

다양한 통계분석 기법을 이용한 개느삼(*Sophora koreensis* Nakai)의 기내 증식 최적 조건 구명

정육한 · 이화 · 박상희 · 정은주 *

강원대학교 산림환경시스템학과

Optimizing *In Vitro* Propagation of *Sophora koreensis* Nakai using Statistical Analysis

Ukhan Jeong, Hwa Lee, Sanghee Park and Eun Ju Cheong *

Department of Forest Environment System, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

요약: 개느삼(*Sophora koreensis* Nakai)은 우리나라 고유종으로 강원도 일부 지역에 자생하는 식물로 유용 기능성 성분이 포함되어 경제성이 높은 생물자원 식물로 평가된다. 따라서 자원 확보를 위한 대량증식이 필요하다. 조직배양을 이용한 번식은 빠르게 대량증식이 가능하다는 점에서 유용하여 개느삼을 영양체를 이용하여 조직배양을 통해 증식법을 개발하고자 하였다. 줄기 생장에 효과적인 호르몬의 종류와 농도에 대한 실험을 수행하고 다양한 통계분석법으로 분석하여 줄기생장에 가장 효과적인 성장조절물질의 적정조건을 구명하고자 하였다. 본 연구에서는 기내 식물체 개느삼을 세 가지 성장조절물질을 혼합 처리 후 5주간 배양하여 얻은 생장결과를 분산분석(ANOVA)과 반응표면분석(Response Surface Method, RSM), 퍼지 군집(Fuzzy Clustering)분석을 수행하였다. 그 결과 반응표면분석은 ANOVA 분석과 퍼지 군집 분석 결과와 상이하고 실제 생장결과에 부합하지 않아 적정조건 구명을 위한 통계분석법으로 적용하기에 적절하지 않은 것으로 나타났다. 반면 ANOVA 분석과 퍼지 군집 분석은 상위 다섯 가지 처리구에 대해서 줄기생장과 줄기길이 생장에 효과적인 것으로 나타나는 유사한 결과를 보여주었다. 다만 퍼지 군집 분석은 각 처리와 결과값의 예측 확률을 제시해주어 ANOVA 분석에서 나타내는 단순 평균값 비교로 농도의 범위를 나타내어 정확한 조합 선택이 어려운 점을 보완할 수 있었다. 퍼지 군집 분석법 결과에 따르면 개느삼 줄기조직은 5 μ M 6-Benzylaminopurine(BA)와 2.5 μ M Thidiazuron(TDZ)이 혼합된 배지에서 가장 많은 줄기를(11.03 \pm 1.52개, 63.33%) 생산하였으며, 줄기길이 생장은 2.5 μ M BA, 2.5 μ M TDZ, 2.5 μ M Gibberellic acid(GA₃) 조합된 배지에서 가장 긴 것으로(2.18 \pm 0.21 cm, 63.33%) 나타나 개느삼 기내배양을 위한 최적 호르몬의 구성인 것으로 나타났다.

Abstract: *Sophora koreensis* Nakai is an indigenous plant in Korea with a restricted natural range, part of which is in Gangwon province. The species is known to contain phytochemicals that have beneficial effects on human health, and it is economically important in bioindustry. Because of the limited number of plants in a small range of habitats, the mass-propagation method should be developed for use and conservation. *In vitro* tissue culture is a reliable method in terms of mass propagation from selected clones of the species. We investigated the optimal conditions of the medium in this process, especially focusing on the concentrations of plant growth regulators(PGRs) in the culture of stem-containing axillary buds. Three statistical methods, i.e., ANOVA, response surface method(RSM), and fuzzy clustering were used to analyze the plant growth, number of shoots induced, and shoot length with various combinations of PGRs. Results from the RSM differed from those of the other two methods; thus, the method was not suitable. ANOVA and fuzzy clustering showed similar results. However, more accurate results were obtained using fuzzy clustering because it provided a probability for each treatment. On the basis of the fuzzy clustering analysis, stem tissue produced the greatest number of shoots(11.03 per explant; 63.33%) on a medium supplemented with 5- μ M 6-benzylaminopurine and 2.5- μ M thidiazuron(TDZ). Proliferation of shoots(2.18 \pm 0.21 cm, 63.33%) was attained on a medium supplemented with 2.5- μ M BA, 2.5- μ M TDZ, and 2.5- μ M gibberellic acid.

Key words: *Sophora koreensis nakai*, *In vitro* propagation, fuzzy k-means clustering, response surface method

* Corresponding author
E-mail: ejcheong@kangwon.ac.kr

ORCID
Eun Ju Cheong  https://orcid.org/0000-0002-2576-5435

서론

개느삼(*Sophora koreensis* Nakai)은 콩과 개느삼속으로 1속 1종인 우리나라 특산식물의 하나로 조경수로서의 용도와 기능성 식물로서 항산화물질을 함유하고 있어 바이오 소재로 이용이 유망한 수종이다(Lee et al., 2014). 특히 나고야의정서가 발효됨에 따라 바이오산업에 이용되는 생물자원의 원산지는 상품개발 이후 이익공유에 지대한 영향을 미치므로 우리나라 고유 특산수종이라는 점에서 개느삼은 중요하다고 할 수 있다. 그러나 개느삼은 자생지가 강원도 일부 지역에 한정되어 있으며 주로 무성번식으로 번식하여 유전다양성이 낮고(Lee, 1982), 유용성분이 함유되어 있는 것으로 밝혀진 이후 남채로 인해 자생지를 보호구역으로 지정된 상태이다. 따라서 유전자원을 보존하면서 생물자원으로 이용하기 위해서는 현지의 보존과 더불어 대량 증식법 개발이 필요한 실정이다. 개느삼은 자생지에서 종자 결실이 이루어지나 해충에 의한 피해로 실생번식이 거의 이루어지지 않는 상태이며 주로 지하경을 이용한 근삽법을 통해 번식한다. 조직배양을 이용한 번식은 공간 이용 면에서 많은 공간이 요구되지 않아 경제적이며 적절한 환경조건을 주어 빠르게 증식이 가능하다는 점에서 유용하다. 특히 생물소재로 이용하기 위해서는 기능성 성분을 다량 함유한 특정 개체의 증식이 필요하므로 기내배양을 이용한 증식법 개발은 매우 유용하다.

어떤 식물의 조직배양에서 최적의 배지나 호르몬 조합을 설정하기 위해 일반적으로 평균을 비교하는 ANOVA 분석법을 이용하게 되는데 이 실험계획법에서는 미리 정한 인자의 수준들의 사이에 곡면성을 확인할 수 없으며 실험 전 미리 정한 농도의 수준 조합 중 하나가 된다는 제약이 있다. 이를 보완할 수 있는 분석방법으로 반응표면 분석(Response Surface Method, RSM)이 있다. 이 분석법은 농업은 물론 기계, 식품 등 산업 전반에 걸쳐 연구개발 및 품질개선 도구로 활용되고 있으며 여러 개의 인자가 상호작용을 하는 경우, 각 수준의 추정치들을 3차원 공간에 나타내어 실험 결과의 추정치들을 지나는 선이나 면인 반응표면(response surface)에서 최대점이나 최소점을 찾아 수율을 최적으로 하는 공정을 찾을 수 있는 장점이 있다(Park and Kim, 2018). 반응표면분석법은 주로 식물원료를 이용한 상품제조에 품질 유지를 위한 최적조건을 탐색하거나(Choi et al., 2014), 의약품 생산공정의 최적화(Yoon et al., 2007)에 이용되고 있다. 한편 퍼지 집합 논리(Fuzzy clustering Logic)는 경계의 불확실성 및 분류의 불확실성을 다룰 수 있도록 창안된 이론으로 애매하고 불분명한 기준을 수학적으로 접근하는 논리로 여러 요인들을 0~1 사이의 실수값으로 확장하여 소속하는 정도를 소속함

수로 나타내고 근집화함으로써 명확한 경계와 분류가 포함된 기존 집합이론을 포함한 개념으로 개체분류의 수학적 근거를 제시해주어 자료의 부정확, 불확실, 모호함을 판단할 수 있도록 해주는 장점이 있다. 이 분석법은 요인의 명확함을 판별하기 어려운 의료진단이나 생물정보학 분야에 유용할 것으로 기대되는 분석법으로 생각되고 있다(Jung, 2018).

본 연구에서는 개느삼 대량증식법 개발 연구 중 다양한 호르몬과 농도를 실험하고 결과에 세 가지 다른 통계학적 분석을 적용하여 가장 효과적인 증식조건을 탐색하고, 새로운 분석법이 기내배양 결과 분석에 적용 가능성을 판단하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 식물재료 및 기내배양

2019년 6월 춘천 동면의 자생지에서 채집한 식물체의 싹에서 액아를 1개 이상 포함한 줄기를 초대 배양 재료로 이용하였다. 배양 조건은 Moon and Kim(2008)에 따라 선정하였으며 이후 기내에서 생산된 줄기를 같은 크기(0.5 cm)로 조제하여 다경유도 실험을 수행하였다. 배지는 MS 배지(Murashige and Skoog, 1962)를 사용하고 배지의 공통조건으로 pH 5.8, 3% Sucrose, Agar 4.5 g/L, Gelrite 1.25 g/L를 처리하였다. 식물생장조절물질은 줄기생산을 위한 BA, TDZ와 줄기길이 생장을 위한 GA₃를 각각 0 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M로 27가지 혼용 처리된 유리 시험관 배지에 치상하였고, 24 \pm 1 $^{\circ}$ C와 16시간-8시간의 광암 주기로 유지되는 배양실에서 5주간 배양하였다. 배양 5주 후 각 절편체에서 생산된 줄기 갯수와 각 줄기의 길이를 조사하였으며, 이 데이터를 기반으로 ANOVA, 반응표면분석과 퍼지 근집 분석을 수행하였다.

2. 통계분석

1) ANOVA 분석

ANOVA(Analysis of Variance) 분석은 둘 이상의 집단 간 평균의 차이를 검증하는 방법으로 한 개의 실험요인에 대해 여러 가지 다른 처리의 반응에 대한 차이를 검증하는 One-way ANOVA 분석을 수행하였다. 본 연구에서는 SPSS ver.24를 이용해 독립변수인 생장조절물질 처리구를 기준으로 개느삼의 줄기수와 줄기길이를 하나의 종속 변수로 처리하여 두 번의 분석을 실시하였다. 각 집단 간 평균의 차이를 검증하기 위해 사후검증으로 Tukey 검증을 수행하였으며, 기초통계량을 산출하여 각 생장조절물질 처리구간에 동질적 부분집합 $a-h$ 를 도출하였다.

2) 반응표면분석

식물생장조절물질의 최적농도를 결정하기 위해 실험계획법(Design Of Experiments, DOE) 중 반응표면분석법(Response Surface Method, RSM)을 이용하였다. 각 독립변수의 최적농도 산출은 중심합성계획법(Central Composite Design, CCD)을 적용하였으며(Box and Wilson, 1951), 3개의 독립변수 BA(X₁), TDZ(X₂), GA₃(X₃)를 -1, 0, 1의 3개 수준으로 부호화하였다(Table 1). 종속변수(Y)는 줄기수(Response Y₁)와 줄기길이(Response Y₂)를 측정하고, 독립변수들을 선형변환하여 선형변환변수(x_i)로 회귀모델을 산출하고, 3회의 27개 실험구를 선정된 조건에서 실험을 수행하였다. 각 실험변수(X_i)를 선형변환하면 식 1과 같으며,

$$x_1 = \frac{BA - 2.5}{2.5}, x_2 = \frac{TDZ - 2.5}{2.5}, x_3 = \frac{GA_3 - 2.5}{2.5} \quad (1)$$

반응값 y에 대한 2차 다항식은 식 2와 같다.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon \quad (2)$$

β₀는 절편(상수, intercept)이며 β_x는 회귀계수로, 회귀분석에 의한 모델식 예측은 R ‘rsm’ package를 이용해 수행하였다.

3) 퍼지군집분석

퍼지 군집(Fuzzy Clustering)에서는 퍼지 이론(Fuzzy set theory)에 기초하여 각 측정치가 여러 군집에 속할 수 있으며, 이를 각 군집에 속할 가능성을 확률로 제시해준다. 본 연구에서는 R ‘fclust’ package를 이용하여 퍼지 K-평균 군집 알고리즘을 사용하였으며, 줄기생산 우수, 줄기길이 우수, 양쪽 우수 또는 열세 군집을 분류하기 위해 3개(K = 3) 이상의 군집을 지정하여 분석을 수행하였다. 각 측정치가 특정 군집에 속할 가중치(가능성) 값을 무작위로 할당하여 군집 내 측정치 간의 유사성을 최대화하고 군집 간 비유사성을 최대화하는 최적값을 알고리즘이 수렴할 때까지 반복연산을 통해 산출하였다.

Table 1. Coded and real values in the central composite design.

Factor	Variable	Level of factor		
		-1 (μM)	0 (μM)	1 (μM)
BA	X ₁	0	2.5	5
TDZ	X ₂	0	2.5	5
GA ₃	X ₃	0	2.5	5

결과 및 고찰

1. ANOVA 분석에 따른 배양조건 분석

새로 생산된 줄기 수와 줄기길이 값에 대한 ANOVA 분석 결과 동질적 부분집합 최우수개체 집합h(줄기수)가 포함된 조합은 5 μM BA와 2.5 μM TDZ 조합과 2.5 μM BA와 2.5 μM TDZ 이었으며, 집합f(줄기길이)가 포함된 조합은 2.5 μM BA와 2.5 μM GA₃, 2.5 μM BA 단독처리, 5 μM BA 단독처리, 2.5 μM BA와 5 μM GA₃ 혼용처리로 나타났다. 이 분석법의 결과에 따르면 한 처리구에서 동시에 줄기 수, 줄기길이의 최우수개체에 속하는 처리구는 없었다. 집합h의 줄기수는 11.03±1.52개, 집합f의 줄기길이는 2.18±0.21 cm로 나타났다(Table 2).

TDZ의 유무에 따라 줄기 수와 줄기길이 간에 음(-)의 상관관계를 보였으며, Moon and Kim(2008)의 연구에 보고된 바와 같이 TDZ를 처리할 경우 줄기 수가 확연히 늘어났다. TDZ 처리시 BA, GA₃ 혼합처리보다 같은 사이트 킨 계열인 BA와 처리할 경우에 줄기수가 우수한 경향을 보였으나 줄기 길이 생장에는 효과가 적었다. 반면 TDZ가 포함되지 않은 처리구에서는 BA, GA₃ 혼합처리시 GA₃ 농도를 BA보다 같게 혹은 높이거나, BA 단독처리구에서 줄기생장이 더 우수한 것으로 나타났다. 이는 고농도의 BA는 줄기신장을 방해하는 경향이 있어 줄기신장을 위해 BA의 농도를 낮추고 GA₃를 첨가해야 하는 실험의 결과와 유사하게 나타났다(Cheong, 2000).

2. 반응표면분석법에 따른 배양조건 분석

반응표면분석을 조직배양 실험결과 분석에 이용한 경우, 옥신, 사이토키닌, 지베렐린 계열의 식물생장조절물질이 복합적으로 작용할 때, 하나의 최적의 배지 조성값을 예측하고 생장조절물질 간의 상호관계를 확인할 수 있을 것으로 기대하였다. 독립변수는 BA(X₁), TDZ(X₂), GA₃(X₃) 3가지 요인을 변수로 설정하고 3개 수준의 실험계획을 수립하여 줄기수와 줄기길이를 측정하였다. 줄기수 회귀방정식은 식 3과 줄기길이 회귀방정식은 식 4와 같다.

$$y = 4.13580 + 1.37037 \times BA + 1.55556 \times TDZ - 1.07407 \times GA_3 - 0.63889 \times BA \times TDZ - 1.61111 \times BA \times GA_3 + 0.61111 \times TDZ \times GA_3 + 0.25926 \times BA^2 - 1.07407 \times TDZ^2 + 1.03704 \times GA_3^2 \quad (3)$$

$$y = 1.219630 - 0.005000 \times BA - 0.391481 \times TDZ - 0.146296 \times GA_3 - 0.038611 \times BA \times TDZ + 0.045000 \times BA \times GA_3 + 0.074167 \times TDZ \times GA_3 - 0.121667 \times BA^2 + 0.292222 \times TDZ^2 + 0.195556 \times GA_3^2 \quad (4)$$

Figure 1은 각 수준에서의 추정치들을 Figure 2와 3처럼 3차원 공간에 나타낸 예측모델의 기저면을 등고선으로 나타낸 contour plot으로, 3요인 독립변수들의 최적조건을 산출한 결과, 다경유도를 위해서 BA : TDZ : GA₃의 농도는

각각 3.90, 4.41, 4.32 μ M이 가장 효과적일 것으로 도출됐으며, 줄기 길이는 BA : TDZ : GA₃가 각각 2.32, 4.08, 3.16 μ M 인 것으로 도출되었다. 그러나 이 결과는 실제 배양 결과와는 일치하지 않았으며 다른 두 분석법인 ANOVA와 퍼지군집분석의 최적조건과 다른 결과였다. 3요인 독립변수들의 최적조건을 산출하는데 RSM을 이용하는 것이 부합하지 않는 것으로 나타났다(Table 2). 이는 성장조절물질 처리결과가 편향되며 각 개체의 성적조사 값간 분산이 컸기 때문이었는데 이런 결과가 나오게 된 것은 기내배양은 다른 연구의 제품생산과는 다르게 식물

Table 2. ANOVA results for shoot number and average shoot length.

Treatments (μ M)	Shoot number (ea)	Average shoot length (cm)
B0T0G0	1.07±0.07 ^a	1.63±0.24 ^{cde}
B0T0G2.5	1.27±0.10 ^{ab}	0.82±0.04 ^a
B0T0G5	1.63±0.24 ^{ab}	1.14±0.16 ^{abc}
B0T2.5G0	4.43±0.67 ^{abcdefg}	1.05±0.11 ^a
B0T2.5G2.5	4.57±0.60 ^{abcdefg}	0.94±0.06 ^a
B0T2.5G5	4.33±0.49 ^{abcdefg}	0.90±0.05 ^a
B0T5G0	5.97±0.84 ^{defg}	1.05±0.06 ^{ab}
B0T5G2.5	4.80±0.86 ^{abcdefg}	0.90±0.06 ^a
B0T5G5	6.47±0.67 ^{fg}	0.87±0.05 ^a
<u>B2.5T0G0</u>	4.03±0.50 ^{abcdefg}	<u>2.10±0.19^{ef}</u>
<u>B2.5T0G2.5</u>	1.97±0.19 ^{abc}	<u>2.18±0.21^f</u>
<u>B2.5T0G5</u>	2.33±0.22 ^{abcd}	<u>1.69±0.13^{def}</u>
B2.5T2.5G0	7.47±1.53^{gh}	0.95±0.06 ^a
B2.5T2.5G2.5	3.40±0.39 ^{abcdef}	0.90±0.06 ^a
B2.5T2.5G5	4.67±0.65 ^{abcdefg}	0.83±0.05 ^a
B2.5T5G0	6.33±1.32 ^{efg}	0.95±0.07 ^a
B2.5T5G2.5	4.43±0.52 ^{abcdefg}	0.69±0.03 ^a
B2.5T5G5	3.53±0.32 ^{abcdef}	0.75±0.04 ^a
B5T0G0	4.83±0.74 ^{bcdefg}	<u>1.71±0.19^{def}</u>
B5T0G2.5	2.67±0.29 ^{abcde}	1.08±0.07 ^{ab}
B5T0G5	3.20±0.32 ^{abcdef}	1.59±0.11 ^{bcd}
B5T2.5G0	11.03±1.52^h	1.20±0.07 ^{abcd}
B5T2.5G2.5	5.97±0.90 ^{defg}	0.79±0.04 ^a
B5T2.5G5	4.83±0.39 ^{bcdefg}	0.99±0.04 ^a
B5T5G0	5.87±0.65 ^{defg}	1.00±0.06 ^a
B5T5G2.5	4.93±0.80 ^{bcdefg}	0.81±0.03 ^a
B5T5G5	5.43±0.63 ^{cdefg}	0.80±0.04 ^a

^a B: 6-Benzylaminopurine, T: Thidiazuron, G: Gibberellic acid.

^b Underline, Treatments that belong to set *f*; Bold, Treatments that belong to set *h*.

^c The different letters in column indicate significantly difference at $p < 0.05$ by Tuckey HSD test.

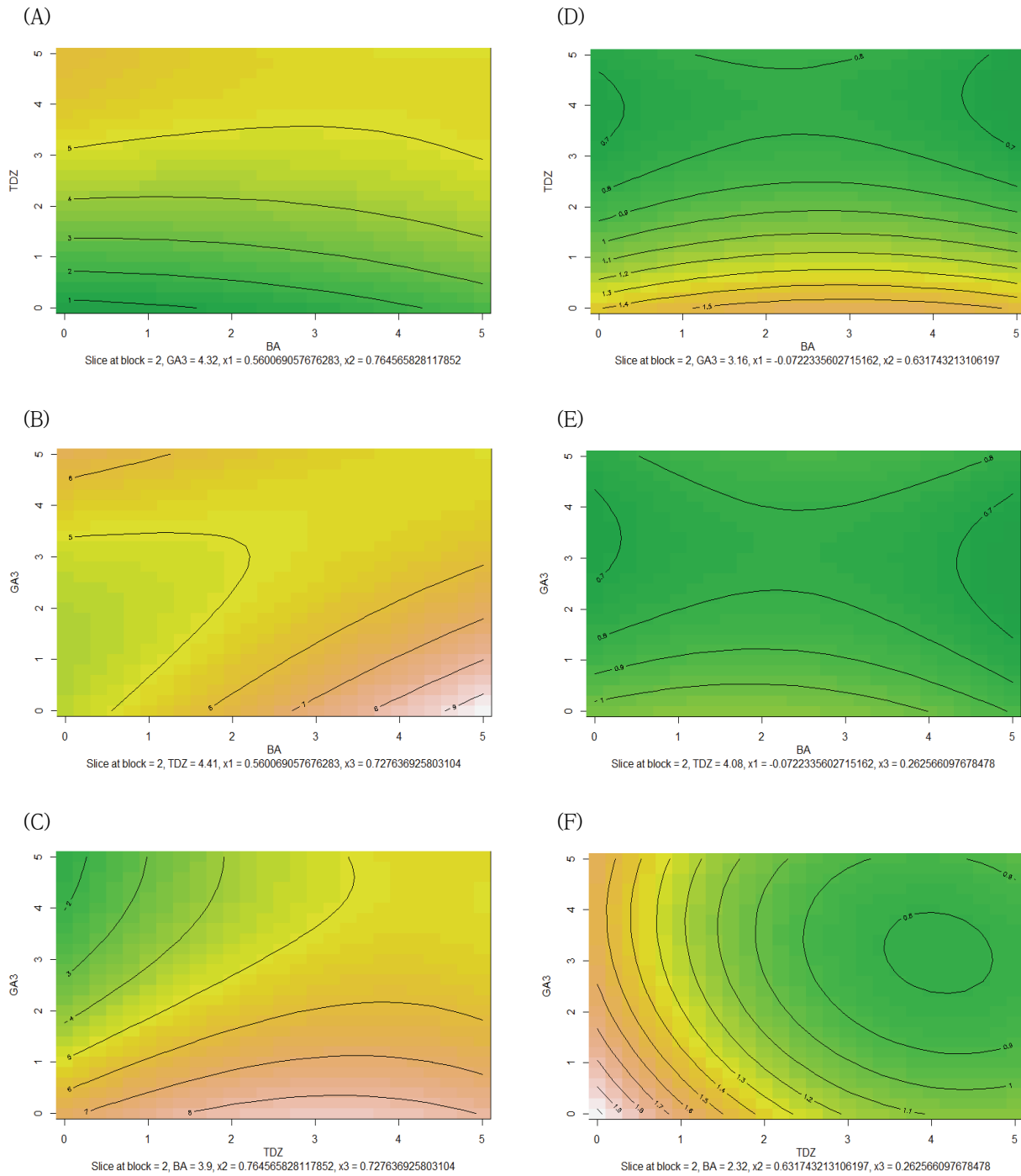


Figure 1. Contour plots of shoots number showing the interactions between BA, TDZ and GA₃.

(A) Contour plot showing the effect of BA (X_1) and TDZ (X_2) on adventitious shoots induction (Y_1 , response value) (B) Contour plot showing the effect of BA (X_1) and GA₃ (X_3) on adventitious shoots induction (Y_1 , response value) (C) Contour plot showing the effect of TDZ (X_2) and GA₃ (X_3) on adventitious shoots induction (Y_1 , response value). Contour plots of average shoots length showing the interactions between BA, TDZ and GA₃. (D) Contour plot showing the effect of BA (X_1) and TDZ (X_2) on adventitious shoots induction (Y_2 , response value) (E) Contour plot showing the effect of BA (X_1) and GA₃ (X_3) on adventitious shoots induction (Y_2 , response value) (F) Contour plot showing the effect of yeast TDZ (X_2) and GA₃ (X_3) on adventitious shoots induction (Y_2 , response value).

절편체 하나하나의 생리적인 상태가 줄기 발생이나 생장에 영향을 미치기 때문으로 생각되었다.

줄기수에 대한 2요인 독립변수 간 상호작용을 보았을 때, TDZ : BA contour plot은 능선의 형태로 TDZ와 BA 혼합처리 시 두 성장조절물질을 실험범위인 $5 \mu\text{M}$ 보다 높은 농도를 처리해야 할 것으로 나타났다. 반면 GA_3 : BA contour plot도 능선의 형태로 나타났으나, BA만 실험범위 $5 \mu\text{M}$ 보다 높은 농도를 처리해야 할 것으로 예측되었다. GA_3 : TDZ contour plot은 안부점의 형태로 나타났으며, TDZ에 비해 GA_3 가 줄기생산에 미치는 영향이 적은 것으로 예측되는 결과를 나타내었다(Figure 1, Figure 2).

줄기길이 생장에 대한 2요인 독립변수 간 상호작용을 보았을 때, TDZ : BA contour plot은 안부점의 형태로 TDZ와 비교했을 때 BA의 영향 미미하였으며, TDZ 무처리 시 줄기길이 생장에 효과적인 것으로 나타났다. GA_3 : BA contour plot도 안부점의 형태로 BA $2.5 \mu\text{M}$ 와 GA_3 $3 \mu\text{M}$ 의 기점에서 BA의 농도가 감소하고 GA_3 의 농도가 증가할수록, 실험범위 내에서 BA $2.5 \mu\text{M}$ 에서 GA_3 무처리 시 줄기길이 가장 길게 나왔다. GA_3 : TDZ contour plot은 최소점이 나와 두 성장조절물질을 혼합처리 시 줄기길이 생장에 역효과가 나타날 것으로 예측되었다(Figure 1, Figure 3). 실제 콩과 식물에서 사이토키닌과 지

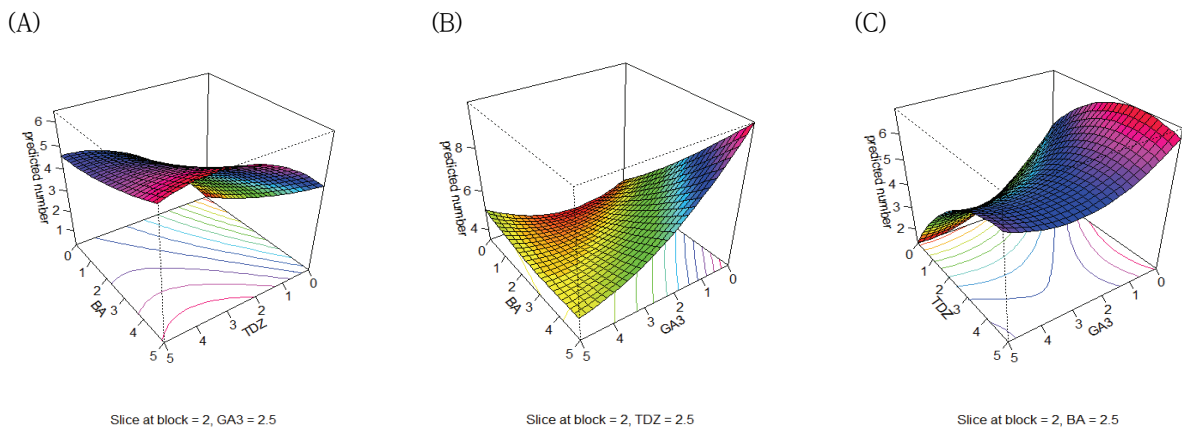


Figure 2. Three-dimensional response surface of shoots number showing the interactions between BA, TDZ and GA_3 .

- (A) Response surface plot showing the effect of BA (X_1) and TDZ (X_2) on adventitious shoots induction (Y_1 , response value)
 (B) Response surface plot showing the effect of BA (X_1) and GA_3 (X_3) on adventitious shoots induction (Y_1 , response value)
 (C) Response surface plot showing the effect of TDZ (X_2) and GA_3 (X_3) on adventitious shoots induction (Y_1 , response value).

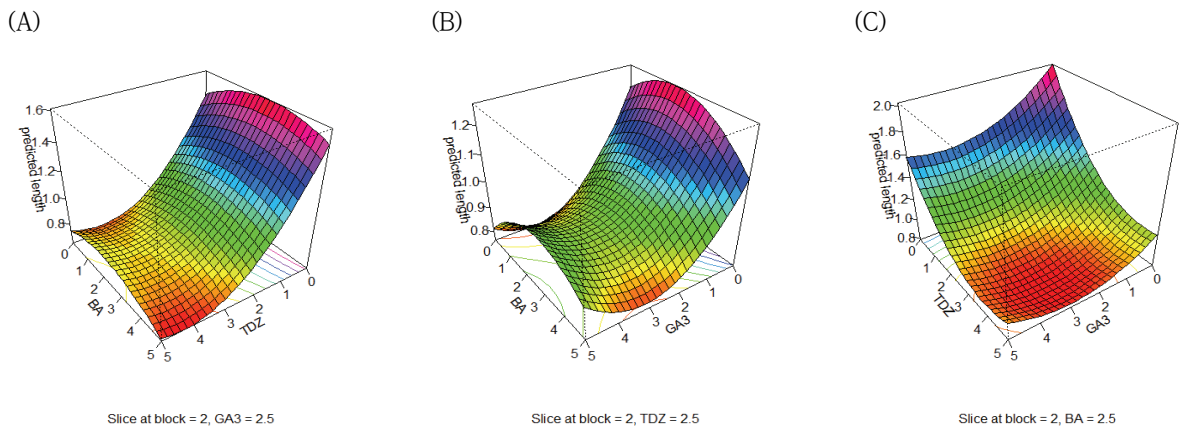


Figure 3. Three-dimensional response surface of average shoots length showing the interactions between BA, TDZ and GA_3 .

- (A) Response surface plot showing the effect of BA (X_1) and TDZ (X_2) on average shoots length (Y_2 , response value)
 (B) Response surface plot showing the effect of BA (X_1) and GA_3 (X_3) on average shoots length (Y_2 , response value)
 (C) Response surface plot showing the effect of TDZ (X_2) and GA_3 (X_3) on average shoots length (Y_2 , response value).

베렐린 계열의 식물생장조절물질을 혼합처리시 줄기신장에 부정적인 효과를 보였으며(Valio and Schwabe, 1978), 사이토키닌이 지베렐린의 효과를 억제시키는 것으로 보고되어 단독처리시 줄기신장에 효과가 있는 것으로 나타났다(Leite et al., 2003). 반면 다른 콩과 식물에서 TDZ 0.5 μ M과 GA₃ 0.5 μ M 혼합처리가 줄기생산의 최적조건인 것으로 나타났다(Ahmad et al., 2021). 다양한 수중에서 TDZ 단독처리시 1 μ M보다 낮은 농도가 줄기생산에 더 효과적이며, 높은 농도에서는 줄기길이 생장에 부정적이라는 보고가 있다(Pai and Desai, 2018). 추가실험으로 1 μ M미만의 TDZ와 GA₃를 혼합처리하여 성장조절물질의 상호작용을 파악해야 할 것으로 판단된다.

반응표면분석을 이용하면 최대점을 찾을 때 정확한 정상점 좌표로 최적조건을 예측할 수 있어 유용할 수 있으나, 본 연구에서는 3요인간 독립변수 최적조건과 정상점을 도출하지 못하였다. 다만 2요인간 상호작용은 예측 가능하며 3차원 공간에 제시함으로써 직관적으로 실험범위 외의 실험설계 방향을 제시하는데 유용할 것으로 판단된다.

3. 퍼지군집분석에 따른 배양조건 분석

퍼지 K-평균 군집 알고리즘으로 분석을 수행하여 3가지

군집으로 나눈 결과 줄기수 우수군집(clust1), 양쪽 열세군집(clust2), 줄기길이 우수군집(clust3)으로 분류되었다(Figure 4). 처리구 당 군집에 소속될 확률이 50%이상일 때, 분류된 군집에 따라 B2.5T0G2.5, B2.5T0G0, B2.5T0G5 처리구에서 63.33%, 56.67%, 50%로 많은 줄기를 생산할 수 있으며, B5T2.5G0 처리구에서 63.33%로 줄기길이 생장이 가장 우수한 것으로 나타났다. 개느삼 줄기증식과 길이생장을 동시에 얻기 위한 성장조절물질 효과를 보기 위해서는 BA가 첨가되어야 하며, BA, TDZ, GA₃를 모두 혼용처리 하였을 경우 단독처리보다 성장조절물질의 효과가 낮은 것으로 나타났다.

4가지 군집이상으로 나누어 양쪽 우수군집을 분류하려고 하였으나 줄기수와 줄기길이 간에 음(-)의 상관관계로 분류되지 못하였다. Figure 1에서 보듯 cluster1에서 B5T0G0과 B5T0G5 처리구에 속해있는 566번 개체와 617번 개체가, cluster3에서 B5T0G0 처리구에 속해있는 567번 개체와 570번 개체가 양쪽 우세한 개체로 보이나, B5T0G0 처리구는 cluster2에 60%에 소속되어 있어 우수 개체군으로 분류되지 못했다(Table 3). Lee(2020)의 연구에서는 BA 단독처리보다 TDZ와 혼합처리시 줄기생산에 더 효과적인 것으로 나타났으며, 줄기생산과 줄기길이 생

Table 3. Results of ANOVA of the central composite design.

Response: number	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Block	1	2.67	2.667	0.1700	0.6813762
First-Order (x1, x2, x3)	3	294.37	98.123	6.2552	0.0007989
Two-way Interaction (x1, x2, x3)	3	121.58	40.528	2.5836	0.0601143
Pure Quadratic (x1, x2, x3)	3	41.33	13.778	0.8783	0.4566396
Residuals	70	1098.07	15.687		
Lack of fit	17	376.74	22.161	1.6283	0.0896856
Pure error	53	721.33	13.610		
Response: length	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Block	1	1.1882	1.18815	6.0129	0.016699
First-Order (x1, x2, x3)	3	9.4330	3.14434	15.9126	5.471e-08
Two-way Interaction (x1, x2, x3)	3	0.3246	0.10820	0.5476	0.651433
Pure Quadratic (x1, x2, x3)	3	2.4919	0.83063	4.2036	0.008578
Residuals	70	13.8320	0.19760		
Lack of fit	17	3.4307	0.20180	1.0283	0.445020
Pure error	53	10.4014	0.19625		

장의 효과를 동시에 볼 수 없다고 보고하였는데 본 연구의 퍼지군집분석에서의 결과와 비교할 때 줄기생산과 길이생장의 동시효과에 대한 부분은 일치하였다. 따라서 개느삼 기내 증식할 때 줄기생산과 길이생장을 두 단계로 나누어 각 목적에 부합하는 성장조절물질과 농도를 선정하는 것이 효과적일 것으로 판단된다.

4. 통계분석의 결과 비교

하나의 최적점을 탐색하기 위한 반응표면분석 결과, ANOVA 분석 결과와 퍼지 분석 결과와도 부합하지 못하는 최적점을 도출하였다. RSM 줄기수와 줄기길이 최적점은 동질적 부분집합 h 에 속하지 않았으며, 줄기수 최적점 BA 3.90 μM + TDZ 4.41 μM + GA₃ 4.32 μM 와 인접한 B5T5G5 처리구는 cluster1에 30% 소속하고, 줄기길이 최적점 BA 2.32 μM + TDZ 4.08 μM + GA₃ 3.16 μM 와 인접한 B2.5T5G2.5 처리구는 cluster3에 0% 소속하여 최적조건을 예측하지 못하였다.

반면 퍼지 분석은 각 개체가 군집에 발현할 확률을 제시해주어 ANOVA 분석을 보완할 수 있는 통계분석법으로 적합하였다. 상위 다섯 가지 처리구에 대한 ANOVA 분석과 퍼지 분석을 비교한 결과 줄기수와 줄기길이의 다섯 가지 처리구 모두 두 통계분석 결과에 포함되는 것으로 나타났다(Table 4). 본 연구에서 판단되는 최적조건은 63.33% 확률로 11.03±1.52개의 줄기를 생산할 수 있는 B5T2.5G0 조합과 63.33% 확률로 2.18±0.21 cm의 줄기길이를 얻을 수 있는 B2.5T0G2.5 조합인 것으로 나타났다.

조직배양 분야에서 주로 사용하는 ANOVA 분석의 다차원설계는 이론적으로 가능하지만 일반적으로 일원 또는 이원분산분석법을 주로 이용하며 많은 실험 결과에 대한 통계적 검증을 위해 사용되어 왔다. 이 경우 많은 시간이 소요되며, 다양한 변수와의 상호작용을 파악하기 어려우며, 많은 비용을 초래하는 단점을 지니고 있다. 본 연구에서는 표면반응분석으로 3요인 간의 최적조건은 예측하지 못하였으나, 2요인 간의 최적조건은 시각적으로 예측이 가능하다는 것을 보여주었다. Jeong(2010)의 연구에 따르면 전통적인 반응표면분석으로는 최적점을 탐색할 수 없는 경우가 있기 때문에, 이를 보완하는 지능형분석 및 다중반응표면을 사용한 분석 방법들을 활용하는 연구도 진행되어야 할 것으로 판단된다.

퍼지 분석의 경우 발현확률을 제시해주기 때문에 추가 실험에 소요될 시간과 비용을 절감시킬 수 있는 정보를 제공하여 조직배양 분야에서 ANOVA 분석을 보완해 줄 수 있을 것으로 판단된다. Table 4에서 ANOVA와 퍼지군집 분석의 결과를 순위로 매겼을 때 1순위 결과값이 동일하게 나타났다. 줄기생산에서는 BA 5 μM 과 TDZ 2.5

μM 조합이, 줄기길이 성장에는 BA 2.5 μM 과 GA₃ 2.5 μM 조합이 개느삼 증식 최적조건인 것으로 나타났다. 줄기생산이 우수한 개체 증식에서 BA와 TDZ를 혼합 처리시 더 많은 줄기를 생산하는 경향을 보였다. 반면 줄기길이 우수 개체 증식에서는 TDZ의 효과를 보지 못하였고 GA₃보다 BA를 단독처리하거나, GA₃를 BA보다 농도를 높게 첨가해야 줄기길이 성장에 더 효과적인 것으로 나타났다. 통계분석법 결과에 따르면 개느삼의 효율적인 대량증식을 위해서는 1단계에서 BA 5 μM 과 TDZ 2.5 μM 을 혼합하여

Table 4. Probability to belong to each treatments cluster.

Treatments(μM)	Cluster1(%)	Cluster2(%)	Cluster3(%)
B0T0G0	0	76.67	23.33
B0T0G2.5	0	100	0
B0T0G5	0	90.00	10.00
B0T2.5G0	13.33	76.67	10.00
B0T2.5G2.5	13.33	83.34	3.33
B0T2.5G5	6.67	90.00	3.33
B0T5G0	20.00	73.33	6.67
B0T5G2.5	13.33	86.67	0
B0T5G5	23.33	73.34	3.33
<u>B2.5T0G0</u>	10.00	33.33	<u>56.67</u>
<u>B2.5T0G2.5</u>	0	36.67	<u>63.33</u>
<u>B2.5T0G5</u>	0	50.00	<u>50.00</u>
B2.5T2.5G0	30.00	66.67	3.33
B2.5T2.5G2.5	6.67	86.66	6.67
B2.5T2.5G5	13.33	83.34	3.33
B2.5T5G0	23.33	73.34	3.33
B2.5T5G2.5	13.33	86.67	0
B2.5T5G5	0	100	0
B5T0G0	13.33	60.00	26.67
B5T0G2.5	0	83.33	16.67
B5T0G5	0	63.33	36.67
B5T2.5G0	63.33	30.00	6.67
B5T2.5G2.5	26.67	73.33	0
B5T2.5G5	13.33	86.67	0
B5T5G0	23.33	76.67	0
B5T5G2.5	26.67	73.33	0
B5T5G5	30.00	70.00	0

^a Cluster1, Superior in shoot length; Cluster2, Inferior in shoot numbers and length; Cluster3, Superior in shoot numbers.

^b Underline, Treatments that have probability above 50% among cluster3; Bold, Treatments that have probability above 50% among cluster1.

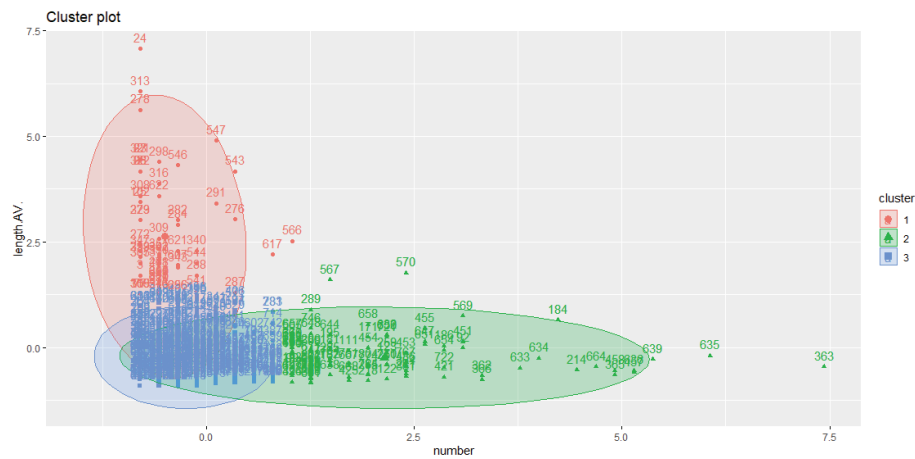


Figure 4. Fuzzy K-means cluster plot of treatments

B0T0G0(1~30), B0T0G2.5(31~60), B0T0G5(61~90), B0T2.5G0(91~120), B0T2.5G2.5(121~150), B0T2.5G5(151~180), B0T5G0(181~210), B0T5G2.5(211~240), B0T5G5(241~270), B2.5T0G0(271~300), B2.5T0G2.5(301~330), B2.5T0G5(331~360), B2.5T2.5G0(361~390), B2.5T2.5G2.5(391~420), B2.5T2.5G5(421~450), B2.5T5G0(451~480), B2.5T5G2.5(481~510), B2.5T5G5(511~540), B5T0G0(541~570), B5T0G2.5(571~600), B5T0G5(601~630), B5T2.5G0(631~660), B5T2.5G2.5(661~690), B5T2.5G5(691~720), B5T5G0(721~750), B5T5G2.5(751~780), B5T5G5(781~810)

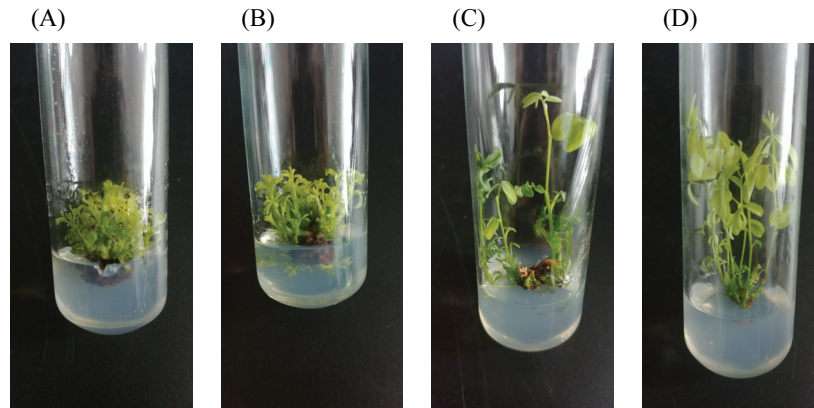


Figure 5. Comparison between treatments with TDZ(A,B) and without TDZ(C,D).

Table 5. The best five treatments for the shoot production and proliferation by three different statistic analysis methods.

Rank	Shoot number(ea)			Average shoot length(cm)		
	ANOVA	Fuzzy(%)	RSM	ANOVA	Fuzzy(%)	RSM
1	B5T2.5G0 (11.03±1.52 ^h)	B5T2.5G0 (63.33)		B2.5T0G2.5 (2.18±0.21 ^f)	B2.5T0G2.5 (63.33)	
2	B2.5T2.5G0 (7.47±1.53 ^{gh})	B5T5G5 B2.5T2.5G0 (30.00)		B2.5T0G0 (2.10±0.19 ^{ef})	B2.5T0G0 (56.67)	
3	B0T5G5 (6.47±0.67 ^{fg})	B5T5G2.5 B5T2.5G2.5 (26.67)	BA 3.90 TDZ 4.41 GA ₃ 4.32	B5T0G0 (1.71±0.19 ^{def})	B2.5T0G5 (50)	BA 2.32 TDZ 4.08 GA ₃ 3.16
4	B2.5T5G0 (6.33±1.32 ^{efg})	B5T5G0 B2.5T5G0 B0T5G5 (23.33)		B2.5T0G5 (1.69±0.13 ^{def})	B5T0G5 (36.67)	
5	B0T5G0 (5.97±0.84 ^{defg})	B0T5G0 (20.00)		B0T0G0 (1.63±0.24 ^{cde})	B5T0G0 (26.67)	

줄기생산량을 늘리고 다음 단계에서 BA 2.5 μM 과 GA₃ 2.5 μM 을 혼합하여 줄기 성장량을 늘리는 체계로 추진하는 것이 효과적일 것으로 생각하였다.

결론

본 연구는 개느삼을 세 가지 성장조절물질을 혼합 처리하여 줄기생산과 줄기길이 성장에 적합한 조건을 구명하기 위한 통계법을 찾고, 결과에 따라 줄기생산과 길이성장 모두 한번에 효과적인 최적조건을 구명하려고 하였다. 세 가지 성장조절물질을 동시에 처리할 때 두 목적을 동시에 만족하는 조건을 찾을 수 없었다. 반응표면분석은 세 성장조절물질을 동시에 처리할 시 최적의 조건을 구체적 수치로 구명해주며 시각적으로 3차원 모델모형을 제시해주나 식물체의 특성상 각 식물 개체별로 특성이 달라 반응표면분석으로 알맞은 최적점을 도출하는 데 어려운 것으로 나타났다. 반면 퍼지 군집 분석을 이용할 때 우수 개체군에 속할 확률을 표시하고 수리통계학적 근거를 제시해주어 각 식물 개체별로 군집을 분류하여 군집에 소속될 확률을 도출하여 평균값만을 비교한 ANOVA 분석에 의한 결과를 보완할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 국립산림품종관리센터의 <산림생명자원 수집·보존 및 특성평가> 위탁시험사업의 지원으로 이루어짐.

본 연구는 산림청(한국임업진흥원) 산림과학기술 연구개발사업(2019151A00-2023-0301)의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

References

- Ahmad, A., Ahmad, N., Anis, M., Alatar, A.A., Abdel-Salam, E.M., Qahtan, A.A. and Faisal, M. 2021. Gibberellic acid and thidiazuron promote micropropagation of an endangered woody tree (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using in vitro seedlings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 144(2): 449-462.
- Box, G.E.P. and Wilson, K.B. 1951. On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society* 13(1): 1-45.
- Choi, O.J., Jung, H.N., Kim, Y.D., Shim, J.H., Kwak, S.H. and Shim, K.H. 2014. Optimization of the preparation of rice snack by response surface methodology. *Korean Journal of Food Cook Science* 30(4): 454-462.
- Cheong, E.J. 2000. A study on mass propagation of *Prunus yedoensis* matsumura from Cheju using *In Vitro* culture techniques. Department of Forestry Graduate School, Kangwon National University.
- Ferraro, M.B., Giordani, P. and Serafini, A. 2019. fclust: An R package for fuzzy clustering. *The R Journal* 11(1): 198. R package version 2.1.1, URL <http://CRAN.R-project.org/package=fclust>.
- Jeong, H.C. 2010. Searching the optimal design points based on taguchi method and variance response surface method. *Journal of the Korean Data Analysis Society* 12(2): 1135-1148.
- Jung, H.Y. 2018. On the applications of fuzzy approaches in medical diagnosis and bioinformatics. *Journal of the Korean Data and Information Science Society* 29(6): 1445-1456.
- Kim, J.E. 2015. Genetic Polymorphism and *in vitro* Propagation in *Echinosophora koreensis* NAKAI. Department of Forest Environment System Graduate School, Kangwon National University.
- Lee, H. 2020. Micropropagation of *Echinosophora koreensis* through *in vitro* culture. Department of forest resources Graduate School, Kangwon National University.
- Lee, H.S., Yi, J.S. and An, C.H. 2014. Adventitious shoots induction and regeneration from the stem explants of *Echinosophora koreensis* Nakai. *Journal of Agricultural, Life and Environmental Sciences* 26(2): 36-41.
- Lee, W.T. 1982. The rare plant-resource of Kangwon-do. Kangwon Branch of the Korean Association for Conservation of Nature, Chuncheon (in Korea).
- Leite, V.M., Rosolem, C.A. and Rodrigues, J.D. 2003. Gibberellin and cytokinin effects on soybean growth. *Scientia Agricola* 60(3): 537-541.
- Lenth, R.V. 2009. Response-Surface methods in R, using rsm. *Journal of Statistical Software* 32(7): 1-17. R package version 2.10.2, URL <http://CRAN.R-project.org/package=rsm>.
- Moon, H.K. and Kim, Y.W. 2008. *In vitro* propagation of a rare and endangered species, *Sophora koreensis* Nakai, by axillary bud culture. *Journal of Plant Biotechnology* 35(3): 229-234.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-479.
- Pai, S.R. and Desai, N.S. 2018. Effect of TDZ on various plant cultures. pp. 439-454. Ahmad, A. and Faisal, M. In *Thidiazuron: From urea derivative to plant growth regulator*. Springer, Singapore.
- Park, S.H. and Kim, J.U. 2018. *Modern Design of Experiments using MINITAB Volume 3*. Minyoungsa.

- Valio, I.F.M. and Schwabe, W.W. 1978. Correlative growth in seedling of *Phaseolus vulgaris* L.: Inhibition of stem growth by the primary leaves. *Annals of Botany* 42(2): 263-268.
- Yang, H.J., Park, C.S., Yang, H.Y., Jeong, S.J., Jeong, S.Y., Jeong, D.Y., Kang, D.O., Moon, J.Y. and Choi, N.S. 2015. Optimization of a medium for the production of cellulase by *Bacillus subtilis* NC1 using response surface methodology. *Journal of Life Science* 25(6): 680-685.
- Yoon, S.J., Shin, W.S., Chun, G.T. and Jeong, Y.S. 2007. Optimization of production medium by response surface method and development of fermentation condition for *Monascus pilosus* culture. *Korean Journal of Biochemical Bioengineering* 22(5): 288-296.

Manuscript Received : January 6, 2021

First Revision : February 8, 2021

Accepted : February 15, 2021