

오가피 (*Acanthopanax sessiliflorus*)의 체세포배로부터 식물체 재생에 미치는 GA₃와 Charcoal의 영향

이강섭* · 최용의¹ · 심옥경 · 주선아 · 신정순 · 정재훈 · 김영신 · 김이엽
(주)파낙시아, ¹중앙대학교 인삼산업연구센터

Effects of GA₃ and Charcoal on Plant Regeneration from Somatic Embryos of *Acanthopanax sessiliflorus*

LEE, Kang-Seop* · CHOI, Yong-Eui¹ · SIM, Ock-Kyeong · JOO, Sun-Ah · SHIN, Jeong-Sun · JEONG, Jae-Hun ·
KIM, Young-Shin · KIM, Ee-Yup

Panax-Bio Institute, Center for Biotechnology and Bioventure, Jangdong, Deokjingu, Jeonju, Jeonbuk 561-360, Korea
¹Korea ginseng Institute, Chung-Ang University, Ansung-shi, Kyunggi-do, Korea

ABSTRACT To establish the optimum condition for plant regeneration from somatic embryos of *Acanthopanax sessiliflorus* Rupr. et Maxim, a medicinal plant, somatic embryos were induced from zygotic embryo-derived embryogenic callus in hormone-free MS medium. To induce plantlet conversion, cotyledonary somatic embryos were cultured on MS solid medium with GA₃ at various concentrations (0~10 mg/L) for three weeks. Plantlets were transferred to 1/3 MS solid medium with 0.5% charcoal for 7 weeks. Stem length was increased proportionally to the concentration and treatment period of GA₃. Also, the highest leaf width (8.9 mm) and leaf number (2.84) of plantlet were obtained when plantlets were converted on 5, 10 mg/L GA₃ pretreatments, respectively. The highest plant conversion frequency (66.7%) was obtained when the somatic embryos were cultured on medium containing 5 mg/L GA₃ for 3 weeks and then were transferred to 1/3 MS medium with 0.5% charcoal. The highest survival rate of soil transfer was 90% when plantlets were regenerated on medium with 5 mg/L GA₃ for 3 weeks and then transferred to plastic pots containing vermiculite and sand mixture for 4 weeks.

Key words: *Acanthopanax sessiliflorus*, charcoal, gibberelline, plant regeneration, somatic embryos

서 론

오가피 (*Acanthopanax sessiliflorus* Rupr. et Maxim)는 두릅 나무과에 속하는 약용작물로서 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 오가피 증자는 미성숙한 구형배의 상태이므로 일반적인 종자번식을 위해서는 18개월 이상의 오랜 시간이 걸리며 (Isoda and Shoji

1994), 삽목에 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), 가시오가피 (Gui et al. 1991; Choi et al. 1999, 2002b), 섬오가피 (Choi et al. 1997), 지리오가피 (Lee et al. 2002) 등에서 이루어진 바 있다. 그러나 체세포배발생을 통한 조직배양묘의 대량생산을 위해서는 체세포배의 발생과 이로부터 식물체 재생, 그리고 식물체의 토양순화 등 일련의 효율적인 재분화 및 순화체계개발이 병행되어야 한다. 이러한 체계의 개발을 위해서는 먼저 오가피 기내 유식물체의 정상적인 형태형성이 이루어져야 한다. 또한, 기내 유식물체의 형태

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

형성은 토양순화의 성공여부를 결정하는 중대한 요인이 되므로, 유식물체의 효율적인 토양순화를 위해서는 체세포배로부터 건설한 유식물체를 유도하는 것이 중요한 선결과제이다.

한편, 가시오가피 체세포배는 접합자의 배처럼 휴면하는 특징을 가짐을 보고하였는데 (Choi and Jeong 2002), 이는 인삼의 체세포배에서의 휴면특성과 유사한 결과이다 (Choi et al. 1998). 따라서 정상적인 식물체를 생산하기 위해서는 체세포배의 휴면타파과정이 필수적이며, 식물생장호르몬 중 GA₃를 이용한 연구가 보고되고 있다 (Choi et al. 1997; Choi et al. 1999, 2002a). 또한 배지에 첨가되는 charcoal은 배지내의 페놀성 물질을 흡착하여 이들 물질의 산화를 막아 배양체의 정상적인 성장 및 발달에 영향을 주는 것으로 보고되고 있다 (Nhut et al. 2001; Teng 1997). 그러나 오가피의 체세포배로부터 식물체의 재생에 있어 GA₃와 charcoal의 처리농도 및 처리기간에 따른 식물체의 형태형성에 관한 연구는 미진한 실정이다.

본 연구는 오가피의 체세포배 중 자엽시기의 배를 GA₃와 charcoal을 농도별, 처리기간별로 구별하여 배양하고 이로부터 건설한 식물체의 재생과 토양순화를 위한 최적조건을 구명하여 오가피 묘목의 대량생산을 위한 기초자료로 활용하고자 시도되었다.

재료 및 방법

식물재료

본 연구에 사용된 시료는 전북 진안에 소재한 (주)파낙시아의 오가피 재배포장에서 재배되어온 약 5년생의 오가피나무 (*Acanthopanax sessiliflorus* Rupr. et Maxim)로부터 채취된 종자를 사용하였다.

체세포배의 유도

배발생캘러스는 최 등 (2002a)의 방법에 따라서 종자에서 적출한 접합자배를 1 mg/L의 2,4-D, 3% sucrose, 0.3% gelrite가 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962)배지에 약 2개월간 배양하여 유도하였으며, 유도된 배발생 캘러스는 shaker에서 120 rpm으로 현탁배양하며 약 2주 간격으로 동일배지에 계대 배양하여 증식 및 유지하였고 이를 2,4-D가 첨가되지 않은 액체배지로 옮겨서 현탁배양조건에서 체세포배 발생 과정을 거쳐 자엽시기의 배를 유도하였다. 배양은 25±2°C, 광도 40 μmol m⁻² sec⁻¹, 16시간 광조명하에서 배양하였다.

체세포배로부터 유식물체의 유도

선별된 자엽시기의 배를 0.3% gelrite와 GA₃의 농도를 달리

하여 (0~10 mg/L) 첨가된 MS배지에서 약 3주간 배양하였다. 이때 배양용기는 플라스틱 Petri dish를 이용하였으며 한 개의 Petri dish 당 약 50개의 배를 배양 하였다. 상기한 각각의 조건에서 배양된 배양체는 0.5%의 charcoal이 첨가된 1/3 MS배지와 charcoal 무첨가 1/3 MS배지에서 각각 7주간 배양한 후 발아율, 식물체의 줄기의 길이, 그리고 형성된 잎의 수 및 폭을 조사하였다. 이때의 배양은 500 mL 유리 배양병에서 배양하였으며 배양병 당 10개체의 식물체를 배양하였고 약 5반복을 하였다. 배양조건은 25±2°C, 광도 40 μmol m⁻² sec⁻¹, 16시간 광조명하에서 배양하였다.

식물체의 토양순화

전술한 각각의 조건에서 유도된 잎과 뿌리가 발달된 식물체를 모래와 vermiculite가 1:1로 첨가된 20×20 cm² 크기의 플라스틱 포트에 이식하고 이를 비닐랩으로 밀봉하여 배양조건이 광도 40 μmol · m⁻² · sec⁻¹, 광주기 16/8시간, 상대습도 80%, 온도 23±1°C인 배양기에서 약 6주간 배양하여 식물체의 토양순화율을 조사하였다. 포트 당 약 50개의 식물체를 이식하였으며 3반복 처리하였다.

결과 및 고찰

식물체의 재생률

자엽시기의 체세포배에 0.5%의 charcoal과 GA₃ (0~10 mg/L)를 각각 농도별로 동시에 혼합처리하여 약 7주간 배양하였을 때, 식물체의 발아 및 성장율은 대조구에서의 결과와 유사하게 10% 미만으로 저조하게 나타났다 (결과 미제시). 이러한 결과는 배지에 첨가되는 GA₃를 charcoal이 흡수하여 GA₃의 효과가 나타나지 않은 것으로 해석된다. 한편, 오가피 체세포배는 GA₃를 처리하지 않는 경우에는 대부분 발아되지 않는 특징이 있는데, 이는 오가피 체세포배가 접합자의 배처럼 휴면하는 특징을 보인다는 보고와 일치하는 결과이다 (Choi and Jeong 2002).

액체배양으로부터 유도된 자엽시기의 체세포배를 GA₃ 농도별 (0~10 mg/L)로 3주간 먼저 처리한 후, 다음 단계로 각각의 처리구에서 배양된 배양체 (유식물체와 체세포배)를 0.5%의 charcoal이 첨가된 1/3 MS고체배지에 각각 이식하여 약 7주간 배양하였다. 그 결과, charcoal 무첨가구보다 첨가구에서 식물체의 재생률이 높게 나타났으며, GA₃ 처리농도가 높은 처리구일수록 식물체 재생률이 높았다. 가장 높은 식물체 재생률은 약 66.7%로서 5 mg/L GA₃ 처리 후 0.5% charcoal 처리구에 이식하였을 때 관찰되었다 (Figure 1).

한편 GA₃의 농도 (0~10 mg/L)를 달리하여 3주간 전처리한 후 charcoal 무첨가구로 이식한 경우에는 모두 charcoal 첨

가구보다 낮은 재생률을 보였으며, 3 mg/L GA₃의 전처리구에서 약 58%의 식물체 재생률을 나타내었다 (Figure 1). 이와같이 체세포배로부터 GA₃ 단독 처리에 의한 식물체 재생의 경우는 오가피속 식물 중 가시오가피 (Choi et al. 1999; Choi et al. 2002b), 오가피 (Choi et al. 2002a)에서 살펴볼 수 있는데, 이 경우에는 GA₃를 단독으로 2주 동안 1 mg/L 처리하였거나 (Choi et al. 1999), 20 μM의 고농도로 3일 동안 단기간 처리한 경우 (Choi et al. 2002b)와 2주간 처리한 경우 (Choi et al. 2002a) 등에서 보고되었는데, 본 실험에서는 GA₃처리 후 charcoal 처리를 병행하였을 때 더욱 재생률이 높았다 (Figure 1).

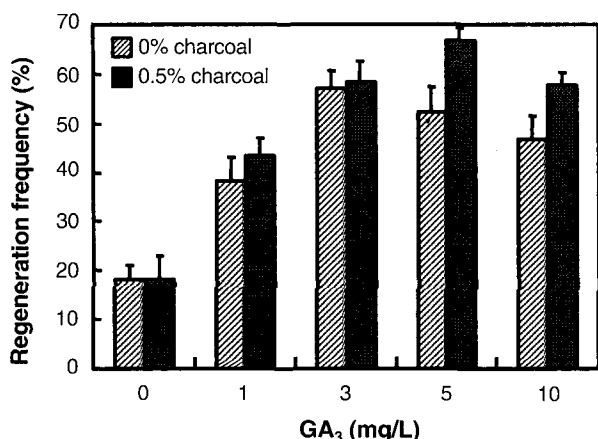


Figure 1. Effects of GA₃ and charcoal on plant regeneration from somatic embryos. Somatic embryos were cultured on MS medium containing with GA₃ at various concentrations (0~10 mg/L) for 3 weeks and then were transferred into 1/3 MS medium containing with and without 0.5% charcoal for 7 weeks.

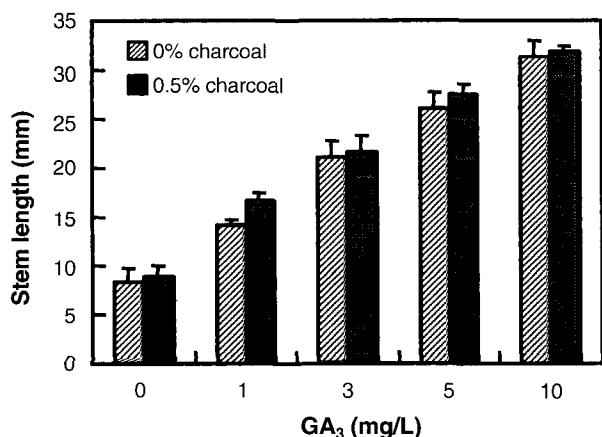


Figure 2. Effects of GA₃ and charcoal on stem length of plantlets regenerated from somatic embryos. Somatic embryos were cultured on MS medium containing with GA₃ at various concentrations (0~10 mg/L) for 3 weeks and then were transferred to 1/3 MS medium containing with and without 0.5% charcoal for 7 weeks.

식물체의 형태형성

자엽기의 배에 GA₃를 농도별 (0~10 mg/L)로 3주간 처리한 후 각각의 처리구에서 배양된 배양체 (유식물체와 체세포배)를 charcoal (0, 0.5%)이 첨가된 1/3 MS고체배지에 각각 이식하여 약 7주간 배양하여 유도된 식물체로부터 줄기의 길이, 분엽의 수, 그리고 분엽의 폭을 조사하였다. 먼저, 줄기의 길이에서는 동일농도의 GA₃ 처리구에서는 charcoal 처리에 관계없이 유사한 결과를 보였으며, GA₃의 전처리 농도가 높을수록 줄기의 신장이 길어졌으며, 특히 10 mg/L의 처리구에서는 비정상적으로 길게 신장하였다 (Figures 2, 5C). 이와 같은 결과는 전처리 시 GA₃ 농도가 높은 경우 줄기의 과다신장에 영향을 미침을 나타낸다.

또한, 한 개체 당 형성된 본엽수에서는 10 mg/L GA₃ 전처리 후 charcoal 무첨가 하였을 때 가장 많았으며, GA₃의 농도에 비례하여 증가하였다 (Figure 3).

식물체 엽폭의 크기는 GA₃를 처리 후 각각 charcoal 첨가 배지에 이식한 경우, 대조구보다 넓었다. 특히, 3 mg/L GA₃ 처리 후 0.5% charcoal 첨가구로 이식한 처리구에서 엽폭이 평균 9.5 mm로 가장 넓게 나타났다 (Figure 4, 5A-C). 한편, GA₃를 첨가하지 않은 배지로부터 0.5% charcoal 첨가배지에 이식한 경우의 식물체는 대조구에 비하여 엽폭이 감소되었다.

식물체의 토양순화

체세포배를 GA₃ 농도별 (0~10 mg/L)로 처리하여 1주 또는 3주동안 배양한 후 각각의 조건에서 유도된 배양체를 0.5% charcoal이 첨가된 1/3 MS고체배지에 각각 이식하여 약 7주간 배양한 후, 본엽과 뿌리가 발달한 식물체를 선별하여 vermiculite와 모래 (v/v, 1:1)가 혼합된 토양에 이식하여 4주

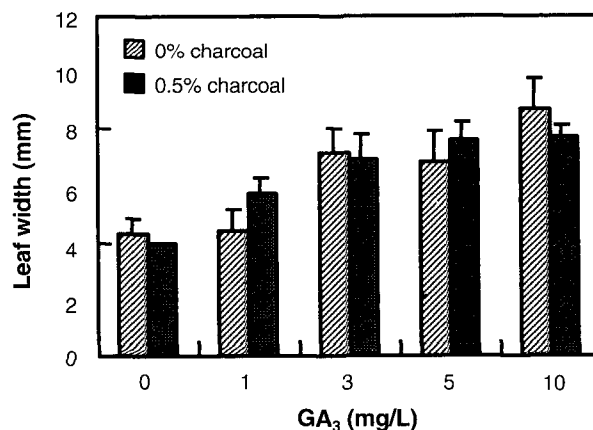


Figure 3. Effects of GA₃ and charcoal on leaf number of plantlets regenerated from somatic embryos. Somatic embryos were cultured on MS medium containing with GA₃ at various concentrations (0~10 mg/L) for 3 weeks and then were transferred into 1/3 MS medium containing with and without 0.5% charcoal for 7 weeks

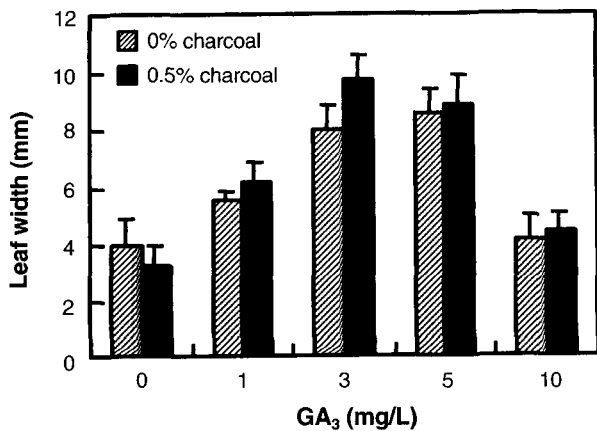


Figure 4. Effects of GA₃ and charcoal on leaf width of plantlets regenerated from somatic embryos. Somatic embryos were cultured on MS medium containing with GA₃ at various concentrations (0~10 mg/L) for 3 weeks and then were transferred into 1/3 MS medium containing with and without 0.5% charcoal for 7 weeks.

간 순화처리하여 식물체의 생존율을 조사하였다 (Table 1, Figure 5E).

그 결과, GA₃를 농도를 달리하여 1주동안 전처리 한 후 charcoal배지에 이식하였던 처리구의 경우에는 생존율이 10~52%로 처리구에 따라 다양하게 나타났으나 대부분 낮은 수준의 생존율을 나타내었다 (Table 1).

그러나 GA₃ 농도를 달리하여 3주 동안 전처리한 후 0.5%의 charcoal배지에 이식하였던 처리구의 경우 토양에서의 식물체 생존율은 70% 수준의 생존율을 나타내어, GA₃를 1주 동안 전처리하였던 경우에 비하여 높은 생존율을 나타내었다. 특히, 5 mg/L GA₃를 3주간 전처리한 후 charcoal 배지에 이식하였던 처리구의 경우에 식물체의 생존율은 92%로 가장 높게 나타났다 (Table 1).

이상의 결과로부터, 오가피의 체세포배 발생에 의한 식물체 재생 및 토양순화를 위한 GA₃와 charcoal의 최적 농도 및 처리기간이 구명되었다. 가장 높은 식물체의 재생률 (약 66.7%)은 5 mg/L GA₃를 3주간 전처리한 후 0.5% charcoal처리구에 이식하였을 때 관찰되었다. 그리고 가장 높은 식물체의 토양순화율 (92%)은 5 mg/L의 GA₃를 3주간 전처리 후, charcoal 0.5%가 첨가된 1/3 MS 희석배지에 이식하여 7주간 배양한

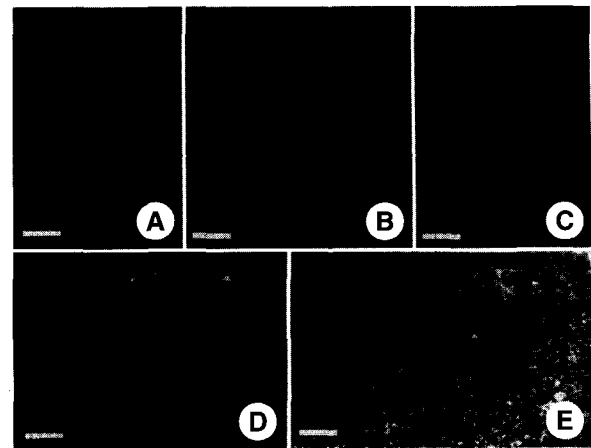


Figure 5. Effects of GA₃ and charcoal on plantlet conversion from somatic embryos. Various type of plantlets regenerated from embryos on MS medium with GA₃ and charcoal at various concentrations. A: A plantlet regenerated on MS basal medium (bar=1.7 cm). B: A plantlet regenerated on MS medium with 5 mg/L GA₃ and 0.5% charcoal (bar=1.7 cm). C: A plantlet regenerated on MS medium with 10 mg/L GA₃ and without charcoal (bar=1.7 cm). D: Numerous plantlets regenerated on MS medium with GA₃ and 0.5% charcoal (bar=1.4 cm). E: Plants acclimatized in pots containing sand and vermiculite for 4 weeks. (bar=2.0 cm).

다음, vermiculite 와 sand (v/v, 1:1)가 혼합된 토양에 이식하여 4주간 순화처리한 경우에 나타났다. 따라서 이러한 결과는 체세포배발생에 의한 오가피묘목의 대량생산에 있어서 정상적인 식물체 형태형성 조건확립을 위한 매우 유용한 자료가 될 것으로 생각된다.

사사 - 본 연구는 2002 지역기술개발용역사업의 일환으로 과학기술부, 전라북도의 연구비지원에 의한 결과입니다.

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, Kim JW, Yoon ES (1999) High frequency of plant

Table 1. Effects of GA₃ and charcoal on survival rate (%) of plantlet^a after transfer to soil.

Period (weeks)	Charcoal (%)	GA ₃ (mg/L)				
		0	1	3	5	10
1	0	10	42	22	18	10
	0.5	14	36	52	32	24
3	0	8	78	88	82	32
	0.5	12	80	82	92	24

^aRegenerated plantlets were obtained from cotyledonary somatic embryos treated with GA₃ at various concentrations (0~10 mg/L) for 3 weeks and then transferred into the charcoal medium for 7 weeks.

^bPlantlets were acclimatized in pots containing sand and vermiculite (v/v, 1 : 1) in growth chamber for 4 weeks.

- production via somatic embryogenesis from calus or cell suspension cultures in *Eleutherococcus senticosus*. *Ann Bot* **83**: 309-314
- 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, 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, Jeong JH, Ko SK** (2002b) Mass production of Siberian ginseng plantlets through large-scale tank culture of somatic embryos. *Plant Cell Rep* **21**: 24-28
- 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
- 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 KS, Choi YE, Joo SA, Sim OK, Shin JS, Seo CS, Lee JC, Kim EY, Bang KS** (2002) Plant regeneration through multiple shoots from *Acanthopanax chiisanensis* somatic embryos. *Ann Meet. Plant Biotech Soc. Kor., Seoul Uni.*, Abstract p132
- Murashig T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* **15**:473-497
- Nhut DT, Le BV, Fukai S, Tanaka M, Van KTT** (2001) Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture. *Plant Growth Regul* **33**:59-65
- Teng WL** (1997) Activated charcoal affects morphogenesis and enhances sporophyte regeneration during leaf cell suspension culture of *Platynerium bifurcatum*. *Plant Cell Rep* **17**:77-83

(접수일자 2002년 9월 19일)