

## 고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 자엽으로부터 체세포배 및 부정아의 발생에 미치는 식물호르몬의 영향

양덕춘<sup>#</sup> · 윤의수\* · 최광태

한국인삼연초연구원 유전생리부, \*공주대학교 생물학과  
(1999년 7월 20일 접수)

## Effects of Growth Regulators on the Formation of Somatic Embryo and Adventitious Bud from the Cotyledon of Korean Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer)

Deok-Chun Yang<sup>#</sup>, Eui-Soo Yoon\* and Kwang-Tae Choi

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

\*Department of Biology, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea

(Received July 20, 1999)

**Abstract :** Cotyledon explants of Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer), a perennial medicinal plant, produced direct somatic embryos at a high frequency on MS medium without growth regulators. Cytokinin highly suppressed the somatic embryogenesis but stimulated direct formation of adventitious buds. BAP was more effective than kinetin for the formation of adventitious bud. IBA combination with cytokinin enhanced the frequency of adventitious bud formation. The highest frequency of adventitious bud formation were 40% at 0.05 mg// IBA and 5 mg// BAP. Adventitious buds were mainly formed near the distal portion of cotyledon, while somatic embryos were only formed near the proximal portion of cotyledon. Adventitious buds were covered with sheath similar to axillary buds in the zygotic embryos, and then leaf-like epicotyls were developed.

**Key words :** Ginseng cotyledon, adventitious bud, somatic embryo.

### 서 론

인삼은 다년생 음지성 작물로서 재배조건이 매우 까다롭고, 보통 4년생에서 1회 종자를 채취하는 것을 원칙으로 하고 있다. 또한 종자 1회 채취시에도 40~60립 정도밖에 채취할 수 없어 기내 배양을 통한 단기간의 식물체 재생기술은 우수형질을 지닌 인삼식물체의 기내증식 또는 형질전환식물체의 대량생산에 있어서 큰 의미를 지닌다고 할 수 있다. 인삼의 뿌리 절편을 재료로 하여 Butenko<sup>1)</sup> 등이 최초로 배발생을 보고한 이래

여러 연구자들이 인삼 조직배양을 통한 식물체의 재생을 보고하였다.<sup>2-5)</sup> 그러나 인삼식물체의 기내증식은 매우 까다롭고, 특히 재생된 식물체가 전혀 뿌리를 발생시키지 못하던가, 부실한 뿌리의 발생이 이루어져 아직 토양에서 순화된 식물체를 보고한 예가 거의 없다. 그동안의 인삼 재분화 연구는 주로 체세포배의 발생을 통하여 이루어져 왔으며,<sup>6-9)</sup> 다른 분화방법에 대해서는 전혀 보고된 바가 없다. 그러나 식물체의 재분화 방법으로는 인삼에서 많이 보고된 체세포배의 발생뿐만 아니라 다른 식물에서는 널리 사용되고 있는 부정아의 발생방법이 있는데 아직 인삼을 재료로 한 조직배양에 있어서 부정아의 발생에 관한 연구는 전혀 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구는 인삼 자엽을 배양하여 부정아

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 042-866-5434; (팩스) 042-862-2522  
(E-mail) dcyang@gtr.kgtri.re.kr

의 발생에 미치는 식물호르몬의 효과를 체세포배의 발생과 비교하여 조사하였으며, 그 발생 형태를 관찰하였던 바, 그 결과를 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 사용 재료 및 기내배양

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer) 미숙배 접합자종을 약 3개월 동안 습한 상태에서 개갑을 유도시킨 후 4°C 냉장고에서 3개월간 접합자 배를 성숙시켰다. 접합자배가 약 5 mm 크기로 성숙되었을 때 인삼 종자를 70% 에탄올로 1분간, 그리고 1% 차아염소산나트륨 용액에서 약 20분간 표면살균 시킨 다음 멸균된 증류수로 3~4회 수세하였다. 멸균된 성숙접합자배를 적출한 다음 MS<sup>10</sup> 배지를 함유한 패트리접시에 2~3일간 배양하면서 일정한 크기의 접합자배의 기부를 배측과 수직으로 절단한 다음 자엽절편을 배양재료로 사용하였다. 배지는 MS 기본배지에 3% 설탕과 0.7% 한천을 첨가하였으며, pH 5.8로 조정된 다음 121°C에서 15분간 습열 멸균하였다.

### 2. 분화에 미치는 식물호르몬의 영향

성장조절제는 오옥신으로 IBA를, 사이토키닌으로는 BAP, kinetin을 사용하였으며 각각의 농도는 공히 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 및 5.0 mg/l로 하였다. 한편 오옥신과 사이토키닌으로 조합처리를 위해 BAP 및 kinetin을 단독처리와 같은 농도에 0.05 mg/l IBA를 각각 첨가하였다. 배양용기로 플라스틱 패트리접시(10×1.5 cm)에 배지를 약 30 ml씩 분주하여 사용하였다. 배양실 조건은 1,900 Lux 백색형광등으로 16시간 조명하였고 온도는 25°C로 유지하였다. 배양 결과는 각 실험에서 모두 배양한지 약 2달 후에 실험 결과를 조사하였으며, 배양된 재료에서 체세포배 및 부정아의 발생률은 배양재료의 수에서 1개 이상의 체세포배 또는 부정아를 발생시킨 배양재료의 수를 세어 백분율을 구하였다. 한편 인삼자엽의 표면으로부터 발생하는 부정아 및 체세포배의 분포를 조사하기 위해서 자엽을 정부, 중간부, 기부로 구분한 뒤 이로부터 부정아 및 체세포배의 분포를 조사하였다. 체세포배의 분포는 성장조절제가 전혀 첨가되지 않은 배지에 배양한 자엽을 가지고 조사하였고, 부정아의 분포는 부정아의 발생률이 높은 BAP와 kinetin이 2.5 또는 5.0 mg/l첨가된 배지에 배양된 자엽을 가지고 조사하였다.

### 3. 부정아의 생장 및 현미경관찰

인삼자엽으로부터 유도된 부정아의 지속적인 생장을 위해 발생된 부정아를 10 mg/l GA3가 첨가된 MS배지에 옮겨 1달 후에 부정아의 생장정도를 관찰하였다. 배양 중인 재료의 일부를 FAA(formalin : ethanol : acetic acid)에 고정한 다음 에틸 알코올로 탈수한 후 파라핀으로 매몰 하였다. 이를 10 μm로 회전식 마이크로톰으로 박편 절단한 다음 0.5% 헤마톡실린으로 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 인삼자엽으로부터 부정아의 발생

발아직전에 있는 인삼자엽을 식물호르몬이 전혀 첨가되지 않은 MS기본 배지에 접종하여 부정아의 발생 과정을 조사할 목적으로 우선 체세포배의 발생 형태를 조사하였던 바, 상기배지에서는 자엽의 기부에서 매우 고빈도로 체세포 단일배가 발생하였으며 부정아는 전혀 형성되지 않았다(Fig. 1A). 이와 같이 형성된 단일배의 경우에는 체세포배끼리 융합등의 현상이 거의 나타나지 않고 globular, heart, torpedo stage(Fig. 1B)를 걸쳐 완전한 자엽형태의 발육되는(Fig. 1C) 전형적인 체세포배의 발생과정을 나타내었다. 그러나 발육된 자엽형 체세포배일 경우에도 동일배지에서는 전혀 발아가 되지 않았고 백색상태의 배로 휴면이 되는 경향을 보였으나, 10 mg/l GA3를 처리시에는 정상적으로 단일 shoot(Fig. 1D)로 발달되는 양상을 나타내었다. 반면 식물호르몬을 첨가할 때에는 분화의 양상이 매우 다르게 나타나는데, 체세포배뿐만 아니라 부정아가 형성되는 경향을 보였다. 특히 체세포배는 자엽의 기부에서만 발생하는 반면(Fig. 1A), 부정아는 자엽의 정부에서 발생하는 뚜렷한 대조를 보였다(Fig. 2A, B). 또한 체세포배는 발생 초기부터 자엽단계로 충분히 성숙될 때까지 백색을 나타낸 반면(Fig. 1A, B, C), 부정아는 자엽의 정부 표면 위에서 처음부터 녹색의 돌기로 발생되다가(Fig. 2A), 발달이 진전되면서 돌기의 포가 열개되고 그 사이에 아주 작은 유경이 출현되는 경향을 보였다(Fig. 2B). 또한 형성된 부정아의 유경의 경우에도 사이토키닌이 첨가된 부정아 유도배지에서는 배양기간이 2달 이상 경과하여도 유경의 생장이 이루어지지 않았으나, 체세포배와 마찬가지로 10 mg/l GA3가 첨가된 배지에 옮겨 주었던 바, 유경의 생장이

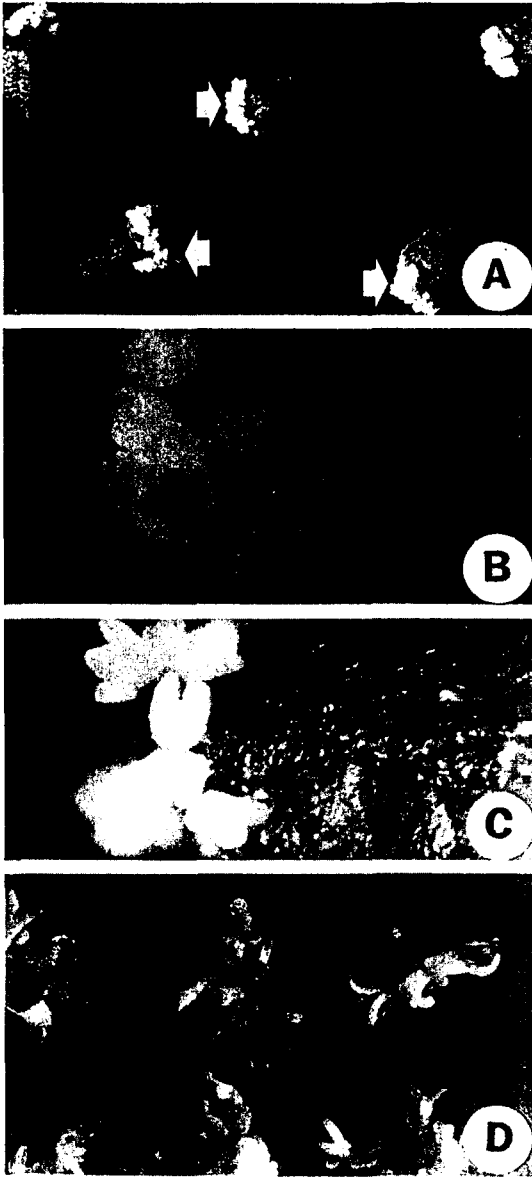


Fig. 1. Somatic embryos formed from the cotyledon of zygotic embryos. A; single embryos (arrows) formed directly from the base of cotyledon explant on MS medium lacking growth regulators after 1 month, B; heart stage embryos, C; cotyledonary somatic embryos cultured after 2 months, D; germinating somatic single embryos on MS medium with 10 mg/l  $GA_3$  after 1 month.

활발하게 이루어지면서 생장이 가능하였다(Fig. 2C, D).

$GA_3$ 가 첨가된 배지에서 성장한 부정아와 체세포배의 발육된 형태에는 차이가 있었는데 부정아의 경우에는 여러개의 shoot가 형성되고 뿌리의 발육이 되지 않은 반면(Fig. 3A) 체세포배의 경우에는 한 개씩 단일배로 떨어

지면서 뿌리가 형성되는 경향을 보였다(Fig. 3B). 기내에서 발생된 인삼 체세포배의 경우는 접합자 배와 같이 휴면하는 경향을 지니기 때문에 발아되기 위해서는  $GA_3$ 의 첨가가 필요하는 것으로 보고되었으나(Choi *et al.*, 1996), 부정아의 경우에도  $GA_3$ 의 첨가가 요구되는 것으로 보아 기내에 발생된 부정아도 휴면상태에 있는 것으로 판단된다. 또한 식물호르몬 무첨가배지에서는 자엽의 기부에서만 체세포배가 발생되는데 이런 원인은 배양재료의 극성과 관련된다고 여겨지며, 특히 내재오옥신의 극성이동 및 이온의 흐름이 관여한다고 생각되는 바, 이미 인삼 체세포배의 발생에 있어서 오옥신 극성이동억제제인 TIBA를 첨가할 경우 극성발생이 상쇄되는 결과를 관찰한 바 있다(Choi *et al.*, 1997). 그러나 본 실험에서 자엽 정부에서의 부정아의 발생 원인에 대하여서는 해석하기 어려운 점이 있으나 아마도 부정아의 발생은 내재오옥신이 축적되는 자엽의 기부보다는 축적이 덜한 자엽의 정부에서 발생조건이 양호한 결과라고 추측된다.

## 2. 인삼부정아의 형성에 미치는 식물호르몬의 영향

발아직전에 있는 성숙된 자엽을 배양재료로 이용할 경우 식물호르몬 무첨가 배지에서 많은 체세포배가 발생되지만 사이토키닌을 첨가할 경우에는 체세포배와 더불어 부정아가 형성된다(Figs. 2 and 4). 사이토키닌 중에서 kinetin을 처리할 경우에는 농도가 높아질수록 체세포배의 발생빈도는 점차 감소되고 부정아의 발생빈도가 증가하는 경향을 보였으며, 5 mg/l을 첨가할 때에는 약 10%정도의 체세포배와 부정아가 형성되었다(Fig. 4). 그러나 BAP를 처리할 경우에는 kinetin처리보다 훨씬 많은 부정아가 형성되었으며, 0.1 mg/l BAP농도에서 비처리구에 비해 체세포배가 약 절반정도가 감소되고 반면에 부정아가 증가하는 경향을 보였다(Fig. 4). 특히 BAP의 농도가 증가할수록 부정아의 형성빈도가 높아져 5 mg/l에서는 약 30%의 부정아가 형성되었으며, 반면에 체세포배는 무처리구에 비해 약 60%가 감소되는 경향을 보여 인삼의 부정아의 형성에는 kinetin보다 BAP가 더 효율적인 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 한편 오옥신으로서 IBA와 사이토키닌을 혼용 처리할 경우에는 부정아의 발생이 더욱 증가하였으나, 0.05 mg/l IBA를 단독으로 첨가할 경우에는 거의 부정아가 형성되지 않고 매우 고빈도의 체세포배만 형성되었다(Fig. 4). 그러나 형성된 체세포배의 경우에는 식물호르몬 무처리구에서 유도된 체세포배와 뚜렷한 배발생빈도의 차이점을 관찰하지 못하

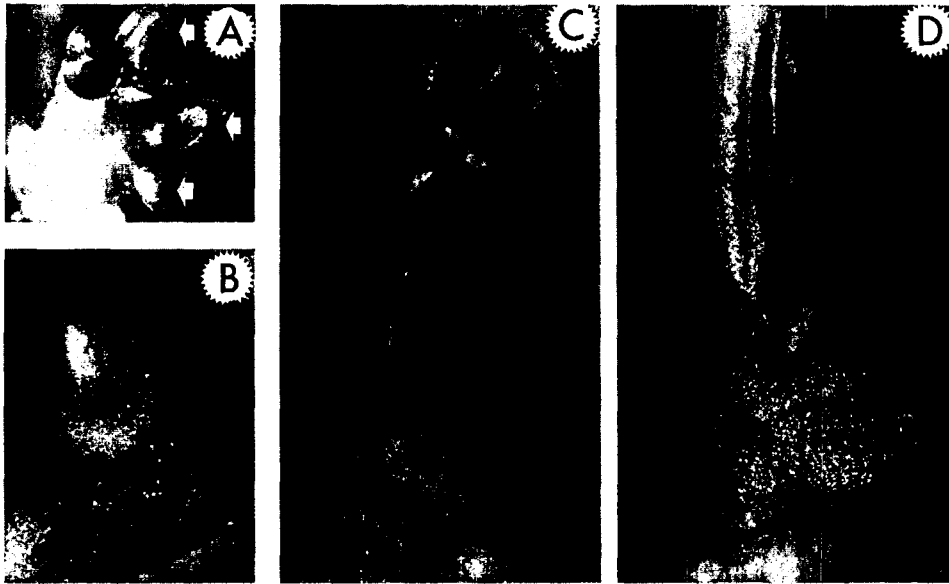


Fig. 2. Shoot formation via adventitious bud from the cotyledon explants of *Panax ginseng*. A; Adventitious buds(arrows) formed directly from a cotyledon on medium with 5.0 mg/l BAP after 1 month. B; Enlarged view of adventitious buds C, D; Shoot development from the adventitious buds on MS medium with 10 mg/l  $GA_3$  after 1 month.

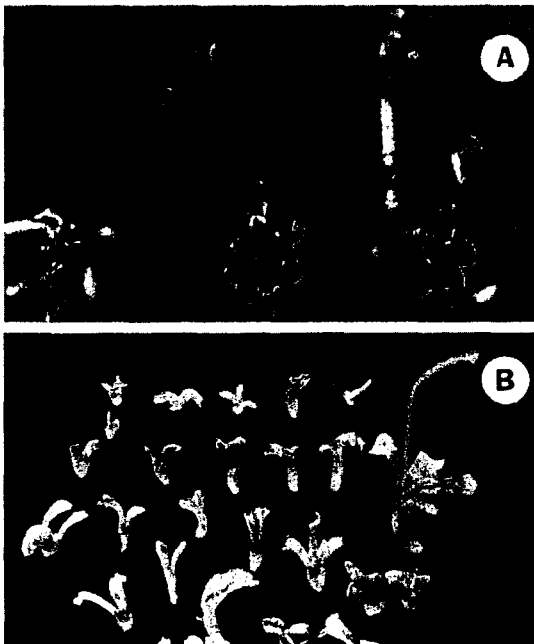


Fig. 3. Shoot development from the adventitious buds(A) and somatic embryos separated individually(B).

였으나, IBA 무처리배지에서 형성된 체세포배의 경우에는 주로 자엽의 기부에서 주로 배가 발생된 반면(Fig. 1A), IBA 처리배지에서 발생된 체세포배의 경우에는 자

엽의 전 부위에 산재되어 발생하는 경향을 보였다(데이터 미제시). 그러나 사이토키닌의 농도가 증가할수록 자엽으로부터 체세포배의 발생이 둔화되고 부정아의 형성이 증가되는 경향을 보였는데, 체세포배의 감소정도는 사이토키닌 단독처리에 비해 IBA 혼용 처리시 더 완만히 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4). 반면 부정아의 형성은 사이토키닌의 농도가 높아짐에 따라 역시 증가하는 경향을 보여 전체적으로 체세포배 및 부정아의 수가 IBA 혼용처리구에서 더 많이 형성되는 현상을 나타내었다. 또한 사이토키닌의 종류에 따라서도 단독처리시와 마찬가지로 0.05 mg/l IBA에 BAP를 첨가했을 때 kinetin을 첨가했을 때 보다 부정아의 형성이 증가되는 경향을 보였으며, 특히 IBA와 5 mg/l BAP 첨가 배지에서는 최고 약 40%의 배양재료에서 부정아가 발생되었다(Fig. 4). 그러나 자엽한개당 부정아의 수는 약 3-5개로서 자엽 한 개당 약 15개 정도 발생하는 체세포배의 수와는 현저히 적은 수로 발생되었다(Figs. 1A and 2A).

### 3. 체세포배와 부정아의 현미경적 비교

식물호르몬 무첨가배지에 배양된 자엽의 절편의 경우에는 기부에서 배양 5일경부터 체세포분화를 위한 분열이 시작되었으며(Fig. 5D), 배양 15일경부터는 globular stage를 나타냈으며(Fig. 5E), 배양 30일 후에는

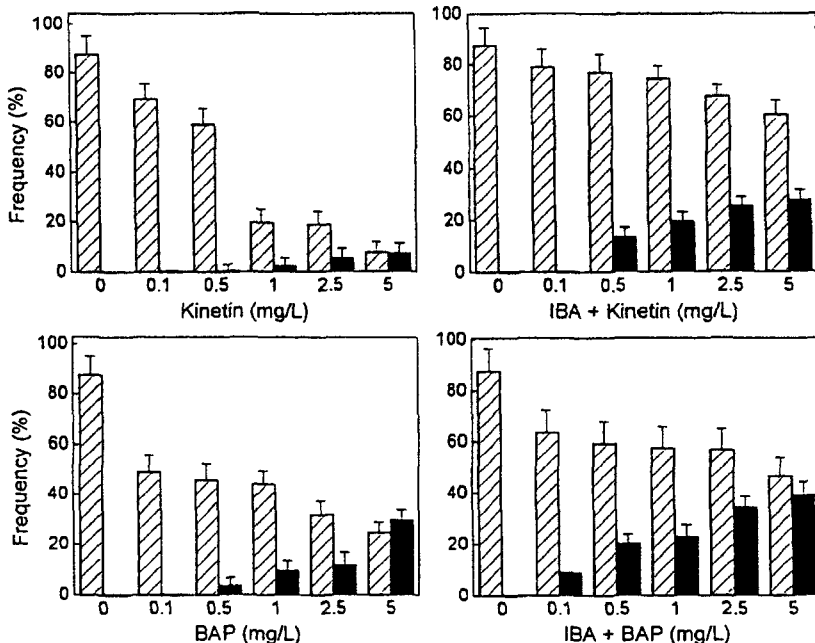


Fig. 4. Frequency of adventitious bud and somatic embryo formation from cotyledon explants of *P. ginseng* on MS medium with different kinds and different concentrations of cytokinin after 2 months of culture (adventitious bud: ■, somatic embryo: ▨). Each bar represents the mean±SE of three independent experiment.

heart, torpedo stage를 걸쳐 완전한 자엽형태로 진행되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5F). 이런 현상은 전형적인 체세포배 발생과정이며, 본 실험에서는 새로운 shoot발생 모습을 관찰할 수 있었는데 사이토카인인 처리배지에서 성장한 자엽의 절편의 경우에는 체세포배의 발생도 일어났지만 일부에서는 직접 부정아가 형성되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5A-C). 부정아의 발생은 체세포배의 발생과는 다르게 shoot의 정부가 있어 될 포로 쌓여 있었으며, 여러개의 녹색의 돌기로 성장하였으나(Figs. 2A and 4A), 체세포배와 마찬가지로 사이토카인 첨가배지에서 형성된 shoot는 생육하지 못하여 발아되지 않았다. 그러나 GA3가 첨가된 배지에서는 포가 2개로 갈라지면서 shoot의 정부가 다시 발달하여(Fig. 5B), 유경이 성장하기 시작하였다(Fig. 5C).

인삼에서 부정아의 형성은 globular, heart, torpedo상태를 걸치는 체세포배 발생과는 달리 직접 shoot의 정부가 출현되어 발생과정을 나타내었다. 또한 매우 특이하게도 재배인삼의 경우 종자발아 후 1년차 기간은 지상부는 줄기의 구조가 아닌 단엽의 구조를 가지고 있는데, 본 기내 실험에서도 인삼 자엽에서 유래된 부정아 또한 단엽의 구조를 갖는 것으로 관찰되었다. 또한 인삼의 경우 다년생이지만 지상부는 가을부터 말라 버리기 때문에 잎의

구조만으로는 식물체로서의 가치가 없다. 그러나 본 실험에서 부정아의 유경의 바로 아래 부위에 또 하나의 휴면 상태의 측아가 존재하는 것을 관찰할 수 있었다(데이터 미제시). 만일 이 측아가 인삼의 뇌두와 같은 기능을 할 수 있다면 부정아 발생을 통한 식물체를 생산이 가능하다고 할 수 있다. 그러나 아직은 부정아의 발생률이 체세포배의 발생률에 비해 현저히 낮고 부정근을 유도해야 하는 번거로움이 있기 때문에 부정아의 발생을 통한 식물체의 생산을 위해서는 다각도의 연구가 필요할 것이다.

### 요 약

인삼 자엽을 식물호르몬을 전혀 첨가하지 않은 Murashige 와 Skoog 배지에 배양할 경우 고빈도로 자엽의 표면으로부터 체세포배가 발생되었다. 그러나 cytokinin을 첨가배지에서는 체세포배의 발생이 억제되면서 부정아가 발생되었다. BAP처리배지에서 kinetin 처리보다 부정아의 발생이 높은 경향을 보였으며, IBA와 사이토카인인의 혼합 처리시에는 부정아의 발생빈도가 단일처리보다 훨씬 증가한 경향을 보였다. 특히 0.05 mg// IBA와 5 mg// BAP 혼합처리구에서 부정아의 형성이 40%로 매우 높은 빈도로 발생하였다. 체세포배

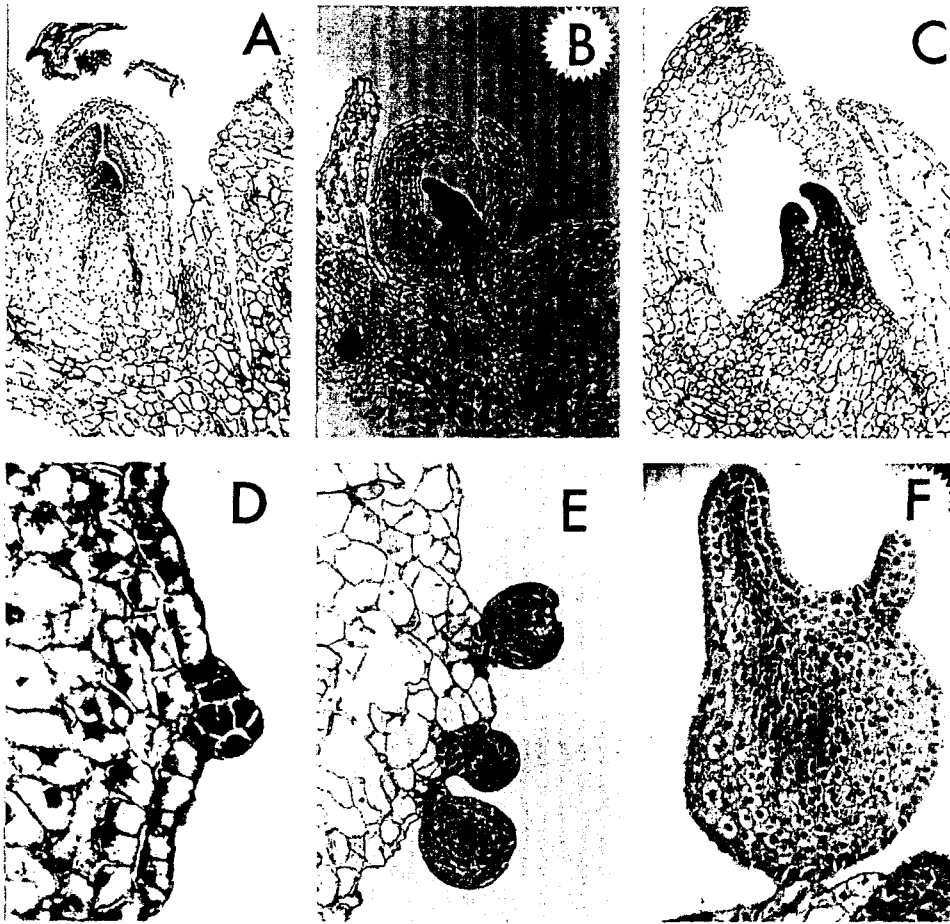


Fig. 5. Histological observation of adventitious bud(A-C) and somatic embryo(D-F) formation from cotyledon explants of *Panax ginseng*. A; An adventitious bud formed from cotyledon explants on medium with 5.0 mg/l BAP after 3 weeks. B,C; An adventitious bud showing a shoot primordia folded with leaf-like sheath. D; A preglobular somatic embryo formed directly from consecutive division of epidermal single cells on MS medium lacking growth regulators, E; globular and heart shaped somatic embryos, F; cotyledonary somatic embryos.

의 발생은 자엽의 기부에서만 발생된 반면 부정아는 자엽의 정부에서 주로 발생되었기 때문에 체세포배의 발생 부위와는 뚜렷이 구분되는 특징을 보였다. 또한 부정아는 접합자배의 측아와 같이 포로 둘러싼 녹색들기로 자라다가 포가 열개되면서 유경이 성장하였는데 줄기의 구조가 아닌 단엽의 구조를 지니며 성장되었다.

### 인용문헌

1. Butenco, R.G., Brushwitzky, I.V. and Slepian, L.I. : *Bot. Zh.* 7, 906 (1968).
2. Cellárová, E., Rychlová, M. and Vranová, E. : *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 30, 165 (1992).
3. Chang, W. C. and Hsing, Y. I. : *Theor. Appl. Genet.* 57, 133 (1980).
4. Arya, S., Liu, J. R. and Eriksson, T. : *Plant Cell Reports* 10, 277 (1991).
5. Choi, K. T., Kim, M. W. and Shin, H.S. : *Korean J. Ginseng Sci.* 5, 35 (1981).
6. Choi, Y.E. and Soh, W.Y. : *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* 44, 253 (1996).
7. Choi, Y.E., Kim, H.S., Soh, W.Y. and Yang, D.C. : *Plant Cell Rep.* 16, 738 (1997).
8. Jhang, J.J., Staba, E.J. and Kim, J.U. : *In Vitro* 9, 253 (1974).
9. Lee, H.S., Liu, J.R., Yang, S.G., Lee, Y.H. and Lee, K.W. : *HortScience* 25, 1652 (1990).
10. Murashige, T. and Skoog, F. : *Physiol. Plant.* 15, 473 (1962).