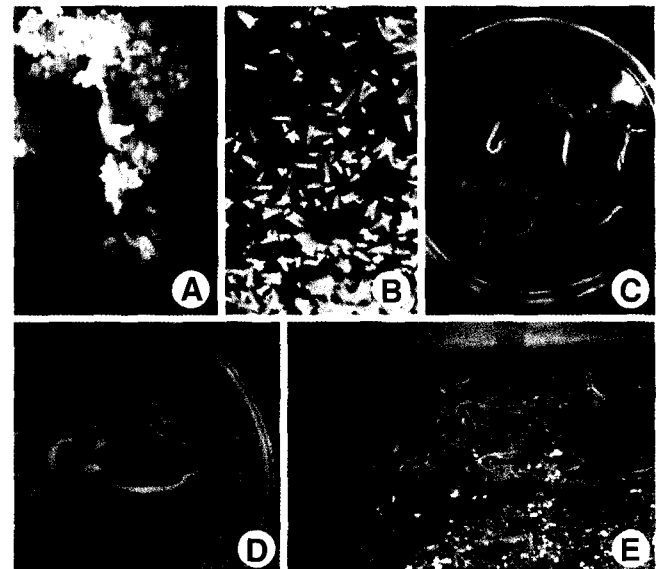


Figure 3. Plant regeneration from somatic embryos of *Acanthopanax chiisanensis*. A, Direct somatic embryogenesis from zygotic embryo of *A. chiisanensis* on MS medium supplemented with 1.0 mg/L 2,4-D after 8 weeks of culture; B, Somatic embryos of cotyledonary stage formed from embryogenic cell clumps in liquid MS medium lacking plant growth regulators; C-D, Multiple shoots formation from somatic embryo on MS medium supplemented with 0.1 mg/L NAA, 0.1 mg/L BA and 0.1 mg/L GA<sub>3</sub> after 6 weeks of culture; E, Plants acclimatized in pots containing vermiculite and sand after 8 weeks of transfer.

**Table 1.** Frequency of multiple shoot formation from cotyledonary somatic embryos of *A. chiisanensis* on MS medium supplemented with NAA and BA or GA<sub>3</sub> after 6 weeks of culture.

Growth regulators (mg/L)			Frequency (%) of multiple shoot formation after dehydration pretreatment			
NAA	BA	GA <sub>3</sub>	control	24	48	72 (hr)
-	-	-	-	-	-	-
0.1	-	-	-	-	-	-
0.1	0.1	-	89.5±7.2*	87.6±6.2	43.7±6.2	45.8±7.2
0.1	0.1	0.1	97.9±3.6	100±0	91.6±9.5	58.3±3.6
0.5	-	-	-	-	12.5±6.2	-
0.5	0.5	-	52.0±7.2	50.0±6.2	83.3±7.2	100±0
0.5	0.5	0.5	50.0±10.8	85.4±9.5	97.9±3.6	100±0

\*Data represent the mean ± S.E. of triplicates.

**Table 2.** Frequency of plant regeneration from multiple shoots on 1/3MS medium supplemented with 1.0 mg/L GA<sub>3</sub> after 6 weeks of culture.

Growth regulators (mg/L)			Frequency (%) of multiple shoot formation after dehydration pretreatment			
NAA	BA	GA <sub>3</sub>	control	24	48	72 (hr)
-	-	-	-	-	-	-
0.1	-	-	-	-	-	-
0.1	0.1	-	14.5±9.5	14.5±3.6	18.8±6.2	16.6±9.5
0.1	0.1	0.1	22.9±3.6	25.0±6.2	25.0±0.0	29.1±7.2
0.5	-	-	-	-	-	-
0.5	0.5	-	16.6±9.5	6.3±0.0	6.3±6.2	8.3±3.6
0.5	0.5	0.5	12.5±10.8	6.3±6.2	18.8±0.0	14.5±7.2

\*Data represent the mean ± S.E. of triplicates.

한 결과 72시간 건조 후, 0.1 mg/L의 NAA, BA, GA<sub>3</sub>를 각각 첨가한 배지에서 배양한 식물체의 재생률이 29.1%로 가장 효과적임을 알 수 있었다 (Table 2, Figure 3E). 이러한 결과는 cassava의 경우에서와 유사한 결과로서 건조처리가 식물체의 재생에 크게 영향을 미치는 것을 알 수 있다 (Mathews et al. 1993). 당근의 경우에서도 통기처리를 함으로써 낮은 습도를 유지하여 식물체 재생을 증가시킨 바 (Lee et al. 1997) 있으므로, 다른 작물의 경우에 있어서도 체세포배로부터 식물체 재생을 위해서는 건조효과를 활용하면 좋을 것으로 생각된다.

**식물체의 토양순화**

전술한 각각의 조건에서 유도된 잎과 뿌리가 발달된 식물체를 vermiculite와 sand가 1 : 1로 첨가된 플라스틱 포트에 이식하고 이를 비닐랩으로 밀봉하여 8주간 배양한 결과, 자엽기의 체세포 배를 72시간 건조 후 NAA, BA 그리고 GA<sub>3</sub>가 각 0.1 mg/L씩 첨가된 처리구에서 약 6주간 배양한 후 얻어진 식물체에서 70%의 높은 토양순화율을 나타내었다 (Table 3). 이러한 결과는 cassava의 경우에서와 유사한 결과로서 건조처리가 식물체의 순화에 크게 영향을 미치는 것을 알 수 있으므로 (Mathews et al. 1993), 향후 고빈도의 식물체 재생 및 순화를

**Table 3.** Survival rate (%) of plantlets derived from multiple shoots in pots containing vermiculite and sand after 8 weeks of culture.

Growth regulators (mg/L)			Frequency (%) of multiple shoot formation after dehydration pretreatment			
NAA	BA	GA <sub>3</sub>	control	24	48	72 (hr)
-	-	-	-	-	-	-
0.1	-	-	-	-	-	-
0.1	0.1	-	0	10±1.3	0	10±1.2
0.1	0.1	0.1	30±4.1	40±3.8	20±1.1	70±6
0.5	-	-	-	-	-	-
0.5	0.5	-	0	0	0	0
0.5	0.5	0.5	0	20±1.3	20±3.5	10±2.8

\*Data represent the mean ± S.E. of triplicates.

위한 최적조건의 구명에 있어 건조처리의 효과를 생리학적 측면에서 깊게 연구되어야 할 것으로 사료된다.

**적 요**

지리오가피의 체세포배로부터 식물체 재생을 위한 효율적인 방법을 개발하였다. 체세포배의 형태형성에 미치는 식물생장 조절물질의 영향을 조사하고자, 접합자 배 유래의 배발생 세포를 MS배지에 현탁배양하고, 이로부터 얻어진 자엽시기의 배를 배양접시에서 건조처리 (0~72 h)한 후, NAA, BA, GA<sub>3</sub> (0~0.5 mg/L)가 첨가된 MS배지에 배양하였다. 그 결과, 체세포 배를 72시간 동안 배양접시에서 건조처리 후에 0.5 mg/L NAA, 0.5 mg/L BA 또는 0.5 mg/L NAA, 0.5 mg/L BA 0.5 mg/L GA<sub>3</sub>가 첨가된 MS배지에 6주간 배양하였을 때, multiple shoot가 100%로서 가장 높게 유도됨을 관찰 할 수 있었다. 가장 높은 식물체의 재생율 (29.1%)은 체세포배를 72시간 건조처리 후에, 0.1 mg/L NAA, 0.1 mg/L BA 그리고 0.1 mg/L GA<sub>3</sub>가 첨가된 MS배지에 6주간 이식한 후, 이를 다시 1.0 mg/L GA<sub>3</sub>가 첨가된 1/3 MS배지에 6주간 배양하였을 때 이루어졌다. 유식물체를 vermiculite와 sand가 1 : 1로 첨가된 plastic pot에 이식하였을 때 생존율은 약 70%로서 나타났다. 이상의 결과는 지리오가피의 대량생산에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

사사 - 본 연구는 2002년도 익산대학 산업기술연구소의 지원에 의하여 수행되었습니다.

**인용문헌**

Choi YE, Kim JW, Soh WY (1997) Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of *Acanthopanax koreanum* Nakai. Plant Cell Rep 17: 84-88  
 Choi YE, Yang DC, Park JC, Soh WY, Choi KT (1998) Regenerative

- ability of somatic single and multiple embryos arising directly from cotyledons of *Panax ginseng*. *Plant Cell Rep* 17: 544-551
- Choi YE, Jeong JH (2002) Dormancy induction of somatic embryos of Siberian ginseng by high sucrose concentrations enhances the conservation of hydrated artificial seeds and dehydration resistance. *Plant Cell Rep* 20: 1112-1116
- Choi YE, Ko SK, Lee KS, Yoon ES (2002a) Production of plantlets of *Eleutherococcus sessiliflorus* via somatic embryogenesis and successful transfer to soil. *Plant Cell Tiss Org Cult* 69: 201-204
- Choi YE, Lee KS, Kim SY, Han JY, Kim HS, Jung JH, Ko SK (2002b) Mass production of Siberian ginseng plantlets through large-scale tank culture of somatic embryos. *Plant Cell Rep* 21: 24-28
- Gui Y, Guo Z, Ke S, Skirvin RH (1991) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acanthopanax senticosus*. *Plant Cell Rep* 9: 514-516
- Isoda S, Shoji T (1994) Studies on the cultivation of *Eleutherococcus senticosus* Maxim. II. On the germination and raising of seedling. *Nat Med* 48: 75-81
- Lee EK, Cho DY, Soh WY (1997) Effect of humidity on somatic embryogenesis in cotyledon explant culture of carrot. *J Plant Biol* 40: 89-94
- Lee EK, Cho DY, Soh WY (2001) Enhanced production and germination of somatic embryos by temporary starvation in tissue cultures of *Daucus carota*. *Plant Cell Rep* 20: 408-415
- Lee KS, Choi YE, Sim OK, Joo SA, Shin JS, Jeong JH, Kim YS, Kim EY (2002a) Effects of GA<sub>3</sub> and charcoal on plant regeneration from somatic embryos of *Acanthopanax sessiliflorus*. *Kor J Plant Biotechnology* 29: 253-257
- Lee KS, Lee JC, Soh WY (2002b) High frequency plant regeneration from *Aralia cordata* somatic embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult* 68: 241-246
- Mathews H, Schopk C, Carcamo R, Chavarriaga P, Fauquet C, Beachy RN (1993) Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava. *Plant Cell Rep* 20: 328-333
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Rajasekaran K, Mullins MG (1979) Embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines. *J Exp Bot* 30: 399-407
- Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50: 199-204
- Soh WY (1993) Developmental and structural diversity of regenerated plants in cell and tissue cultures. In: Kim SG (ed), *Molecular Approach to Plant Cell Differentiation*. Proc 7th Symp Plant Biotechnol. Botanical Society of Korea, Seoul, pp 1-35
- Yehoshua S, Rhodes D, Janick J (1992) Changes in amino acid composition associated with tolerance to partial desiccation of celery somatic embryos. *J Am Soc Hort Sci* 117: 337-341
- Zimmerman JL, Apuya N, Darwish KO, Carroll C (1989) Novel regulation of heat shock genes during carrot somatic embryo development. *Plant Cell* 12: 1137-1146

(접수일자 2003년 12월 2일, 수리일자 2003년 12월 10일)