

삼투압 처리에 의한 인삼자엽으로부터 체세포 단일배의 유도

경희대학교 한방재료가공학과, 바이오피아 생명공학연구소¹

김유진, 심주선, 인준교¹, 이범수¹, 양덕춘

Induction of Singlet Embryos from Ginseng Cotyledon by Plasmolysis

Dept. of Oriental Medicinal Material and Processing, Kyung Hee University, Yongin Institute of Biotechnology, Biopia. CO., Ltd

Yu-Jin Kim, Ju-Sun Shim, Jun-Gyo In, Bum-Soo Lee, and Deok-Chun Yang*

실험목적

인삼은 재배조건이 매우 까다롭고, 보통 4년생에서 1회 종자를 채취하기 때문에 기내 배양을 통한 단기간의 식물체 재생기술은 큰 의미를 지닌다. 보통 MS hormone-free 배지에서는 자엽절편체 기부에 embryo가 직접적으로 소량 형성된다. 또한 삼투압 처리를 할 경우 자엽절편체의 전체 표면에서 single embryo형성이 다량 형성된다고 보고한 바 있다. 따라서 더욱 효율적인 체세포 단일배를 유도하기 위하여 sucrose 및 mannitol을 농도별, 시간별 침지하여 삼투압 처리를 한 후 배지에 치상하여 embryo 형성 형태 및 분포를 살펴보고자 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

○ 실험재료

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer) immature seed를 3개월간 dehscence과정을 거쳐 개갑을 유도시킨 후, 4°C냉장고에서 성숙시켰다. matured seed의 종피 제거후에, EtOH 70%, NaOCl 2%에 15분 표면 살균과정을 거친 후에 멸균수로 3~4회 수세하였다. 멸균된 성숙접합자배를 적출한 다음 MS HF배지에서 배양하였다.

○ 실험방법

- 배의 적출 후배양 처리 : MS 기본 배지에 적출한 embryo를 1일, 2일, 3일, 4일, 5일간 각각 생장시킨 후 자엽절편체를 얻어 MS 기본배지와 1 mg/L 2,4-D, 0.1mg/L kinetin 첨가한 MS 배지에서 배양하였다.
- Sucrose 삼투압 처리 : 자엽절편체를 sucrose 0.1 M, 0.5 M, 1 M에 8시간, 24시간 각각 침지한 후, MS 기본배지, 0.1mg/L 2,4-D 첨가 MS배지, 1mg/L 2,4-D첨가 MS배지에서 배양하였다.
- Sucrose 고농도 배지 처리 : 자엽절편체를 sucrose 3%, 5%, 7% 첨가한 MS배지, 0.1mg/L 2,4-D 첨가 MS배지, 1mg/L 2,4-D 첨가 MS배지에서 각각 배양하였다.
- Mannitol 삼투압 처리 : 자엽절편체를 mannitol 0.1 M, 0.5 M, 1 M에 8시간, 24시간 각각 침지한 후, MS 기본배지, 0.1mg/L 2,4-D 첨가 MS배지, 1mg/L 2,4-D 첨가 MS배지에서 배양하였다.

결과 및 고찰

인삼의 embryo로부터 체세포배 형성을 유도하기 위해서 미성숙배를 후숙처리한 후 배를 적출하여 실험에 사용하였다. 적출한 embryo를 호르몬 무첨가배지와 2,4-D와 kinetin을 처리한 배지에 치상한 후 2달간 배양한 결과 인삼 연풍의 embryo에서는 모두 1일 후 배양한 절편체에서 80% (15절편체 중 12개의 자엽절편체에서 embryo 발생)의 embryo 발생율을 보였다(Fig. 1). 인삼 천풍에서는 각각 호르몬 무첨가 배지에서는 1일 배양한 절편에서 46%, 호르몬 첨가 배지에서는 2일 배양 절편에서 60%의 embryo 발생율을 보였다. 배발생율을 향상시키기 위해서 적출한 배의 자엽절편체를 고농도의 sucrose로 처리한 후 embryo 발생율을 조사하였다. 그 결과 가장 많이 embryo 발생을 보인 것은 sucrose 0.5 M에 8시간동안 침지한 후 MS 기본배지에 치상한 경우로서, singlet embryo가 20%발생하였다 (Fig. 2).

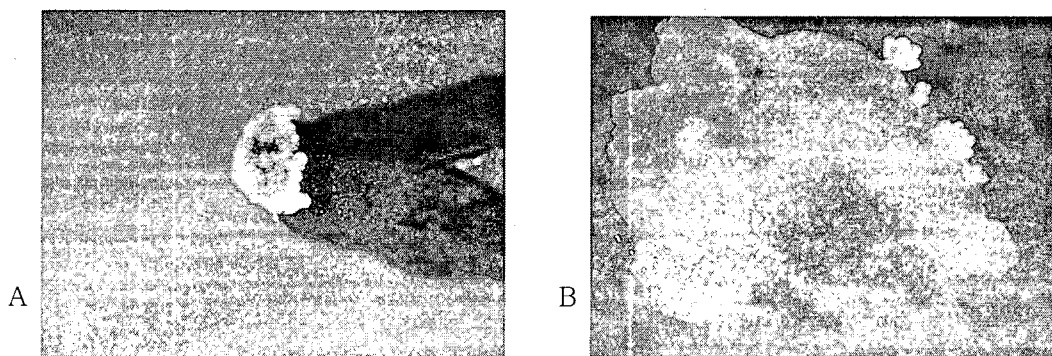


Fig. 1. Embryo formation from ginseng cotyledon. A. Singlet embryo after 2 months on the hormone free MS medium, B. Multiple embryos after 2 months on the MS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L kinetin.

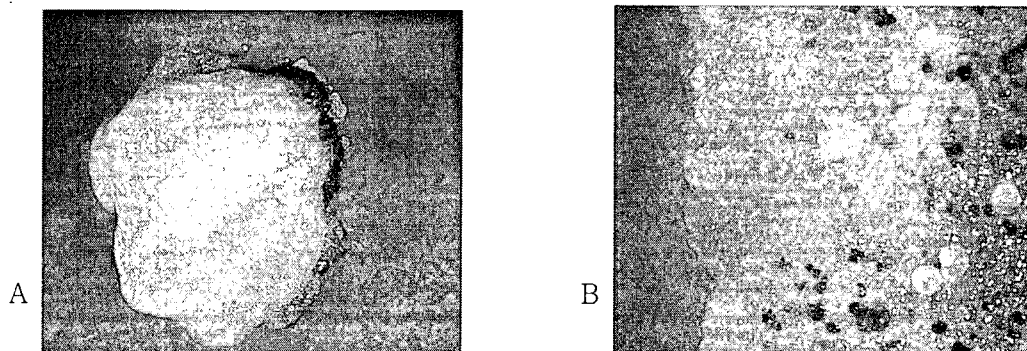


Fig. 2. Singlet Embryo formation from ginseng cotyledon. A. Singlet embryo after 1 months on the hormone free MS medium treated plasmolysis with 0.5M 8h sucrose, B. Singlet embryo after 1 months on the MS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D treated plasmolysis with 1M 8h sucrose

배양배지에 sucrose 농도를 농도별로 처리하여 배발생율을 조사하였다. 그 결과 연풍의 경우 7% sucrose를 첨가한 MS 기본배지와 호르몬 무첨가 배지 모두에서 embryo형성을 가장 많이 보였다. 특징적인 것은 호르몬 무첨가 배지에서는 singlet embryo가 관찰되었고, 호르몬 첨가배지에서는 multiple embryo가 형성되었다. Mannitol 처리에 따른 embryo 발생율을 조사한 결과 0.1 M과 0.5 M 농도에 8시간 침지한 후 치상한 경우에는 multiple embryo형성을 보였으나, 0.1 M, 0.5 M에 24시간 침지한 경우에는 singlet embryo형성을 관찰 할 수 있었다.