현탁배양을 통한 땃두릅나무의 체세포배 유도

김희영* · 성은수** · 이재근* · 유지혜* · 황인성* · 김명조* · 임정대*** · 김나영**** · 유창연*†

*강원대학교 식물자원응용공학과, **강원대학교 한방바이오연구소,
강원대학교 생약자원개발학과, *송호대학교 호텔외식조리과

Establishment of Suspension Culture System to Induce Somatic Embryo in *Oplopanax elatus* Nakai

Hee Young Kim*, Eun Soo Seong*, Jae Geun Lee*, Ji Hye Yoo*, In Seong Hwang*, Myong Jo Kim*,
Jung Dae Lim**, Na Young Kim and Chang Yeon Yu*†

*Department of Applied Plant Sciences, College of Agriculture and Life Science, Kangwon National University,
Chuncheon 200-701, Korea.

**Bioherb Research Institute, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

***Department of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 245-907, Korea.

****Food Service Cuisine Songho College, Hoengseong 225-704, Korea.

ABSTRACT : This study was carried out to select the appropriate medium (especially, carbon and nitrogen source, potassium phosphate and pH) for somatic embryogenesis in order to develop the rapid mass production system in suspension culture of *Oplopanax elatus* Nakai. Direct somatic embryos were obtained from root explants in the hormone free suspension culture (MS). Combination of NH_4NO_3 and KNO_3 at the ratio of 1650 (mg/l) : 1900 (mg/l) obtained the better result to produce somatic embryo in suspension culture. MS medium supplemented with 170 mg/l KH_2PO_4 . The addition of 1 and 3% sucrose was effective for formation of embryogenic callus. Therefore, this report will be helped to improve the establishment for suspension culture in *Oplopanax elatus* Nakai.

Key Words : *Oplopanax elatus* Nakai, Somatic Embryogenesis, Suspension Culture

서 언

땃두릅나무 (*Oplopanax elatus* Nakai)는 식물분류학상 두릅나무과 땃두릅나무속에 속하며 영명은 Tall *Oplopanax*이며 한문명은 東北刺人蔘, 人伽木이다. 우리나라 한방에서는 주로 해열, 기침, 염증의 치료 및 완화제로 사용되어 왔으며, 인삼의 생리활성 작용과 유사하다고 전해져 왔다 (Fu, 1992). 땃두릅나무의 줄기에는 syringin, daucosterol, β -sitosterol, L-rhamnose가, 잎에는 cirensenosides O와 cirensenosides P가 함유되어 있는 것으로 알려져 있지만 (Zhang *et al.*, 1993), 아직까지 생리활성에 관한 연구는 미비한 수준이다 (Liu, 1992). 한편 땃두릅나무의 에탄올추출물을 흰쥐에 반복경구투여 하여 독성 시험을 수행한 결과, 독성이 없는 안전한 천연물로 확인되어 기능성식품으로서의 개발 가능성이 제기된 바 있다 (Kwon *et al.*, 2007).

땃두릅나무는 종자 결실율이 낮고, 종자는 미숙배 상태로 발

아하기까지 오랜 기간의 층적저장과 후숙이 필요하기 때문에, 번식은 일반적으로 분주, 휘묻이, 꺾꽂이 등의 무성생식방법이 활용되었다 (Wang, 1989). 대개 습기가 많고 부엽이 많은 사면 (斜面)에서 자라며 작은 군락을 이루지만 그 개체수는 적다 (Lee and Lee, 1997).

체세포배 발생 (somatic embryogenesis)을 이용한 식물체생 산기술은 식물체의 대량생산에 있어 다른 배양방법보다 효율적인 번식법으로 인식되고 있고, 두릅나무과의 수종 중 가시오갈피와 음나무의 조직배양 연구가 보고된 바 있으며 (Choi *et al.*, 1999; Moon *et al.*, 2008), 대량배양에 대한 연구 또한 활발히 이루어져 음나무와 두릅나무에서 배발생 캘러스의 현탁배양을 통한 체세포배 발달 및 식물체 재분화에 대한 연구가 시도된바 있다 (Kim and Moon, 2009; Jhang *et al.*, 1994). 땃두릅나무는 식물체 전체를 약용으로 사용할 수 있으나 우리나라 회귀 및 멸종위기 식물로 지정된 바 있으며 (Lee and Lee, 1997), 선행연구를 통해 기내번식을 위한 기관분화

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

Received 2012 October 2 / 1st Revised 2012 October 18 / 2nd Revised 2012 November 1 / Accepted 2012 November 9

및 체세포배 배양기술이 어느 정도 확립되었으나 (Moon *et al.*, 2006) 이는 고체배지에서의 체세포배 유기로 아직까지 액체배양을 통한 체세포배의 대량증식에 관한 연구는 발표된 바 없다.

본 연구는 땃두릅나무의 직접 체세포배 유도와 배발생세포를 이용하여 대량배양을 위한 기초자료로 활용하고자 수행되었으며, 체세포배 발달을 위한 현탁배양 조건을 확립하기 위해 배발생세포의 질소원, 인산염, 탄소원, pH 최적 조건을 구명하여 대량증식 체계연구에 토대를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서 사용된 재료는 강원대학교 실험농장에서 삼목한 땃두릅나무를 기내로 유도하여 plantlet으로 분화시키고 이를 1년동안 sub-culture한 기내배양체를 사용하였다.

2. 액체배양으로 직접체세포배 발생

직접체세포배 유도는 기내배양한 땃두릅나무 유식물체의 뿌리를 0.5~0.8 cm의 절편으로 만들어 이 중 5절편을 100 ml의 액체배지에 접종하였다. 유도배지는 3% sucrose를 첨가한 배지에 배지종류 및 농도가 직접 및 간접체세포배 발생에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MS, SH, WPM 배지를 각각 2x, 1x, 1/2x, 1/3x, 1/4x, 1/5x로 처리하여 8주 후에 체세포배 발생정도를 조사하였다.

3. 액체배양으로 간접체세포배 발생

체세포배의 증식에 있어 적정 조건을 알아보기 위한 실험은 액체배양으로 유도한 체세포배를 60 mesh의 체에 걸러 60 mesh 이하의 배발생세포를 150 mg을 접종하여 6주간 배양 후에 60 mesh 이상의 체세포배의 생체중을 조사하였다.

배지내의 질산태 질소와 암모니아태 질소의 농도 변화에 따른 배발생세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MS 배지에 포함되는 NH_4NO_3 와 KNO_3 의 농도를 각각 0:1900, 4130:1900, 825:1900, 1650:1900, 1650:950, 1650:470, 1650:0 (mg/l)을 처리하였다.

MS 배지에 포함된 인산염의 형태는 KH_2PO_4 로서 기본배지에 포함되는 170 mg/l을 기준으로 0, 42.5, 85, 170, 340 mg/l을 처리하였다. 체세포배 증식에 적합한 탄소원과 그 농도를 결정하기 위하여 자당 (sucrose)과 포도당 (glucose)을 각각 1, 3, 5%로 첨가하였다. 배지의 적정 pH를 결정하기 위한 MS 액체배지의 멸균전 pH를 각각 4.8, 5.8, 6.8, 7.8로 조정하였다.

액체배지는 500 ml 삼각플라스크에 100 ml 씩 분주하였고, 배양은 25°C, 16시간 광/8시간 암조건에서 회전속도를 100 rpm으로 하여 처리구당 10개 flask를 배양하였으며 3번 반복실험을 하였다.

결과 및 고찰

1. 액체배양으로 직접체세포배 발생

Table 1은 액체배양에 있어 땃두릅나무의 직접 체세포배 발생효율을 높이기 위한 배지의 종류와 농도를 알아보고자 MS, WPM, SH 배지의 염농도를 각각 2x, 1x, 1/2x, 1/3x, 1/4x, 1/8x로 달리하여 2달 동안 배양한 결과이다. 배양 4주만에 MS, 1/2 SH, 1/3 WPM 배지에서 직접적인 체세포배 발생을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1). 8주후 MS 배지에서는 활발한 2차배의 발생과 체세포배의 성숙을 확인할 수 있었고 1/2 SH 배지에서 가장 많은 2차배의 발생을 확인할 수 있었으나 미성숙상태의 배발생세포 상태인 것을 확인할 수 있었다. 1/3 WPM 배지에서는 체세포배의 성숙과 발아가 동시에 일어나는 것을 확인할 수 있었으나, 다아체 (多芽體; multiflous shooting)가 유도되고 이는 유리화 (hyperhydration)된 세포상태로 유기 되었으며, 고체배지에서의 유식물체로의 재분화가 온전히 이뤄지지 않고 갈변·고사되었다. 그러므로 동조화 (synchronization)된 2차배의 발달과 성숙면에서 탁월한 MS 배지로의 체세포배 유기가 가장 효율적이라 할 수 있겠다 (Fig. 2).

2. 액체배양으로 간접체세포배 발생

체세포배를 액체 배양했을 때 세포들이 배지와 접촉을 향상시킴으로서 영양분, vitamin 그리고 성장조절물질의 흡수를

Table 1. Effect of different medium on somatic embryo induction in liquid culture after 8 weeks.

Culture medium		Number of somatic embryo*
MS	2	0.0±0.0 ^{***}
	1	485.7±122.2 ^c
	1/2	17.7±3.2 ^a
	1/3	14.7±4.5 ^a
	1/4	23.7±5.5 ^a
	1/8	18.7±3.2 ^a
SH	2	2.3±2.5 ^a
	1	0.0±0.0 ^a
	1/2	0.0±0.0 ^a
	1/3	56.7±12.6 ^{bc}
	1/4	17.3±2.1 ^a
	1/8	22.0±4.6 ^a
WPM	2	0.0±0.0 ^a
	1	4.0±2.6 ^a
	1/2	88.0±30.6 ^b
	1/3	23.0±6.2 ^a
	1/4	10.7±6.7 ^a
	1/8	0.0±0.0 ^a

*Each value is the mean of at least three independent experiments ± SD.

***Within columns, means followed by the same letters are not significantly different at $p = 0.05$ according to Duncan's multiple range test.

Fig. 1. Induction of somatic embryo in suspension culture after 4 weeks.
(A); MS medium, (B); 1/2 WPM; (C); 1/3 SH.

Fig. 2. Induction of somatic embryo in suspension culture after 8 weeks.
(A); MS medium, (B); 1/2 WPM, (C); 1/3 SH.

빠르게 하여 고체 배양에 비해 생장율을 증가시킬 수 있으며 배양 규모를 확대할 수 있어 대량 생산이 가능하다는 이점들이 있다. 체세포배의 발달 과정에는 체세포 배가 유도되어 식물체로 전환 될 때까지 비동조성 (asynchronous), 조기 발아 (precocious), 그리고 부정형의 발생 등 여러 장애 요인들이 있으며, 이것이 체세포배를 이용한 대량 번식의 실용화에 결정적인 실패의 요인이 되기도 한다. 그러므로 체세포의 생장과 발달을 위해 배양 환경에 더 정밀한 조작을 요구한다 (Ammirato, 1984).

천궁의 배발생세포를 이용한 현탁배양에서의 체세포배 발생 효율을 알아보기 위하여 1/2× MS 배지를 기본으로 고정하고 질소원의 적정 양을 비교한 결과, NH_4NO_3 , KNO_3 가 238:825 (mg/ℓ) 비율일 때 체세포배 발생이 가장 효과적으로 질산태 질소를 고정하고 암모늄태 질소를 줄일수록 배발생 효과가 높아졌다 (Chae and Park, 1994). 지황의 경우 1× MS 배지를 기준으로 NH_4NO_3 , KNO_3 가 825:1900 (mg/ℓ) 비율일 때 체세포배 발생의 효율이 높았으며 이는 지황에서도 질산태 질소가 주요 질소원임을 확인하였다 (Chae and Park, 1999).

땃두릅나무 배발생세포로부터 체세포배로의 증식에 적정 질소원은 1× MS 배지를 기본으로 질소원을 농도별로 처리한 결과 본래 MS 배지에 첨가되어 있는 양인 NH_4NO_3 , KNO_3 가 1650:1900 (mg/ℓ)일 때 가장 효과적이었다. 이는 질소태 질소나 암모니아태 질소만 단독으로 처리한 것보다 3배이상 높은 증식률을 나타냄으로써 땃두릅나무의 체세포배 증식에

있어 적정 질소원은 질산태 질소와 암모니아태 질소가 적절한 비율을 이룰 때 효과적인 것을 나타낸다 (Table 2). 2차 체세포배 유도를 위한 적정 인산염(KH_2PO_4)의 양은 170 mg/ℓ 으로 MS 배지에 기본 포함하는 양일 때 2차 체세포배가 효과적으로 유도되었다 (Table 3).

배지 내에 첨가되는 탄소원으로 자당과 포도당을 각각 1, 3, 5%로 처리하여 6주간 배양한 후 체세포배의 증가양상을 조사한 결과는 표4와 같다. 포도당의 경우 1% (741 mg/flask)로 농도가 낮은 경우에, 자당의 경우 비교적 모든 농도에서 효과적이었다. 이와 같은 결과를 종합하여 볼 때 땃두릅나무의 액체배양에서 간접체세포배 발생을 유도하는 적정 탄소원으로서

Table 2. Effect of NH_4NO_3 : KNO_3 ratio on somatic embryo propagation in suspension culture after 6 weeks.

NH_4NO_3	KNO_3 (mg/ℓ)	Fresh weight (mg/flask)*
0	1900	192.5±64.1 ^{d**}
413	1900	378.2±106.2 ^{bc}
825	1900	437.5±77.5 ^b
1650	1900	729.2±176.8 ^a
1650	950	300.0±84.5 ^{bcd}
1650	475	164.2±35.0 ^d
1650	0	225.0±67.4 ^{cd}

*Each value is the mean of at least three independent experiments ± SD.
**Within columns, means followed by the same letters are not significantly different at $p = 0.05$ according to Duncan's multiple range test.

Table 3. Effect of KH_2PO_4 on somatic embryo propagation in suspension culture after 6 weeks.

KH_2PO_4 (mg/l)	Fresh weight (mg/flask)*
0	167.5±22.9 ^{c**}
43.5	497.5±15.0 ^b
85	383.3±7.2 ^b
170	729.2±176.8 ^a
340	550±66.1 ^{ab}

*Each value is the mean of at least three independent experiments ± SD.
 **Within columns, means followed by the same letters are not significantly different at $p = 0.05$ according to Duncan's multiple range test.

Table 4. Effect of carbohydrate source and its concentration on somatic embryo propagation in suspension culture after 6 weeks.

Carbohydrate conc. (g/l)		Fresh weight (mg/flask)*
Glucose	10	741.7±62.9 ^{a**}
	30	500.0±125.0 ^b
	50	150.0±43.3 ^c
Sucrose	10	729.2±176.8 ^a
	30	808.3±62.9 ^a
	50	608.3±101.0 ^{ab}

*Each value is the mean of at least three independent experiments ± SD.
 **Within columns, means followed by the same letters are not significantly different at $p = 0.05$ according to Duncan's multiple range test.

Table 5. Effect of pH on somatic embryo propagation in suspension culture after 6 weeks.

pH	Fresh weight (mg/flask)*
4.8	729.2±176.8 ^{a**}
5.8	808.3±62.9 ^{a†}
6.8	158.3±38.2 ^b
7.8	208.3±38.2 ^b

*Each value is the mean of at least three independent experiments ± SD.
 **Within columns, means followed by the same letters are not significantly different at $p = 0.05$ according to Duncan's multiple range test.

sucrose 농도를 3% 처리하는 것이 적합함을 알 수 있었다. 한편 천궁에서는 체세포배 생산을 위한 현탁배양 시 탄소원으로 자당인 sucrose를 처리한 것이 효과적이었으며, 1% 처리가 가장 양호하였으며 농도가 높아짐에 따라 체세포배 형성이 억제되었다 (Chae and Park, 1994).

당근의 체세포배 증식을 위한 생물반응기 배양에서의 pH 4.8에서 배양했을 때 pH 5.8인 경우보다 심장형 체세포배 증식률이 3배 정도 높았으며, 어뢰형이나 자엽기배로의 발달을 억제시켜 동조화를 부여할 수 있었다는 보고가 있다 (Veronique et al., 1994). 땃두릅나무의 체세포배의 증식에 대한 pH의 영향을 조사하고자, 멸균 전 배양액의 pH 수준을 달리하여 배양한 결과 산성인 pH 4.8과 5.8이 효과적인 것으로 나타났으며, 모든 pH에서 구형의 체세포배로 발달하여 어뢰형이나 자

Fig. 3. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in *Oplopanax elatus*. (A); Shoot and embryogenic callus browned from plantlet's root treated with NAA 0.5 and TDZ 0.05 mg/l in suspension culture after two months, (B); Direct somatic embryo formation from root explant in growth regulator free suspension culture after two months, (C); Rooting of a somatic embryo on the solid medium (1/3 MS medium, 1% sucrose, 1% plant agar), (D); Plantlets grown on the medium after 4 months, (E); Acclimatized plants of *Oplopanax elatus* after 2 months.

엽기배로의 발달이 억제된 상태로 동조화된 것을 확인할 수 있었다 (Table 5).

두릅나무 (*Aralia elata* S.)의 경우, 고체배지에서의 2,4-D와 thidiazuron를 조합하여 캘러스를 유기하는 단계, 1/4 MS 배지에서 두릅나무의 체세포배를 유도하고 발아를 유도하는 단계로 나누어진 연구가 이루어졌으며 (Jhang *et al.*, 1994), 두릅나무과에 속하는 음나무 (*Kalopanax septemlobus* K.)의 연구에서는 액체배양을 통한 배발생 캘러스의 증식 및 체세포배를 효과적으로 유도하고 체세포배 생산을 위한 배양 기간의 단축이 가능함을 보여주었다 (Kim and Moon, 2009).

이전 연구에서는 땃두릅나무의 체세포배 형성과 유식물체 유도를 위하여 0.3% gelrite를 교질물질로 사용한 고체배지 상에서 2,4-D와 thidiazuron를 조합 처리하여 캘러스를 유기하는 단계, 이를 ABA와 활성탄을 함유한 배지에 옮겨 체세포배를 유기하는 단계, gibberellic acid를 처리하여 체세포배의 발아를 유도하는 단계로 3단계로 나누어 진행하였다 (Moon *et al.*, 2006). 반면 본 연구에서 체세포배 유기를 위한 단일, 조합 호르몬을 처리한 현탁배양에서는 embryogenic callus가 유기되는 듯 보이다가 유리화 및 갈변되었지만, 호르몬을 첨가하지 않고 현탁배양하여 땃두릅나무 유식물체의 뿌리 부위에서 직접 배발생세포의 유도 및 체세포배의 증식이 가능한 것을 확인하였다. 또한 60 mesh 이상의 체세포배는 1/2 MS (3% sucrose) 배지에 2주정도 현탁배양함으로써 1 cm 이상의 어뢰형 배로 유도할 수 있었고, 이를 1/3 MS (1% sucrose) 배지에 교질 물질로 1% plant agar를 처리한 고체배지에 4개월 동안 배양하여 초장 3 cm 이상의 완전히 재분화된 유식물체를 얻을 수 있었다. 땃두릅나무 유식물체를 펄라이트를 포함한 상토에 순화한 결과, 2달 뒤 100%의 생존율을 보였다 (Fig. 3).

이와 같이 땃두릅나무의 현탁배양을 통한 직접적인 체세포배 유도를 기반으로 최적화된 현탁배양 구축으로 복잡한 배양 체계를 단순화하고 배양기간을 단축함으로써 희귀 멸종 위기의 땃두릅나무의 대량증식 및 효율적인 무병주 생산의 가능성을 확인하였다.

LITERATURE CITED

- Ammirato PV.** (1984). Induction, maintenance and manipulation of development in embryogenic cell suspension cultures. In Wasil IK. (ed.). Cell culture and somatic cell genetics of plants(Vol. 1). Academic Press. London, England. p.139-151.
- Chae YA and Park JH.** (1999). Effect of carbon, nitrogen sources and pH on direct somatic embryogenesis in liquid culture of *Rehmannia glutinosa* Lib. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 7:1-6.
- Chae YA and Park SU.** (1994). Effect of carbon and nitrogen source on somatic embryogenesis in suspension culture of *Ligusticum chuanxiang* Hort. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 2:44-50.
- Choi YE, Kim JW, Kim YS and Yoon ES.** (1999). High frequency of plant production via somatic embryogenesis from callus or cell suspension cultures in *Eleutherococcus senticosus*. Annals of Botany. 83:309-314.
- Fu LK.** (1992). Rare and Endangered Plant. In Fu LK. (ed.). China plant red data book(Vol. 1). Science Press. Beijing, China. p.741-789.
- Jhang HH, Park CH, Lee YS and Shin YB.** (1994). Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of *Aralia elata* S. Korean Journal of Plant Tissue Culture. 21:167-171.
- Kim SJ, and Moon HK.** (2009). Establishment of suspension culture condition for embryogenic callus proliferation and somatic embryo development of *Kalopanax septemlobus*. Journal of Plant Biotechnology. 36:7-12.
- Kwon HS, Kim DH, Shin HK, Yu CY, Kim MJ, Lim JD, Park JK and Kim JK.** (2007). Fourteen-day repeated-dose oral toxicity study of the ethanol extracts isolated from *Oplopanax elatus* in sprague-dawley rat. Korean Journal of Food Science and Technology. 39:470-475.
- Lee YM and Lee WY.** (1997). Illustrated rare and endangered species in Korea. The Tree of Life Press. Seoul, Korea. p.171.
- Liu J.** (1992). Chemical constituents of the root of *Oplopanax elatus* Nakai. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences. 17:546-547.
- Moon HK, Kim JA, Park SY, Kim YW and Kang HD.** (2006). Somatic embryogenesis and plantlet formation from rare and endangered tree species, *Oplopanax elatus*. Journal of Plant Biology. 49:320-32.
- Moon HK, Park SY, Kim YW and Kim SH.** (2008). Somatic embryogenesis and plantlet production using rejuvenated tissues from serial grafting of a mature *Kalopanax septemlobus* tree. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. 44:119-127.
- Veronique J, Simone G and Jean-Claude C.** (1994). Bioreactor studies of the effect of medium pH on carrot(*Daucus carota* L.) somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 36:205-209.
- Wang JP.** (1989). Changbaisanzhi. Jilin Literature and History Press Books. Changchun, China. p.198.
- Zhang HG, Wu GX and Zhang YM.** (1993). Chemical constituents from stems of *Oplopanax elatus* Nakai. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences. 18:104-105.