

## 인삼의 기내 개화 결정시기의 측정

이행순 · 이광웅<sup>1</sup> · 유장렬\*

한국과학기술연구원 유전공학연구소 생물자원연구그룹, <sup>1</sup>서울대학교 자연과학대학 생물학과

### Measurement of Determination Time of In-Vitro Flowering in Ginseng (*Panax ginseng*)

Haeng S. LEE, Kwang W. LEE<sup>1</sup>, and Jang R. LIU\*

Bioresources Research Group, Genetic Engineering Research Institute, KIST, P.O. Box 115, Taedok Science Town, Taejeon, 305-606; and <sup>1</sup>Department of Biology, Seoul National University, Seoul, 151-742. \*Corresponding author.

To measure the time required for ginseng explants to become determined to form flower buds, we cultured zygotic embryos, seedlings, and cotyledonary nodes on MS medium supplemented with BA and GA<sub>3</sub> of 5  $\mu$ M each (flower inducing medium, FIM) for various periods and transferred to the basal medium. The explants required a minimum of 10 days on FIM to be determined. Histological observations revealed that the axillary meristem to be fated to develop into flower bud remained in a state of shoot meristem during the first 10 days of culture and differentiated into flower bud after 15 days of culture. We suggest that the in-vitro flowering system described in this study is useful in investigating (a) regulatory element(s) to cause the phase change from the vegetative to reproductive state by comparing predetermined explants with determined ones at the molecular level.

**Key words:** flower bud, flower inducing medium, morphogenesis

기내 개화 시스템을 이용하면 환경요인, 영양분, 성장조절제 등의 조건을 목적에 따라 용이하게 달리할 수 있을 뿐만 아니라, 식물체의 일부분을 적출하여 배양함으로써 개화에 있어서 식물체의 기관간의 상호영향(correlative influence)을 최소화 할 수 있다 (Scorza, 1982). Christianson과 Warnick(1988)은 *Convolvulus arvensis*의 잎절편에서 기관형성의 결정(determination) 시기를 밝히는 실험을 하였다. 즉, shoot 유도 배지(shoot inducing medium: SIM)에서는 shoot만이, 뿌리유도 배지(root inducing medium: RIM)에서는 뿌리만이, 그리고 캘러스유도 배지(callus inducing medium: CIM)에서는 캘러스만이 유도되며, 이것들은 배양기간이 어느 정도 경과되면 기본배지 혹은 심지어 다른 SIM, RIM, CIM로 옮겨주어도 옮겨 주기전 SIM에서 배양하였던 것에서는 shoot가, RIM에서는 뿌리가, 그리고 CIM에서는 캘러스가 형성됨을 보고하였다. 이는 배양 기간 동안에 특정 기관으로 분화되도록 이미 비가역적으로(irreversible) 결정(determination)되었음을 의미한다. 기관발생, 체세포배발생, 또는 개화 등의 형태발생의 결정시기를 알 수 있다면 결정 전후의 생화학적 변화를 알아볼 수 있을 것이다. 또한 기내

개화는 영양생장에서 생식생장으로의 변화를 추적 가능하게 하므로 포장에서 연구할 수 없었던 발생학적 분화를 연구하는 시스템을 제공해 주는 중요한 이점이 있다.

인삼의 조직배양에 관한 연구는 체세포배발생에 의한 식물체 재분화, 기내 개화 등이 주로 이루어져왔다. 접합자배(Lee et al., 1990)와 유식물체(Lee et al., 1991)의 절편과 체세포배 유래 원형질체(Arya et al., 1991)에서 체세포배발생에 의한 식물체재분화와 기내 개화가 보고된 바 있다. 특히 인삼의 기내 개화는 포장에서의 3년이라는 유형기를 극복할 수 있는 한 예가 된다(Chang and Hsing, 1980; Lee et al., 1990, 1991). 본 연구에서 우리는 인삼의 개화에 있어서도 이러한 결정 시점이 있을 것으로 보고 기내 개화를 유도하였던 시스템(Lee et al., 1991)을 이용하여 인삼의 접합자배, 접합자배로부터 받아낸 유식물체, 자엽마디 절편(cotyledonary node explant)을 배양함으로써 개화를 유도하고 개화가 결정되는데 소요되는 시간을 밝혀보고자 하였다.

재료 및 방법

4°C의 암소에 저장된 개갑된 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer) 종자의 외피를 벗기고 70% 에탄올로 5분, 그리고 10% 상업용 표백제(희석전 NaOCl 함유량 4% 이상)로 20 분 동안 표면 살균한 다음, 멸균 증류수로 3회 세척한 후 배를 꺼낸 다음 접합자배, 접합자배를 발아시킨 유식물체, 유식물체의 자엽마디 절편을 식물체재료로 이용하였다(Lee et al., 1991). 유식물체를 재료로 하고자 할 때에는 접합자배를 White(1943)의 무기염에 100 mg/L myo-inositol, 0.4 mg/L thiamine · HCl, 20 g/L sucrose를 첨가한 배지에 치상한 후 25°C의 암소에서 1주일 동안 발아하여 자란 것을 사용하였다. 또한 자엽마디 절편은 유식물체의 자엽과 상·하배축을 제거한 길이 2-3 mm의 것을 각각 사용하였다. 개화를 위한 배지는 Murashige와 Skoog(1962)의 조성 중 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>와 KNO<sub>3</sub>의 농도를 각각 1/2배로 희석한 무기염에 100 mg/L myo-inositol, 0.4 mg/L thiamine · HCl, 30 g/L sucrose를 첨가한 기본배지에 BA와 GA<sub>3</sub>를 각각 5 μM 첨가하였다(유도 배지). 모든 배지는 4 g/L의 Phytigel (Sigma)로 고형화하였으며, pH는 121°C에서 15분간 멸균하기 전에 5.8로 조정하였다. 모든 배지는 페트리디쉬(87 × 15 mm)와 100 mL Erlenmeyer 플라스크에 각각 25 mL과 50 mL씩 분주하여 넣었으며 재료는 플라스크 당 5개씩 치상하였고, 처리 당 10반복으로 하였으며 광주기 (약 1,000 lx, cool-white 형광램프, 16(명): 8(암))로 25°C에서 배양하였다.

개화가 이루어지는 결정시기를 조사하기 위하여 첨가된 화아유도 배지에 접합자배, 유식물체 및 자엽마디 절편을 치상 후 0, 3, 5, 7, 10일, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주 경과하였을 때 각각 이들 절편을 기본배지로 옮겨 총 배양 기간이 70일이 된 시점에서 개화 빈도를 조사하였다. 개화의 빈도는 전체 재료 중에서 해부현미경으로 관찰하여 개화가 이루어진 것의 백분율로 표시하였다.

화아유도의 조직학적 관찰을 위하여 화아유도 배지에서 0, 5, 7, 10, 15일 동안 각각 배양된 자엽마디 절편을 FAA (formalin: acetic acid: ethyl alcohol)용액에 고정된 후

tertiary butyl alcohol 시리즈로 탈수하여 paraffin에 매몰하였다. 이를 microtome으로 8 μm 두께의 조직절편으로 자른 후 Delafield's hematoxylin으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 화아발생의 형태학적 관찰을 위해서는 여러 발달 단계의 재료를 취하여 2.5% glutaraldehyde 용액에 4°C에서 4 시간 동안 고정된 후 에탄올과 아세톤 시리즈를 거쳐 탈수한 다음 critical-point drier로 건조시키고 gold coating하여 주사 전자현미경으로 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

인삼의 접합자배, 유식물체 및 자엽마디 절편을 BA와 GA<sub>3</sub>가 각각 5 μM 첨가된 화아유도 배지에 배양한 결과 이전의 논문에서 밝힌 바와 같이(Lee et al., 1991) 재료의 종류에 관계없이 자엽마디에 존재한 액아로부터 화아가 형성되었다(Figure 1). 상기의 세가지 재료를 화아유도 배지에 10일 이상 배양하였다가 기본배지로 옮겨졌을 때 모든 재료에서 화아를 형성하기 시작하였다(Table 1). 개화 빈도는 재료에 따라 차이를 보였는데 접합자배의 경우 배양 21일째까지 빈도가 증가하였으며 배양 70일까지 거의 비슷한 정도를 나타내었다. 유식물체의 경우는 배양 70일째까지 조금씩 증가하는 경향을 보였고 최고 86%의 개화가 이루어졌다. 자엽마디 절편을 재료로 하였을 경우 개화는 배양 21일만에 100%에 이르렀다. 세 종류의 재료 모두 개화가 결정되는데는 화아유도 배지에서 최소 10일간의 배양을 필요로 하였다.

인삼의 자엽마디 절편에 존재하는 액아에서 화아가 발생하는 초기 단계를 조직학적인 면에서 관찰하였다. 초기 단계의 화아의 구조는 엽아와 매우 비슷하였다. 화아유도 배지에서 배양을 시작하기 전의 재료에는 모식물체로부터 유관속이 연결된 분열능이 왕성한 세포로 구성된 분열조직이 존재하였다(Figure 2A). 배양 5일째에 분열조직 한쪽 가장자

**Table 1.** The frequency of in-vitro flowering in ginseng explants cultured to MS medium supplemented with 5 μM BA and 5 μM GA<sub>3</sub> for various lengths of time.

Explants	Frequency of flowering (%)														
	Day of transfer from flowering medium <sup>a</sup>														
	0	3	5	7	10	12	14	21	28	35	42	49	56	63	70
Zygotic embryo	0.0	0.0	0.0	0.0	15.7	34.4	38.4	90.0	67.4	71.5	76.4	68.8	86.1	66.7	75.0
Seedling	0.0	0.0	0.0	0.0	3.7	5.6	14.8	49.1	51.8	66.4	60.8	67.4	83.9	75.0	86.1
Cotyledonary node	0.0	0.0	0.0	0.0	34.0	49.1	72.7	100	100	100	100	100	- <sup>b</sup>	-	-

<sup>a</sup>Explants were transferred from FIM to the basal medium.

<sup>b</sup>“-” indicates no test.

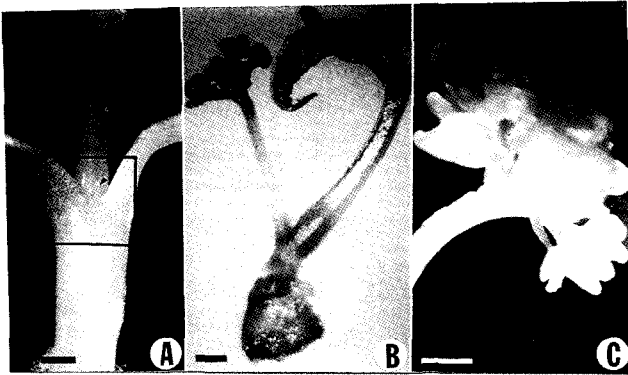


Figure 1. In-vitro flowering of ginseng cotyledonary node explant. A, A cotyledonary node employed as an explant is indicated by square (bar = 1 mm). B, A cotyledonary node bearing flowers after 4 weeks of culture (bar = 1 mm). C, An umbel with many flowers after 4 weeks of culture (bar = 0.5 mm).

리로부터 엽원기로 자랄 새로운 세포들이 형성되었고 (Figure 2B), 배양 7일째 양쪽 엽원기 사이에 장차 화아로 발달될 세포그룹이 형성되기 시작하였다(Figure 2C). 규칙적인 배열을 한 tunica-carpus 층이 존재하였으며 그 안쪽에는 3-4개로 이루어진 분열세포가 존재하였다. 배양이 진행됨에 따라 이 분열조직의 세포수가 증가하여 전체적인 부피가 증가되었고(Figure 2D), 배양 15일이 지난 후부터는 전형적인 화아 모양을 갖추었다(Figure 2E, F). 이러한 결과로부터 알 수 있는 점은 세포수준에서의 화아유도가 결정되기 위해서는 자엽마디 절편을 최소한 7일 이상 화아유도 배지에서 배양해야 한다는 점이다. 그러나 7일 동안 화아유도 배지에 배양되었다가 기본배지로 옮겨져서 9주동안 배양된 어떤 재료에서도 개화가 관찰되지 않은 것으로 보아 (Table 1) 배양 7일째까지의 분열조직은 화아로 될 수 있는 competence를 얻었을 뿐 개화 결정은 되지 않았음을 알 수 있다. 화아유도배지에 10일간 이어서 기본배지에 60일 동안 배양된 재료에서 개화가 시작되는 것은 (Table 1) 배양 10일째에야 비로소 개화가 결정됨을 알 수 있게 한다. 그러나 실제로 화아유도가 결정되는 단계인 배양 10일째의 재료는 화아가 아닌 엽아로 관찰되었다. 이것은 아직 형태적으로 화아로 결정되지 않았고 다만 생화학 혹은 분자수준에서 화아로 결정되었음을 시사한다. 화아유도 배지에 15일 이상 배양하였을 때 비로소 형태적으로 식별될 수 있는 화아가 형성되었다. Christianson과 Warnick (1988)는 부정아 형성을 위하여 14일 동안의 결정기간을 필요로 한 *C. arvensis*의 잎 절편의 경우에서 12일 후에 shoot의 정단분열조직이 형성된다고 하였다. 이는 본 연구와 동일한 접근방법을 이용하였으나 형태분화 이전의 생화학 혹은 분자수준의 결정단계를 분리해 내지 못한 것으로 판단된다. 즉, 형태분화 이전의 생화학 혹은 분자수준에서 부정아 형성의 결정이 된 절편과 결정이 되지 않은 단계의 절편을 상호비교할 수 있다면 부

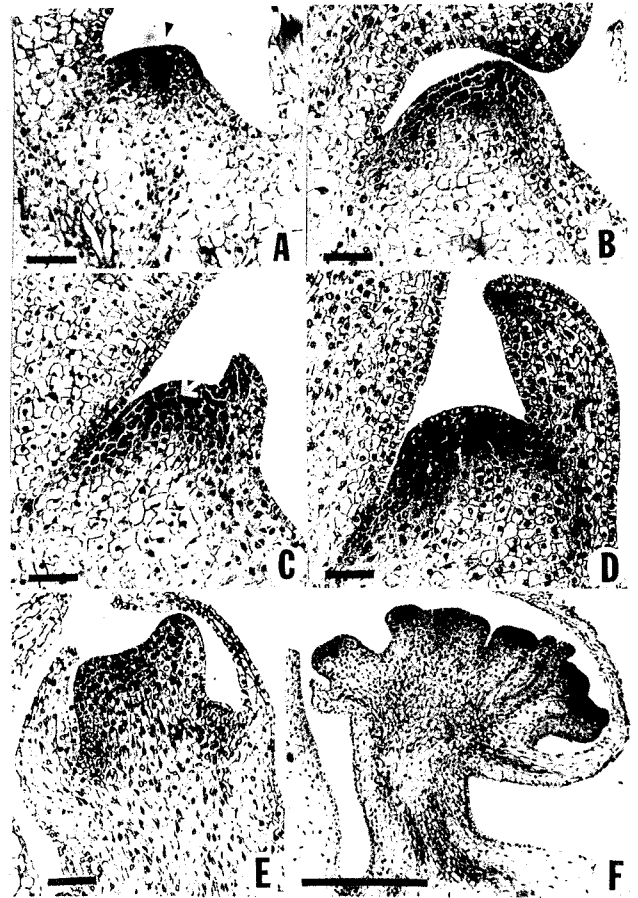
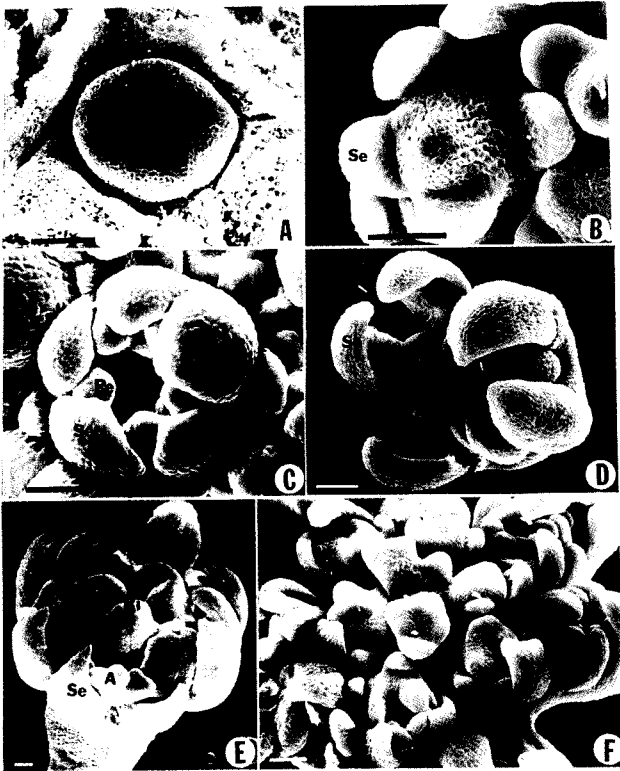


Figure 2. Histology of in-vitro flowering of ginseng cotyledonary node explant cultured on FIM. A, Explant before culture. (The black arrow indicates axillary shoot apical meristem). B, Explant after 5 days of culture. C, Explant after 7 days of culture. (The white arrow indicates group of cells fated for flower meristem). D, Explant after 10 days of culture. E, Explant after 15 days of culture. F, Newly formed flower bud after 20 days of culture. Bars = 50  $\mu$ m.

정아 형성의 결정인자를 탐색할 수 있게 된다. 본 연구에서는 결정단계 (배양 후 10일)에서 형성된 정단분열조직이 형태적으로 화아가 아닌 엽아이므로 이 엽아와 개화 결정단계 이전의 엽아를 생화학 혹은 분자수준에서 비교하여 엽아를 화아로 전환시키는 조절인자(regulatory element)의 탐색을 가능케 한다고 볼 수 있다.

인삼 꽃은 여러 개의 꽃들이 모여있는 우산모양인 산형화서로 이루어져 있다. 맨 바깥쪽에서 안쪽으로 5개씩의 꽃받침, 꽃잎, 수술이 있으며 중앙에 2개로 갈라진 암술이 존재한다. 화아가 발달하는 과정의 형태학적인 면을 주사 전자현미경을 통해서 관찰하였다. 화아유도 배지에서 자엽마디 절편은 배양 12일이 지난 후, 화기의 각 부위들로 발달하기 위하여 분열조직의 가운데 부분이 오목하게 들어가고 가장자리 부위가 불룩하게 변하였다(Figure 3A). 배양이 더 진행됨에 따라 5개의 꽃받침으로 발달될 조직이 만들어졌으며



**Figure 3.** Scanning electron micrograph of developmental stages of ginseng flower meristem. A, Earliest visible sign of flower bud after 12 days of culture. B, Development of 5 sepals after 21 days of culture. C, Initiation of 5 petals and stamens after 25 days of culture. D, E, Further development of flower bud after 30 days of culture. F, An umbel with many flower buds after 25 days of culture. Bars = 0.1 mm. A, anther; Pe, petal; Pi, pistil; Se, sepal; St, stamen.

(Figure 3B), 이 후에 그 안쪽으로 5개의 꽃잎과 수술이 될 조직이 관찰되었다(Figure 3C). 화아가 점점 발달하여 화기를 구성할 여러 부위가 확실하게 존재하였으며(Figure 3D), 발달이 더 진행되어 수술과 암술로 발달될 부위가 구별되었다(Figure 3E). 산형화서로 배열하고 주변의 봉오리부터 중앙으로 향해서 꽃이 발달하는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 3F).

인삼의 기내 개화에는 BA가 주된 요인으로 GA<sub>3</sub>는 ABA와 같은 저해제의 효과를 극복하는 역할을 하였다(Lee et al., 1991). 즉, 외부에서 처리된 성장조절제의 작용으로 엽아가 화아로 전환되는 것이라 여겨진다. 일반적으로 auxin/cytokinin 비율이 높으면 뿌리, 낮으면 shoot, 그 중간이면 캘러스를 만드는 것은(Skoog and Miller, 1957) 이미 많은 종류의 식물조직에서 증명되었다. 이것은 기본적으로 성장조절제의 종류와 양이 형태발생 패턴을 결정함을 시사한다. 결정이란 competent한 세포가 여러 형태발생 패턴 중 하나를 택하여 그 과정이 시작된 것을 가리킨다(Reiger et al., 1968). Christianson과 Warnick (1988)은 *C. arvensis*의 잎

절편을 SIM에 배양하여 배양 5일만에 competence를 얻었으며 배양 14일에 shoot가 되는 결정시점을 확인하였다. 인삼에서 기내 개화 결정 기간은 10일이었고, *C. arvensis*의 shoot 형성은 14일만에 결정된 것으로 보아 배양 초기에 competence를 얻고 그 후로 약 10일 배양 전후에 특정 기관으로 결정되는 것 같다. 고구마의 체세포배발생은 2,4-D 배지에서 4주 동안 배양하였을 때 가능하였으며 그보다 배양 기간이 짧았을 경우 캘러스나 뿌리가 형성되었다(Liu et al., 1992).

본 연구에서 사용한 인삼재료는 BA와 GA<sub>3</sub> 첨가 배지에서 개화가 이루어졌는데 화아유도 배지에서 7일 경과하였을 때 형태적으로 엽아가 나타났으나 이들은 10일 경과 후에 화아로 발달하도록 결정되었으며 그 후에는 배지에 생장조절제가 없어도 화아로 발달할 수 있었다. 이는 아마도 자엽마디에 존재하는 액아가 배양 전에 이미 개화의 competence를 가지고 있거나 혹은 배양 후 수일 내에 competence를 갖게 되기 때문으로 사료된다. 따라서 본 시스템을 이용하여 개화가 결정되기 이전의 엽아와 개화가 결정된 엽아의 생화학적 차이를 단백질이나 핵산(mRNA)수준에서 규명함으로써 형태발생의 결정단계 추정과 이에 관련된 생화학 및 분자수준에서의 메커니즘을 규명할 수 있을 것으로 여겨진다.

## 적 요

인삼의 기내 개화가 결정되는 시점을 조사하기 위하여 접합자배, 유식물체, 자엽마디 절편을 BA와 GA<sub>3</sub>가 각각 5 μM 첨가된 MS 배지(화아유도 배지)에 배양하였다. 재료를 화아유도 배지에 다양한 기간 동안 배양하였다가 각각 생장조절제가 첨가되지 않은 기본배지로 옮기게 되면 화아유도가 결정된 재료에서만 개화가 가능하게 된다. 인삼의 기내 개화가 결정되는 데에는 10일간의 배양을 필요로 하였다. 조직학적 관찰 결과, 화아유도 배지에서 배양 10일째의 액아에 존재한 분열조직은 화아로 발달되도록 운명되었음에도 불구하고 형태적으로는 엽아의 상태로 남아있었다. 이러한 분열조직은 배양 15일 경과한 후에야 비로소 전형적인 화아의 외형을 갖추었다. 이러한 결과는 식물체에서 영양생장으로부터 생식생장으로의 전환시 일어나는 생화학적 혹은 분자생물학적 연구에 이용될 수 있을 것이다.

시사 조직학적 및 형태학적 관찰에 많은 도움을 준 최필선씨, 원고에 대해 세심한 논평과 수정을 가해 준 광상수, 이문순 박사과 원고 정리를 도와 준 김창숙씨에게 감사한다.

- Arya S, Liu JR, Eriksson T (1991) Plant regeneration from protoplasts of *Panax ginseng* (C.A. Meyer) through somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 10: 277-281
- Chang WC, Hsing YH (1980) In vitro flowering of embryoids derived from mature root callus of ginseng (*Panax ginseng*). *Nature* 284: 341-342
- Christianson ML, Warnick DA (1988) Organogenesis in vitro as a developmental process. *HortScience* 23: 515-519
- Lee HS, Liu JR, Yang SG, Lee YH, Lee K-W (1990) In vitro flowering of ginseng plants regenerated from zygotic embryos-derived somatic embryos of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) by growth regulators. *HortScience* 25: 1652-1654
- Lee HS, Lee K-W, Yang SG, Liu JR (1991) In vitro flowering of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) zygotic embryos induced by growth regulators. *Plant Cell Physiol* 32: 1111-1113
- Liu JR, Min SR, Yang SG (1992) 2,4-dichlorophenoxyacetic acid at a single concentration determining various morphogenesis patterns in shoot meristem cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Korean J Plant Tissue Culture* 19: 161-170
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Reiger R, Michaelis A, Green MM (1968) A glossary of genetics and cytogenetics. Springer-Verlag, New York
- Scorza R (1982) In vitro flowering. *Hort Rev* 4: 106-127
- Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation plant tissues cultured in vitro. *Symp Soc Expt Biol* 11: 118-140
- White PR (1943) Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient for cultivation of excised tomato roots. *Growth* 7: 53-65

(1994년 11월 1일 접수)