

가시오갈피 현탁배양 체세포배의 저온장기저장 및 식물체 재분화

이성호* · 임정대** · 허권** · 김명조** · 이찬옥** · 이재근** · 최학숙** · 유창연**†

*동북임업대학 임학원, 임목유전육종실험실, 하얼빈, 150040, 중국, **강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부

Long-Term Cold Storage and Plant Regeneration of Suspension Cultured Somatic Embryos of *Eleutherococcus senticosus* Maxim

Cheng Hao Li*, Jung Dae Lim**, Kwon Heo**, Myong Jo Kim**, Chan Ok Lee**,
Jae Geun Lee**, Xue Shu Cui**, and Chang Yeon Yu**†

*Forest Genetics and Tree Breeding Lab., College of Foresry, Morteast Forestry Uni., Harbin, 150040, P.R. China.

**Division of Applied Plant Sci., Kangwon Natl. Univ., Chunchon 200-701, Korea.

ABSTRACT : A method for long-term conservation of somatic embryos of *Eleutherococcus senticosos* was described. Suspension cultured globular somatic embryos were successfully conserved for 36 months at 4°C. The embryos resumed growth within two weeks when returned to MS liquid medium containing 0.2 mg/l 2,4-dichlorophenoxy acetic acid. The optimal condition for cell proliferation was achieved when somatic embryos cultured at 32°C in 1/3 MS liquid medium, and about 1.2 g of embryogenic cell was induced from 150 globular embryos after 6 weeks of suspension culture. The embryogenic cells produced from these somatic embryos exhibited normal plant regeneration on auxin-free medium.

Key words : *Eleutherococcus senticosus*, suspension culture, somatic embryo, 2,4-dichlorophenoxy acetic acid

서 언

식물의 조직배양에서 배양중인 특정세포나 조직을 장기간 유지할 필요성이 있을 경우는 주로 일정한 간격으로 계대배양을 하는 경우가 많다. 그러나 식물세포나 조직을 연속 계대배양하게 되면 유전적 변이가 일어나기 쉬울 뿐만 아니라 배발생세포의 경우에는 변이 cell의 발생, 생리적 성질의 변화로 인한 재분화 능력 상실 등이 문제가 되고 있다. 그러므로 유전자원의 보존적 측면, 특정 cell line의 유지 및 증식에 있어서 식물의 세포나 조직을 계대배양 없이 안전한 상태로 장기 보존하는 것은 매우 중요하다. 식물 배양조직의 장기 보존방법으로는 크게 저온보존법과 동결보존법이 있으며 배양조직을 생육적온보다 낮은 조건에서 보존하는 저온보존법에 비해 액체질소를 이용한 동결보존법은 오늘날 가장 이상적인 장기보존법으로 알려지

고 있다. 그러나 이러한 동결보존법은 그 실행에 있어서 여러 가지 설비 및 예냉조건, cryoprotectant 등의 첨가가 요구되어 진다 (Sakai & Nishiyama, 1978). 식물조직의 저온저장온도는 대부분의 경우 1~9°C의 범위에서 저장하였다고 보고되어 있으며, 목본류의 경우 저온저장은 사과나무 (Kim *et al.*, 1986), 키위 (Monette, 1986), 포푸라류 (Moon & Kim, 1987) 등에서 저온을 이용한 조직저장의 예가 보고되었다. 체세포배의 저온저장에 관하여 Richard 등 (1991)의 보고에 따르면 white spruce의 체세포배는 1년 동안 저온 저장한 후에도 80%의 발아율을 보였다고 보고한 반면 천궁의 체세포배는 4°C에서 저장 2개월 후부터 발아 개시가 관찰되어 (Park & Chae, 1995) 식물종과 저장당시의 체세포배의 발달단계에 따라 저장기간의 차이를 보이는 것으로 나타났다.

가시오갈피의 체세포배의 장기보존에 관한 연구는 9%의

† Corresponding author : (Phone) +82-33-250-6411 (E-mail) cyyu@kangwon.ac.kr

Received October 7, 2004 / Accepted November 6, 2004

설탕을 첨가한 배지에서 휴면이 유도된 체세포배를 실온에서 6개월 보존한 것과 (Choi & Jeong, 2002) 생물반응기 배양한 유식물체를 8~12℃에서 1개월 보관하였다는 보고가 있으나 가시오갈피의 배발생세포 및 체세포배의 저온저장에 대한 연구는 진행되지 못하였다 (Kim, 2002).

본 실험은 가시오갈피에 있어서 체세포배를 이용한 대량 증식체계 확립을 위한 연구의 일환으로 현탁배양 체세포배의 저온저장에 영향을 주는 체세포배의 발달단계와 접종밀도 등의 적정 조건과 저장 시기를 구명하고 유전자원의 장기적인 보존 및 효과적인 식물체의 재분화를 위해 수행되었다.

재료 및 방법

1. 배발생세포 및 체세포배의 저온저장조건

자생 가시오갈피의 엽병조직으로부터 배발생세포의 유도 및 배발생 세포의 증식, 2차 배형성, 체세포배 유도는 기존에 확립된 방법을 사용하였다 (Li & Yu, 2002). 액체배지에서 증식시킨 가시오갈피 배발생세포 100 mg을 50 ml의 MS 액체배지를 첨가한 250 ml의 삼각플라스크에서 접종하여 100 rpm의 교반속도로 현탁배양하였으며 배양은 21±2℃의 배양실에서 16/8시간의 광주기하에서 진행하였으며 2주 간격으로 새로운 배지로 계대배양하였다.

저온저장을 위한 배양조각은 각 성장단계에 따라 배발생세포, 구형배와 발아초기의 체세포배로 구분하여 새로운 배지로 계대배양하여 10 g/l의 설탕을 첨가한 50 ml의 1/3 MS 액체배지가 들어있는 250 ml의 삼각플라스크에서 배양 3일 후에 삼각플라스크를 4℃ (LG MICOM 제어 시스템, CA-B17AYZ), 암상태에서 저장하였다. 체세포배 접종밀도가 저온저장에 주는 영향을 조사하기 위하여 각각의 삼각플라스크에 배발생세포와 구형배는 100 mg과 500 mg, 발아초기단계의 체세포배는 500 mg과 5 g을 각각 접종하였다.

2. 저온저장 배발생세포 및 체세포배로부터 배발생 캘러스의 재생

4℃에서 15개월 간 저온저장된 배발생세포와 발아단계의 체세포배를 대상으로 10 g/l의 설탕을 첨가한 1/3 MS 액체배지와 10 g/l의 설탕과 2.5 g/l의 gelrite를 첨가한 1/3 MS 고체배지에 옮겨 21±1℃의 배양실에서 배양하여 배의 발달 및 성장이 회복되는 정도를 조사하였다. 4℃에서 36개월간 저온저장 한 구형배로부터 배발생세포의 유도를 위하여 저온 저장한 150개에서 200개 사이의 구형배를 생장조절물질을 첨가하지 않거나 0.2 mg/l의 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid)를 첨가한

MS 액체배지에 접종하여 21±1℃와 32±1℃로 배양온도를 달리하여 암상태에서 100 rpm의 회전속도로 현탁배양하였다. 배양은 50 ml의 액체배지가 들어있는 250 ml 삼각플라스크에서 진행하였으며, 계대배양 없이 6주 동안 배양한 후 구형배로부터 배발생 캘러스 형성율과 증식속도를 비교하였다.

3. 저온저장 후 형성된 배발생캘러스로부터 식물체 재분화

체세포배의 저온처리 이후에 형성된 가시오갈피 배발생세포와 2차배를 통하여 액체배양 내에서 유식물체를 직접 유기하였으며 배양된 유식물체는 10g/l의 설탕과 0.25%의 gelrite를 첨가한 1/3 MS 고체배지가 들어있는 500 ml 플라스틱 배양용기에 용기당 50~100개씩 담아 4℃의 저온 생장상에 저장하면서 재분화를 수행하였다. 배양용기는 70 ml의 고체배지가 들어있는 350 ml 플라스틱 배양용기를 사용하였고 용기당 10개의 유식물체를 치상하였다. 배양용기에서 형성된 완전식물체를 상토 (Klasmann, Germany)가 담긴 플라스틱상자 (35×55×15 cm)에 정식하여 투명비닐로 밀폐시켜 순화하였다. 순화는 광(50% 차광막), 온도 (10℃)와 습도조절 (60%)로 조절된 시설에서 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 배발생세포 및 체세포배의 저온저장조건

가시오갈피 체세포배의 저온저장 조건을 찾기 위하여 상온에서 현탁배양 중인 배발생세포, 구형배, 발아초기의 체세포배를 4℃에 저온 저장한 결과 저온상태에서의 생존력은 체세포배의 발달단계와 접종밀도에 따라 큰 차이를 나타냈다. 구형 체세포배는 접종밀도의 영향을 크게 받지 않고 2 g/l과 10 g/l의 접종밀도에서 모두 1년 이상 저온 저장이 가능하였다. 배발생 세포와 발아초기의 체세포배는 접종밀도에 따라 큰 차이를 보여 10 g/l의 높은 접종 밀도에서는 저온저장 1~2주 후부터 심하게 갈변되기 시작하여 (Figure 1 A, B) 저온 저장 시 체세포배의 접종량이 저온저장에 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 또한 체세포배를 저온에서 안정하게 장기보존할 수 있는 적정 접종밀도는 배발생세포와 발아초기의 체세포배는 2 g/l, 구형배는 10 g/l 이하가 적합한 것으로 나타났다.

2. 배발생 세포 및 각 단계의 체세포배의 저온저장 기간

저온저장 상태에서 기간에 따른 체세포배의 발달 및 생장을 조사한 결과 발아초기의 체세포배 저장 시 4℃에서 2개월까지 연속적으로 배축이 4~5 cm까지 신장하였으며 배축이 일정 부분 신장된 상태로 12개월까지 안정하게 저

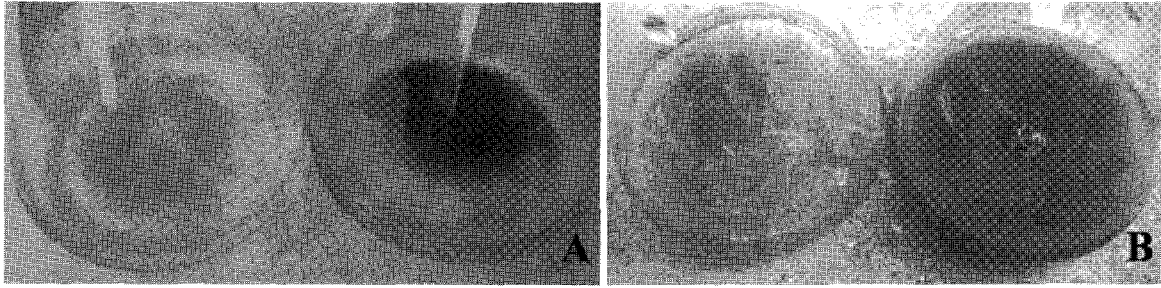


Fig. 1. Embryogenic cell and somatic embryos of *E. senticosus* after 15 weeks stored at 4 °C in 250 mL Erlenmeyer flasks (250 mL). Low temperature storage initiated with A: 100 mg (left) or 600 mg (right) of embryogenic cells, and B: 500 mg (left) or 5 g (right) of germinated somatic embryos, respectively.

장이 가능하였고 각 기간에 따라 식물체 전환율도 일정하게 유지되었다 (자료미제시). 저온저장 후 12개월 이후에는 급격히 안정성을 잃고 12개월 이상 저온 저장된 발아 초기의 체세포배를 다시 22°C의 배양실에 옮겨 배양하면 대부분이 생장을 회복하지 못하고 고사하여 발아 초기의 체세포배는 12개월 이상의 저온저장에 적합하지 않은 것으로 판단되었다.

배발생세포의 경우, 저장가능기간은 15개월까지 안정하게 저온저장이 가능한 것으로 나타났으며, 식물체 전환율도 일정한 상태로 유지되었다. 저온저장 후에도 배발생 세

포는 증식을 계속하였으나 그 속도에 있어서 상온에서의 배발생 세포의 증식보다 현저하게 낮아 배발생 세포의 증식 속도를 저온에 의해 조절할 수 있을 것으로 사료되어진다. 저온저장 15개월 이후에는 체세포배에서와 마찬가지로 생장을 회복하지 못하였다.

구형배는 다른 단계의 체세포배와 달리 4°C의 냉장 상에서 생장이 완전히 정지되었고 36개월까지는 원래의 형태를 유지하면서 저온 저장이 가능하였으나, 36개월 이후에는 생장을 회복하지 못하였다. 각 단계의 최대저온저장기간을 나타낸 것은 구형배로 나타났으며, 장기저장된 구형

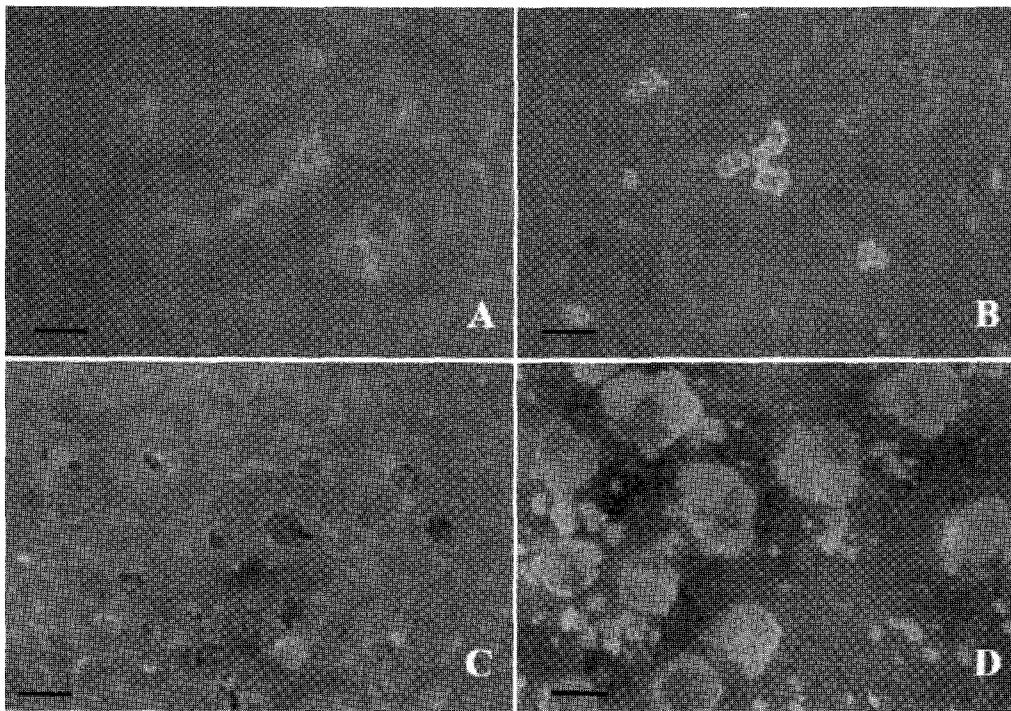


Fig. 2. Embryogenic callus induced from somatic embryos of *E. senticosus* are shown after 3 weeks of culture. Globular somatic embryos were stored for 36 months at 4 °C. Somatic embryos were cultured in MS free medium at 22 °C (A) or 32 °C (B), and in medium containing 0.2 mg/L 2,4-D at 22 °C (C) or 32 °C (D).

배로부터 배발생 캘러스의 유기를 통하여 유전자원으로서의 보존이 가능할 것으로 사료된다.

3. 저온저장된 구형배로부터의 배발생 세포의 유도

저온저장된 구형 체세포배로부터 배발생캘러스의 유도에 있어서 온도 및 2,4-D의 영향을 조사하였다. 50 ml의 액체배지가 들어있는 250 ml 삼각플라스크에 구형배 150~200개를 접종하여 온도(22, 32℃) 및 2,4-D의 첨가유무 (0.2 mg/l)로 나누어 배양한 결과 2,4-D를 처리하지 않은 배지에서는 22℃ (Fig. 2A)와 32℃ (Fig. 2B)의 배양온도 모두에서 온도처리에 따른 구형배로부터의 배발생 세포의 유도는 이루어지지 않았다. 배지에 0.2 mg/l의

2,4-D를 첨가한 경우에는 22℃ (Fig. 2C)와 32℃ (Fig. 2D) 모두에서 배양 3주 후부터 구형배가 부풀면서 탈분화하여 배발생 캘러스가 형성되었다. 배발생 캘러스의 형성율과 증식속도는 32℃에서 배양하는 경우가 더 양호하게 나타나 배발생 캘러스의 형성율은 22℃보다 15% 이상 높았고 증식속도도 빨라 배양 6주 후 32℃에서는 배발생 캘러스는 1.2 g까지 증식하였으나 22℃에서는 10 mg에도 미치지 못하였다 (Fig. 3, Table 1).

4. 저온저장된 구형배로부터 형성된 배발생캘러스로부터의 식물체 전환

증식한 배발생세포 (Fig. 4A)를 성장조절물질을 첨가하

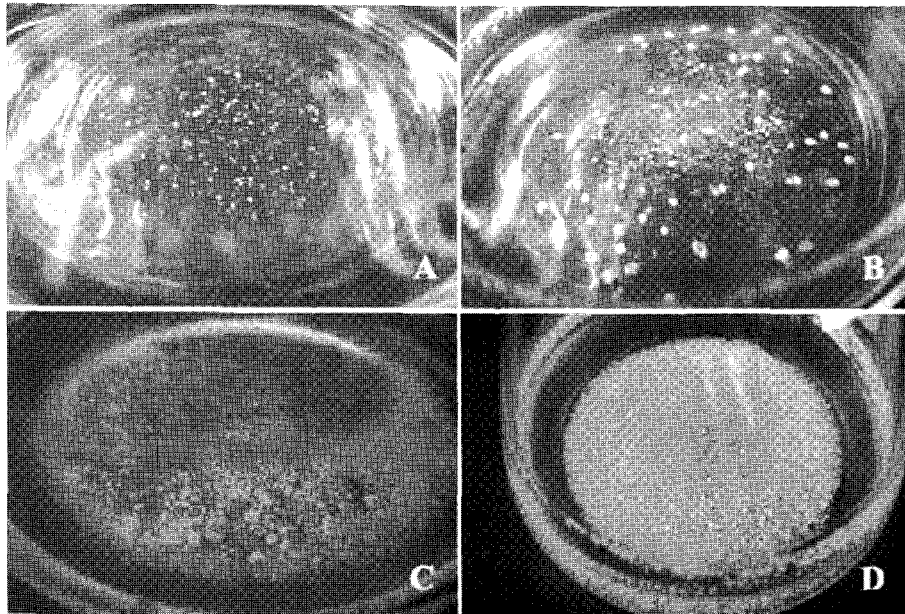


Fig. 3. Growth characteristics of embryogenic callus induced from long-term stored globular somatic embryos of *E. senticosus*. 1 week (A), 2 weeks (B), 4 weeks (C) and 6 weeks (D) after cultured in MS liquid medium with 0.2 mg/l 2,4-D at 32℃.

Table 1. Effect of 2,4-D and high temperature stress (32℃) on embryogenic callus induction and growth from globular stage somatic embryos of *E. senticosus* after 36 months storage at 4℃.

Temperature (℃)	2,4-D (mg/l)	No. of embryo cultured	6 weeks after cultured in MS liquid medium		
			No. of embryogenic cell induced	Embryogenic callus induction rate (%)	Fresh Weight (mg/flask)
22	0	176	0	0	1<
	0.2	160	36	22.5	10
32	0	162	0	0	1<
	0.2	145	55	37.9	1200

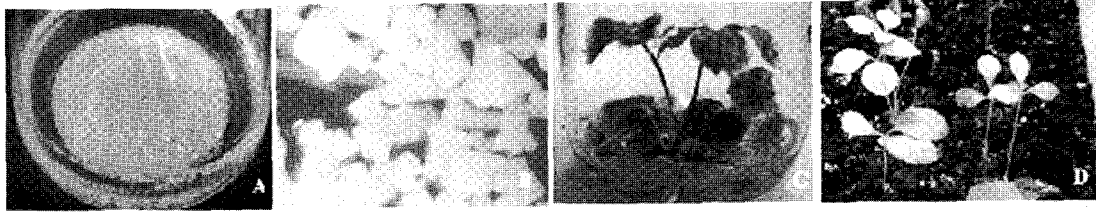


Fig. 4. Plant regeneration from long-term cold-stored somatic embryo of *E. senticosus*. Embryogenic callus (A), Somatic embryos (B), Regeneration of whole plants (C) and Acclimatization of plants to the soil (D).

지 않은 1/3 MS 고체배지에 옮겨 배양하여 각각 구형, 심장형, 어뢰형의 단계를 거쳐 배양 3개월 후 전부 완전한 식물체로 전환하였으며 (Fig. 4B,C) 재분화 식물체는 안전하게 순화할 수 있었다 (Fig. 4D).

보통 저온저장에는 저장온도가 매우 중요한 요소로 작용한다고 알려져 있으나 가시오갈피 체세포배의 저온저장에서는 저장밀도와 체세포배의 발달단계도 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 높은 접종밀도로서의 저온저장된 체세포배는 갈변하면서 생존하지 못하였는데 이러한 것은 왕성한 대사활성을 갖는 체세포배가 낮은 저장온도하에서도 대사활동을 통해 대사부산물을 형성하며 대사과정을 통해 생성·축적된 과량의 에틸렌과 CO₂에 의해 스트레스를 받은 결과에 기인한 것으로 사료된다. 충분히 성장한 자엽기의 가시오갈피 접합자배가 4°C에서도 발아하는 것 (Li *et al.*, 2003)과 마찬가지로 저온저장된 체세포배의 성장특성도 접합자배와 비슷한 특성을 나타내었다. 천궁의 체세포배도 4°C에 저장하였을 경우에 2개월 후부터 발아가 되기 시작하였으며 저장기간이 길어질수록 식물체 재생율이 낮아져 3개월 이상의 저장이 불가능하다고 보고하여 (Park & Chae, 1995) 가시오갈피의 체세포배 저온저장에서와 같은 결과를 나타냈다. 따라서 유전자원 및 cell line으로서의 저온장기저장에서 발달후기의 체세포배는 저온저장재료로 적합하지 않는 것으로 사료된다. 배발생캘러스도 저온 하에 낮은 밀도로 안정하게 12개월 이상 저장하는 것이 가능 하지만 잠재된 왕성한 대사 능력에 기인한 증식 때문에 저온 하에서의 저장이 제한된다고 할 수 있다. 이와 달리 구형배는 4°C의 저온에 저장한 다음 완전히 휴면에 들어가고 36개월 이상 형태적인 변화가 전혀 없었으며 36개월 이상 저온장기저장이 가능하였다. 이러한 것은 저온저장중의 체세포배는 대사활동의 속도가 매우 느려지며 (Richard *et al.*, 1991) 생리적 특성이 마치 접합자배의 휴면과 비슷한 상태에 처해있기 때문이며 (Bewley & Black, 1985) 저온에서 장기저장한 구형배를 생육에 적합한 온도로 옮기면 비록 체세포배로부터 직접적인 생육 회복 및 발달은 이루어지지 않더라도 체세포배 기원조직으로부터 쉽게 배발생캘러스를 유도해낼 수

있었다. 이러한 구형의 체세포배의 저온저장법을 통하여 전처리 및 설비가 요구되어지는 동결보존법에 기인하지 않고 체세포배를 유전자원 및 cell line으로서 안전하게 보존할 수 있을 것으로 사료되어진다. 한편 저온저장한 구형배로부터 배발생캘러스의 유도에 2,4-D의 첨가가 필수적으로 요구되어지고 있어 생장조절물질에 의존하지 않고 배발생캘러스를 유도해낼 수 있는 배양조건을 찾아보기 위한 연구를 지속적으로 수행하여야 할 것으로 생각된다. 저온저장된 체세포배를 생장조절물질이 첨가되지 않은 MS배지에 치상하였을시 저온저장된 체세포배로부터 식물체가 성공적으로 분화되었다.

적 요

체세포배발생을 이용한 가시오갈피 대량증식체계 확립을 위하여 저온처리에 의한 체세포배의 장기저장 실험을 수행하였다. 현탁배양 체세포배의 4°C에서의 저온저장에는 구형배 이전의 초기단계의 체세포배가 적합하였고 2 g/ℓ 이하의 낮은 접종밀도에서는 36개월 이상 저장이 가능하였다. 장기간 저온 저장한 체세포배는 상온에 옮긴 후 2,4-D를 첨가한 배지에서만 성장을 회복하여 배발생캘러스를 형성하였으며 배발생캘러스의 증식속도는 배양온도를 32°C로 높였을 때에 가장 효율적이었다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 바이오그린21 사업지원에 의하여 수행된 것으로 감사를 표한다.

LITERATURE CITED

- Bewley JD, Black M (1985) Seeds, Physiology of development and germination. Plenum Press, New York, USA.
 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.

- Kim JH, Moon HK, Park JI** (1986) Haploid plantlet induction through anther culture of *Populus maximowiczii*. Res. Rep. Inst. For. Gen. Korea 22:116-121.
- Kim SK** (2002) Studies of physiological characteristics and biological activities in *Eleutherococcus senticosus* Maxim. Kangwon Nat'l Univ. PhD Thesis. pp. 38-40.
- Li CH, Lim JD, Kim MJ, Heo K, Yu CY** (2003) Dehisced seed germination and seedling growth affected by chilling period in *Eleutherococcus senticosus* Maxim. Korean J. Medicinal Sci. 11(5):347-351.
- Li CH, Yu CY** (2002) Effect of genotype and explant on somatic embryogenesis and acclimatization of *Acanthopanax senticosus*. Korean J. Medicinal Sci. 10(3): 217-221.
- 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*. Korean J Plant Tissue Culture 14:137-140.
- Park JH, Chae YA** (1995) Synchronization, Storage and regeneration of somatic embryos in suspension culture of *Ligusticum chuanxiong*. Korean J. Breed. 27:163-169.
- Richard WJ, Kumar PP, Thrope TA** (1991) Long-term storage embryogenic white spruce tissue at ambient temperature. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 22:87-93.
- Sakai A, Nishiyama Y** (1978) Cryopreservation of winter vegetative buds of hardy fruit trees in liquid nitrogen. HortSci. 13:225-227.