

## 人蔘(*Panax ginseng* C. A. Meyer)의 成熟한 胚로부터 體細胞 胚發生을 통한 再分化 및 幼植物體의 開花

李幸順<sup>1,2</sup> · 李光雄<sup>2</sup> · 梁承均<sup>1</sup> · 田在興<sup>1</sup> · 劉長烈<sup>1</sup>

(1. 韓國科學技術院 遺傳工學센터 植物細胞生物學研究室, 2. 서울大學校 自然科學大學 植物學科)

## Plant Regeneration through Somatic Embryogenesis from Mature Zygotic Embryos of Ginseng(*Panax ginseng* C. A. Meyer) and Flowering of Plantlets

Lee, Haeng Soon<sup>1,2</sup>, Kwang-Woong Lee<sup>2</sup>, Seung Gyun Yang<sup>1</sup>,  
Jae Heung Jeon<sup>1</sup> and Jang Ryol Liu<sup>1</sup>

(1. Plant Cell Biology Laboratory, Genetic Engineering Center, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Seoul, 2. Department of Botany, Seoul National University, Seoul)

### ABSTRACT

Mature zygotic embryos dissected from ginseng(*Panax ginseng* C. A. Meyer) seeds were cultured on Murashige and Skoog's (MS) medium containing various concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D) and kinetin. Somatic embryos were induced directly from cotyledonary tissue or from intervening callus. The induction frequency of somatic embryos was up to 55%. Upon transfer to half-strength MS medium supplemented with 1 mg/l 6-benzyladenine(BA) and 1 mg/l GA<sub>3</sub>, most somatic embryos developed into plantlets. Over 50% of the plantlets flowered after 4 weeks of culture and then a few bore immature fruits *in vitro*. Therefore, it is suggested that the juvenility of the ginseng tissue which give rise to somatic embryos does not interfere with *in vitro* flowering of their regenerated plantlets.

### 緒 論

體細胞는 接合體胚發生(zygotic embryogenesis)과 유사한 과정을 거쳐 胚로 발달할 수 있는데 이 體細胞胚發生(somatic embryogenesis)은 발달 과정의 초기 단계부터 細胞가 뿌리와 줄기로 분화될 兩極性(bipolarity)을 갖는 것이 單極性을 나타내는 器官發生(organogenesis)과 구별되는 중요한 특징 중의 하나이다(Strech and Withers, 1974). 당근에서 처음 體細胞胚發生이 관찰된 이래(Steward *et al.*, 1958; Reinert, 1958), 광범위한 종류의 식물에서 동일 현상이 보고되고 있다(Ammirato, 1983).

人蔘에서의 體細胞胚發生은 Butenko등(1968)에 의하여 처음 보고되었으나 이들은 體細胞胚를 식물체로 발달시키지는 못하였다. Harn과 Lee(1974)는 生長調節劑를 첨가하지 않은 배지

에서 배양한 子葉으로부터 캘러스와 葉狀體가 유도된다고 보고 하였는데, 그 후 이것은 葉狀體가 아니라 體細胞胚라고 정정하였다(李와의 個人通信). Chang과 Hsing(1980a)은 뿌리로부터 유도된 캘러스에서 발달한 體細胞胚를 BA와 GA<sub>3</sub>를 첨가한 배지에서 배양하여 幼植物體를 얻었다. 그 후 이들은 이 幼植物體에서 花芽가 形成되는 것을 관찰하였다(Chang and Hsing, 1980b).

일반적으로 人蔘은 圃場에서 2年(수확된 종자로부터 3년)이 경과하여야 花芽形成이 가능하므로 幼植物體가 花芽를 形成할 수 있었다는 것은 開花生理學的 觀點에서 큰 흥미를 불러 일으켰다(Bernier *et al.*, 1981; Scorza, 1982; Zimmermann *et al.*, 1985). 따라서 Chang과 Hsing(1980b)의 體細胞胚로부터 발달한 幼植物體에서 花芽가 形成된 것은 體細胞胚가 6年生의 成形期(adult phase)에 있는 뿌리로부터 유도된 캘러스에서 발달하였기 때문일 수 있다는 추론을 받게 하였으며, 幼形期에 있는 뿌리로부터 유도된 幼植物體에서도 花芽形成이 가능한 지 여부에 대한 의문이 제기되었다(Scorza, 1982).

본 研究에서는 이러한 의문을 해결하고자 成熟한 胚(接合體胚)의 組織과 같은 幼形期の 극히 初期에 있는 組織으로부터 유도된 體細胞胚에서 幼植物體를 再分化시켜 이 幼植物體도 花芽形成이 가능한지의 여부를 밝히려고 하였다.

## 材料 및 方法

**植物材料** 人蔘(*Panax ginseng* C. A. Meyer)의 개갑된 종자를 전매청 人蔘課에서 분양받아 4°C의 암소에 보관하면서 실험에 사용하였다.

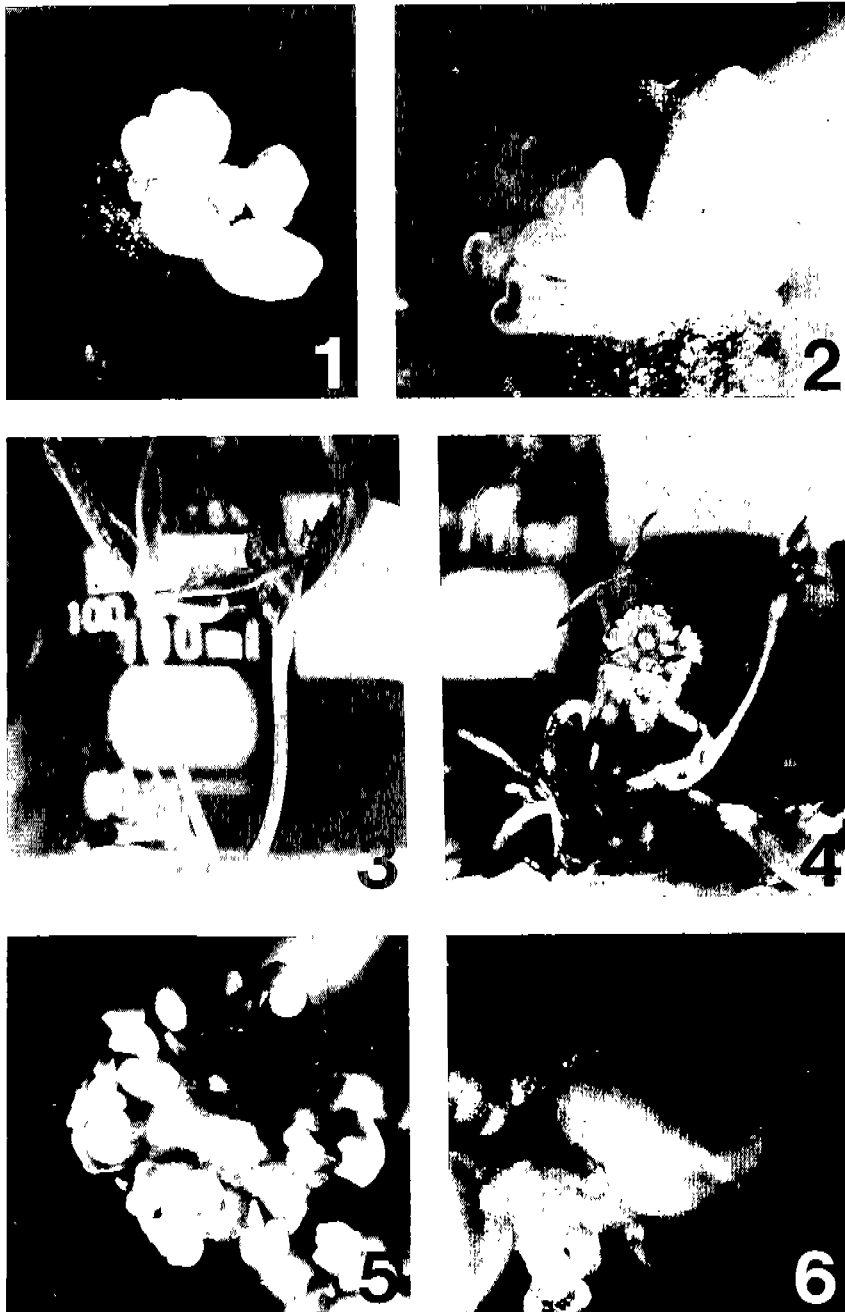
**培地** 기본배지는 MS 무기염(Murashige and Skoog, 1962)에 100 mg/l의 myo-inositol, 0.4 mg/l의 thiamine · HCl과 30 g/l의 sucrose를 첨가한 것을 사용하였다. 증류수로 3회 세척한 0.8%의 Bacto Agar(Difco)를 첨가한 뒤 0.1 N의 NaOH로 배지의 pH를 5.8로 맞춘 다음 121°C에서 15분 동안 멸균하여 87x15 mm plastic Petri dish에 25 ml씩 부어 굳혀서 사용하였다.

**體細胞胚 誘導** 種子의 種皮를 벗긴 뒤 70% 에탄올에 5분 간, 4% Clorox로 20분 동안 표면 살균을 한 다음 멸균 증류수로 3회 세척한 후 胚를 無菌조작으로 꺼냈다. 이것을 0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/l의 2,4-D와 0, 0.01, 0.1, 1 mg/l의 kinetin을 조합하여 첨가한 배지 위에 놓았다. Petri dish 당 5개씩 치상하였으며 처리구 당 10개의 Petri dish를 사용 반복하였다. 이것을 Parafilm으로 밀봉시킨 후 25°C의 暗所에서 배양하면서 주기적으로 體細胞胚 發生 여부를 해부현미경으로 관찰하였다. 體細胞胚의 發生頻度は 10주 경과 후에 조사하였다.

**幼植物體 再분화와 花芽誘導** 上記의 배지에서 유도된 體細胞胚를 무기염의 농도를 절반으로 줄인 MS 기본 배지(1/2MS)에 1 mg/l의 BA와 1 mg/l의 GA<sub>3</sub>를 첨가한 배지로 옮겨(Chang and Hsing, 1980b) 25°C, 1,000 lux의 cool-white fluorescent lamp로 照射하면서 16:8 h의 光週期 조건에서 배양하였다.

## 結果 및 考察

成熟한 胚를 2,4-D와 kinetin이 첨가된 배지에서 배양한 결과 4주 후부터 캘러스와 함께 體



**Figs. 1-6.** Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of ginseng. 1. Globular to torpedo-shaped somatic embryos derived from cotyledonary tissue of zygotic embryos. 2. Multi-cotyledonary somatic embryos. 3. A plantlet converted from a somatic embryo. 4. A flowered plantlet. 5. Flowers with well-developed anthers. 6. An immature fruit.

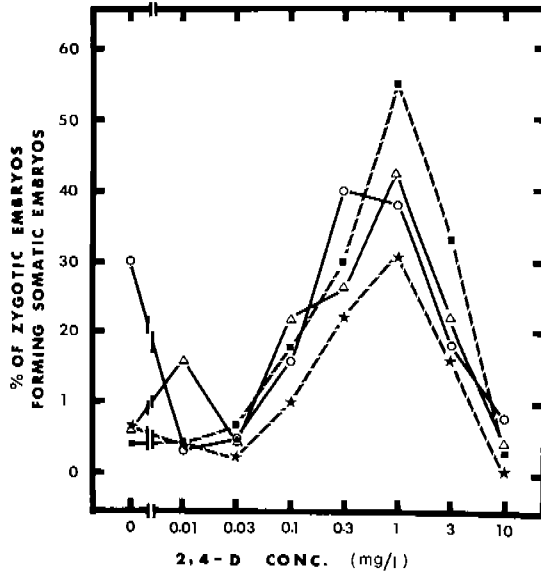


Fig. 7. Effects of 2,4-D and kinetin concentrations in culture medium on the formation of somatic embryos from zygotic embryos. Concentrations of the kinetin: 0 mg/l(○-○), 0.01 mg/l(■-■), 0.1 mg/l(△-△), and 1 mg/l(★-★). Data were collected after 10 weeks of culture.

細胞胚가 子葉의 양쪽 가장자리 부위에서 먼저 誘導되었으며 시간의 경과에 따라 子葉의 전 표면과 下胚軸뿐만 아니라 幼根 부위에서도 유도되는 것이 관찰되었다. 體細胞胚는 球狀胚(globular embryo), 心臟型胚(heart-shaped embryo) 및 魚雷型胚(torpedo-shaped embryo) 등, 여러 단계의 것들이 혼재하여 있었다(Fig. 1). 6年生의 뿌리로부터 유도된 캘러스에서 발달된 體細胞胚(Chang and Hsing, 1980a)와 마찬가지로 成熟한 胚로부터 유도된 體細胞胚에서도 여러개의 子葉이 발달하는 경우가 적지 않았다(Fig. 2).

體細胞胚의 발생빈도는 처리한 2,4-D와 kinetin의 조합에 의하여 다양하게 나타났는데, 1 mg/l의 2,4-D와 0.01 mg/l kinetin을 조합한 배지에서 55%로 가장 높았다(Fig. 7). 2,4-D 농도가 증가함에 따라 體細胞胚의 발생빈도는 증가하여 1 mg/l에서 최고에 이르렀고 그 이상의 농도에서는 점차 감소하여 10 mg/l가 되면 10% 미만으로 되었다. 반면에 kinetin은 0.01 mg/l가 최적이었으며 그 이상의 농도에서는 오히려 감소하였다. 다만 生長調節劑를 전혀 첨가하지 않았을 때 體細胞胚가 30% 정도 형성되었는데 이는 Harn과 Lee(1974)가 관찰한 葉狀體에 대한 보고와 대체로 동일하였다. 이때 體細胞胚는 캘러스 형성없이 成熟한 胚의 포피층으로부터 직접 유도되거나 또는 캘러스가 먼저 형성된 후 이 캘러스로부터 발달하였다(data 제시되지 않음).

이렇게 형성된 體細胞胚를 1 mg/l의 BA와 1 mg/l의 GA<sub>3</sub>를 첨가한 1/2 MS 배지에 옮겨서 배양한 지 8주 이내에 90%가 幼植物體로 자랐으며(Fig. 3), 그로부터 4주 지난 후 50% 이상의 幼植物體가 花芽를 形成하였다(Fig. 4). 대부분의 幼植物體는 1개의 上胚軸이 발달하는 實生과는 달리 體細胞胚 당 2개 이상의 줄기가 발달하였다. 花芽는 花梗이 뺏어나와 그 끝에 3-15개 정도가 맺혔으며 각각의 직경은 2 mm 정도로 圃場에서 자라는 人蔘의 花芽보다 대단히 작았

고 꽃잎은 5개로 연한 황색이었으며 開花되었을 때 잘 발달된 葯이 관찰되었다(Fig. 5). 數週 후 開花된 꽃의 자방 중 일부는 직경이 5 mm 정도이고 말단 부위가 적색이며 그 밖의 부위는 연한 황색인 未熟한 열매로 발달하였으나(Fig. 6), 성숙한 단계로까지는 자라지 못하였다. 그런데 Chang과 Hsing(1980b)은 器內에서 발달한 꽃의 90%의 花粉은 雌性이 있음을 염색법에 의하여 증명하였으나 꽃으로부터 열매가 발달하는 지의 여부는 밝히지 않았다. 또한 暗所에서 體細胞胚를 배양하였을 때에도 花芽形成이 가능하였던 것으로 보아 人蔘의 器內 花芽形成에 있어서 빛은 필수적인 요인이 아님을 알 수 있었다.

결국 成熟한 胚의 組織과 같은 幼形期の 극히 初期에 있는 組織으로부터 유도된 體細胞胚에서 발달한 幼植物體에서도 花芽形成이 이루어졌다는 사실은 Chang과 Hsing(1980b)의 體細胞胚로부터 발달한 幼植物體에서 花芽가 形成된 것이 體細胞胚가 6年生の 成形期에 있는 뿌리로부터 유도된 캘러스에서 발달하였기 때문이 아니었다는 것을 시사한다. 그러나 일단 生長調節劑에 의하여 花芽形成이 가능하였던 幼植物體가 외부로부터의 生長調節劑의 처리없이 계속해서 花芽形成이 가능한 지의 여부를 Chang과 Hsing(1980b)이나 본 연구에서 밝히지는 못하였다. 만일 계속해서 花芽形成이 가능하다면 人蔘의 幼植物體는 生長調節劑에 의하여 成形期の 轉移가 일어난다고 할 것이며, 가능하지 않다면 生長調節劑에 의한 幼植物體의 花芽形成은 단순한 藥理學的 效果(pharmacological effect)라 할 것이다(Zimmermann *et al.*, 1985).

한편 幼植物體로부터 未熟한 열매가 맺혔다는 것은 器內에서 自家受粉이 일어났음을 반영한 것으로서 子房注射法에 의한 受粉(intraovarian pollination)이나 일반적인 器內受粉(*in vitro* pollination)에 의한 他家受粉의 가능성을 시사한다(Zenkler, 1980). 圃場에서의 幼形期가 수 년씩 되어 기존 育種法에 의하여 人蔘의 품종이 개량된 바가 없는 現 상황에 비추어 볼 때 본 연구 결과는 실용적인 의미를 가질 수 있을 것이다.

## 摘 要

人蔘의 成熟한 胚를 MS 배지에 2,4-D와 kinetin을 첨가하여 배양하였다. 子葉 부위로부터 體細胞胚가 직접 혹은 캘러스를 통하여 誘導되었으며 그 빈도는 55%에 달하였다. 이들 體細胞胚를 1/2 MS+BA 1 mg/l+GA<sub>3</sub> 1 mg/l의 배지로 옮겨주었을 때 대부분의 體細胞胚가 幼植物體로 발달하였다. 이 幼植物體 중 50% 이상이 배양 4주 경과 후 開花하였으며 그중 일부는 器內에서 未熟한 열매를 맺었다. 따라서 體細胞胚가 유래된 人蔘 組織의 幼形性(juvenility)은 體細胞胚로부터 발달한 幼植物體의 器內 花芽形成을 제한하지 않는다고 할 수 있다.

## 謝 辭

본 논문은 과학기술처 특성연구개발과제의 연구결과(N118(5)-2545-5와 BSN7009-20-4)이다. 이 원고에 대하여 훌륭한 논평과 수정을 가하여 준 洪周傘, 鄭革, 吳勁, 鄭賢淑, 鄭相浩 博士와 타이핑을 해준 趙鍾淑 嬢에게 감사한다.

## 參 考 文 獻

Ammirato, P. 1983. Embryogenesis. In, Handbook of Plant Cell Culture, D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V.

- Ammirato and Y. Yamada(eds.). Vol. 1, Macmillan Publishing Co. New York. pp. 82-183.
- Bernier, G., J.M. Kinet and R.M. Sachs. 1981. The Physiology of Flowering. Vol. 1, CRS Press, Boca Raton. p.118.
- Butenko, R., I.V. Brushwitzky and L.I. Slepyan. 1968. Organogenesis and somatic embryogenesis in the tissue culture of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Bot. Zh.* **7** : 906-911.
- Chang, W.C. and Y.I. Hsing. 1980a. Plant regeneration through somatic embryogenesis in root-derived callus of ginseng(*Panax ginseng* C. A. Meyer). *Theor. Appl. Genet.* **57** : 133-135.
- Chang, W.C. and Y.I. Hsing. 1980b. *In vitro* flowering of embryos derived from mature root callus of ginseng(*Panax ginseng*). *Nature* **284** : 341-342.
- Harn, C. and Y.I. Lee. 1974. Studies on the cotyledon culture of *Panax ginseng*. *Korean J. Bot.* **17** : 171-174.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15** : 473-497.
- Reinert, J. 1958. Untersuchungen über die Morphogenese an Gewebekulturen. *Ber. dt. Bot Ges.* **71** : 15.
- Scorza, R. 1982. *In vitro* flowering. *Horticultural Reviews* **4** : 106-127.
- Street, H.E. and L.A. Withers. 1974. The anatomy of embryogenesis in culture. Tissue Culture and Plant Science. In, H.E. Street(ed.) Academic Press, London. pp. **71** : -199.
- Steward, F.C., M.O. Mapes and K. Mears. 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from free suspended cells. *Amer J. Bot.* **45** : 705-708.
- Zenktelec, M. 1980. Intraovarian and *in vitro* pollination, In, International Review of Cytology, J.F. Danielli and K.W. Jeon(eds.). Suppl. 11B, Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture, I.K. Vasil(ed.). Academic Press, New York. pp. 137-156.
- Zimmermann, R.H., W.P. Hackett and R.H. Pharis. 1985. Hormonal aspects of phase change and precocious flowering. In, Hormonal Regulation of Development III: Role of Environmental Factors. R.P. Pharis and D.M. Reid(eds.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 79-115.

(1989. 6. 3 接受)