

人蔘 組織培養에 있어 CO₂ 處理가 植物體 分化 및 生長에 미치는 影響

鄭燦文* · 裴吉寬* · Masatoshi Aoki**

Effects of CO₂ Enrichment on the Differentiation and Growth in tissue culture of *Panax ginseng* C. A. Meyer

Chan Moon Chung*, Kil Kwan Bae* and Masatoshi Aoki**

ABSTRACT : This experiment was conducted to investigate the effects of length of storage period under low temperature, CO₂ enrichment and addition of plant growth regulators in Murashige and Skoog medium on the plant regeneration of Korean ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). Seeds were treated for 60 and 80 days respectively under 5 °C environment. 2500ppm of CO₂ was enriched by ventilation. Three plant growth regulators added to the medium were Indolbutyric acid, Benzyladenin and Gibberellic acid (GA3). The result indicated that : The capacity of differentiation was higher in the aged cotyledons from the seeds treated for 80 days under low temperature condition than in those treated for 60 days. CO₂ enrichment had stimulating effects on the growth and development of shoot primordium significantly but less effects on the formation of adventitious buds. From one zygotic embryo hundreds of plantlets were differentiated. CO₂ enrichment had effects on the formation of both indirect somatic embryo and direct somatic embryo. Indirect somatic embryo showed little growth and differentiation, being undifferentiated vascular stele and epicotyl. Direct somatic embryos were formed on the epidermis of backside basal part of cotyledon. Those embryos developed to whole plant having latent bud.

Key words : CO₂ enrichment, organogenesis, embryogenesis, adventitious bud, primordium, indirect somatic embryo, direct somatic embryo

緒 言

조직배양에 있어 환경조절이라 함은 배양 용기 내의 부정형 세포괴 또는 유식물체가 연구 목적에 적합한 형태로 성장 발달할 수 있도록 CO₂ 등 처리에 의해 환경요인을 제어하는 기술이다. 작금에 이

어 이러한 기술의 발달은 배지 및 성장조절물질 첨가 등과 같이 단편적이었던 과거의 연구방향을 새롭게 변화시켜 지금은 여러 작물에 폭넓게 적용되고 있다. (Alexander et al., 1992; Lim et al., 1992; Ribo & Danielle 1993; Ulrich et al., 1993).

지금까지 인삼조직배양의 재분화 연구는 배지 조성 및 성장조절물질 첨가(정 등, 1992; Arya et al.,

본연구는 한국과학재단의 Post-Doc. 지원금에 의하여 수행되었음

* 충북대학교 연초학과 (Dept. of Tobacco Science, Chungbuk National Univ., Cheongju, 360-763, Korea)

** Faculty of Agriculture, Hokkaido univ., Sapporo, 060, Japan

< '99. 10. 16 접수 >

1993), 분화생장에 대한 조직형태적 특성(최와 소 1994; Cellarova et al., 1992), 열처리(Asaka et al., 1993), 분화경로(정 등 1995) 등 절편체의 분화 및 발달에 대한 연구가 많았다. 최근 인삼 재분화에 성공하여 대량번식을 통한 포장 이식을 시도하고 있으나 유식물체의 포장적용이 성공적으로 이루어지려면 기내 환경조절이 선행되어야 하나 아직 이와 관련한 연구는 미진한 실정이다.

조직배양의 경우 *in vitro*내의 배양환경은 무수한 요인에 의하여 영향을 받고 있기 때문에 이를 전체적으로 조절하여 최적의 상태로 만든다는 것은 무리라 하겠다. 배양환경 조절에 있어 CO₂처리는 연약한 기내묘가 건설한 묘로 성장하는 사실이 보고되었고 또한 광독립영양배양의 효과가 제시되기도 하였다(Kozai et al., 1988a, 1988b). 그리고 CO₂ 첨가는 곧 소식물체의 광합성량을 증대하여 성장도 촉진하는 것으로 보고되어 조직배양에서 CO₂ 처리 효과의 중요성을 강조하였다.(Aoki et al., 1992).

따라서 본 연구는 인삼의 경우도 CO₂처리가 기관분화에 효과가 있을 것으로 생각되어 CO₂를 강제통기방식으로 배양기에 공급하여 개내환경을 조절하였던 바 식물체 분화유형별 재분화에 있어 몇 가지 특이적 현상이 관찰되어 보고코자 한다.

材料 및 方法

본 시험에 공시한 시료는 개갑처리한 종자를 3일간 흐르는 물에 침지한 후 1일간 음건하여 비닐 팩

에 넣어 상온에서 5개월 보존하고 다시 60일과 80일을 저온 처리하여 사용하였는데 이때 60일 저온처리 종자는 10%의 발아율을 나타내었고 80일 저온처리종자는 50%의 발아율을 나타내어 이들 종자에서 발아종자는 제외하고 미발아 종자를 정선하여 사용하였다.

배지는 Murashige and Skoog (MS) 기본배지에 saccharose 30g/l, agar 8g/l 를 첨가하였고 성장 조절물질은 Indolbutyric acid (IBA), Benzyladenin (BA) 그리고 Gibberellic acid (GA3)를 각 3mg/l 첨가하였다. 배양시스템의 특성에서 배양용기는 Magenta製 GA-7로 용량은 380cm³/個이었고, 용기의 空氣流量은 배양용기當 17cm³/分, 換氣回數는 容器當 3.1回/時間 그리고 空氣供給 除菌필터는 東洋(株)製 13JP020AN으로 孔径0.2um이었다. CO₂濃度는 control과 2500ppm을 처리하였다.

공기의 통기는 강제통기방식으로 설치하였고 (Aoki et al., 1992) 배양조건은 온도 25℃, 광도 4000lx로 하여 60일간 배양하며 分化형태를 관찰하였다. 조직검경은 시료를 Carnoy's solution 용액에 고정한 후 일반 常法에 의해 paraffin 절편을 만들었고 이후 hematoxylin 등으로 염색하여 관찰하였다.

結果 및 考察

1. 분화유형별 분화율

배배양 방법에 의한 CO₂ 처리와 무처리구에 있어 저온처리 종자의 분화유형별 분화율을 조사하

Table 1. Effect of CO₂ enrichment and period of low temperature on the rate of organ differentiation via organogenesis and embryogenesis in embryo culture

CO ₂ enrichment (ppm)	Period of low temperature (5℃)	No. of explants	Organogenesis		Embryogenesis	
			Adventitious bud (%)	Shoot primordium (%)	Indirect somatic embryo (%)	Direct somatic embryo (%)
Control	60	500	84.6	47.9	0	0
	80	500	85.2	47.4	0	0
2500	60	500	85.7	50.7	2.5	8.2
	80	500	87.0	85.8	3.3	10.3

었던 바 분화패턴이 매우 다양하였다. 단극성을 갖는 기관발생의 경우 부정아 유래의 분화율은 CO₂처리 유무에 관계없이 비슷한 경향이나 shoot primordium 유래의 분화율은 CO₂와 저온처리 80일 처리구가 높았다.

양극성을 갖는 배발생의 경우는 CO₂를 처리하지 않으면 indirect 또는 direct somatic embryo가 전혀 출현하지 않았다. 그러나 CO₂를 처리할 경우 저온처리 기간에 따라 다소 차이는 있지만 indirect somatic embryo는 2.5-3.3%, direct somatic embryo는 8.2-10.3%로 약 10%내외의 분화율을 나타내었다.

2. 배의 부위별 기관분화 특성

인삼의 조직배양에서 CO₂ 처리에 의한 접합자배의 분화특성을 조사하였는 바 부위에 따라 기관발생양상이 전혀 상이하였다.

먼저 무처리구나 CO₂ 처리구 모두 부정아는 잘 유도되었고 shoot primordium도 정도의 차이는 있으나 자엽의 표면과 이면조직에서 모두 생겨났지만 이면 보다는 표면조직이 양호하였다. 무처리구는 indirect somatic embryo와 direct somatic embryo가 유도되지 않았으나 CO₂ 처리구는 양쪽이 모두 잘 유도되어 대조를 보였다.

광독립영양배양을 통한 CO₂ 첨가는 감자 등 여타 작물에 있어 식물체 생장을 건설하게 하고 생장에도 효과가 있는 것으로 보고된 바 있듯이(Kozai et al., 1988a; Aoki et al., 1992) CO₂첨가는 인삼에서도 분화패턴에 다양한 효과를 나타내었다.

Adventitious bud(부정아)에서 유래하는 소식물체수는 10개 내외로 CO₂처리에 의한 수적 증가는 없었고 다만 분화 후 생장이 급속히 진전되고 경엽이 무처리에 비해 현저히 큰 것이 특징으로 CO₂처리에 의한 효과가 현저하였다(그림1).

Shoot primordium 유래의 소식물체는 자엽이 피



Fig. 1. The shoot differentiation from adventitious bud in embryo culture

층조직이 변화를 일으켜 발생하는 것으로 최초의 자엽은 5개의 유관속 중심주 조직이 횡열로 배분되어 있었고 그 구조는 망상으로 되어있었다(그림 2).

이후 이들 표피조직에서 primordium이 dome의 형태로 불거져 나오고 이것이 분화성장하여 싹초가 되었는데 1개의 자엽으로부터 shoot

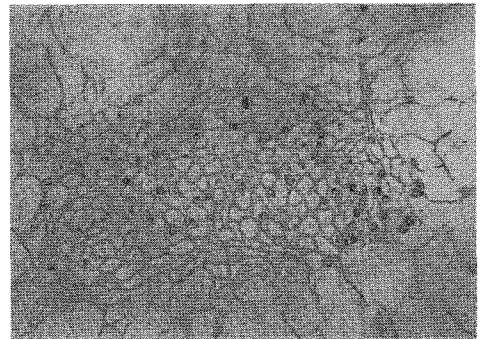


Fig. 2. Vertical section of cotyledon (left) and vascular stele (right) of zygotic embryo

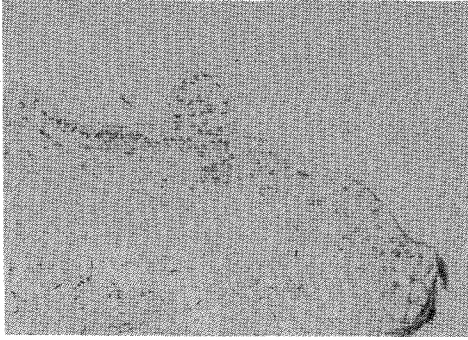


Fig. 3. Type of dome of shoot primordium (left) and shoot differentiation and growth (right) in embryo culture

primordium에 의해 만들어지는 신초수는 100개에서 수백개도 가능할 것으로 보여지며 이는 CO₂ 무처리구의 20여개 내외보다 비교할 수 없을 만큼 많았다(그림 3).

Indirect somatic embryo의 분화패턴은 배축에 가까운 자엽의 基底部位가 먼저 갯슴조직으로 형

클어지고 캘러스화 되면서 자엽의 상층부로 점차 확대되었다. 투명한 캘러스는 유백색으로 변화되면서 난 개의 체세포배로 단리되어 발달하였고 이들 체세포배는 자엽부위에서 클로로필 색소가 발현되면서 파랗게 변화하였고 유근이 가까운 하단에서는 안토시아닌 색소가 발현되면서 자색으로

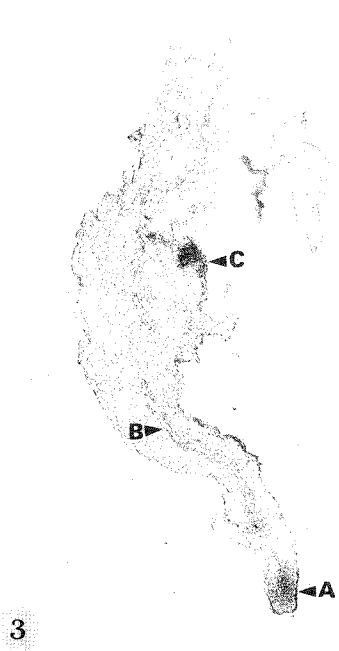


Fig. 4. Characteristics of indirect somatic embryo derived from cotyledon callus
 1. Development stage of somatic embryo. 2. Various type of somatic embryo. 3. Vertical section of somatic embryo (A : zone of root tip, B : vascular stele, C : epicotyle axis)

변화되었다(그림 4-1).

이들 체세포배는 여러 형태로서 형태적으로 불완전한 것이 많았고(그림 4-2) 상배측이 전혀 추대되지 않아 내부조직을 검경하였던 바 근단과 배측만이 분열조직이 치밀하게 되어있을 뿐 중심부 유관속계의 발달은 미미한 상태이었다(그림 4-3).

지금도 인삼조직배양에서 식물체 작출에 어려움을 겪고 있는 이유는 이와 같이 체세포배의 각 기관이 정상적이지 못한 즉 미분화된 기관이 散在하여 있기 때문에 완전한 식물체 작출을 위한 적절한 조건 정립이 먼저 강구되어야 할 것이다.

Direct somatic embryo의 분화패턴의 특징은 자엽의 표면조직보다는 이면조직에서 일어난다는 것이고 같은 이면조직에서도 배측부위 기점 자엽의 1/4정도 부근이 많았다. 자엽의 조직에서 직접 식

물체가 분화되는 관계로 shoot primordium에 의한 신초와 유사하였다. 그러나 초대배양 60일을 경과하면 자엽조직에 돌기가 생기고 계대배양 30일 정도에 식물체가 돌출하고 돌출된 식물체 기저에 제1, 제2의 잠아가 다시 돌출하였다. 이들 유식물체는 뿌리부분이 자엽의 생체 조직에 박혀서 성장하는 관계로 구형의 뿌리가 많았고 단경 또는 다경식물체에 신장된 뿌리를 갖는 개체도 있었다(그림 5).

Direct somatic embryo는 1983년 orchardgrass에서 보고한 이래(Conger et al., 1983) 많은 작물에서 같은 사실이 보고되었고, 이는 식물체의 엽 주변부위의 특정부분에 국한하여 발생하는 것도 있는 것으로 보고한 바와 같이(Pedroso et al., 1993) 인삼의 direct somatic embryo 역시 자엽의 이면 하단부위에서 주로 발생하였다.

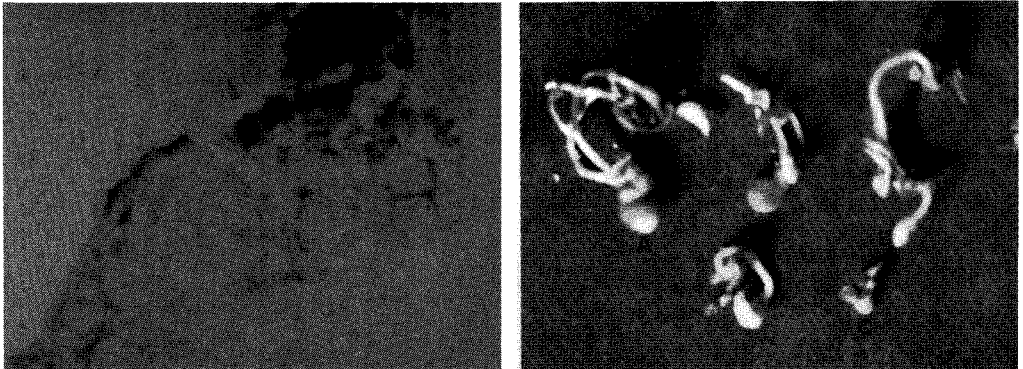


Fig. 5. Various type of ginseng plant derived from direct somatic embryo in embryo culture

Left; Epidermis tissue of backside basal part of cotyledon

Right; Ginseng plant having a latent bud (A : multi-shoot plant type, B; whole plant type having shoot, root and latent bud C; initial plant type derived from inner cotyledon tissue)

3. 분화유형별 기관형성의 유무

부정아 유래의 소식물체는 경, 엽병, 소엽 그리고 화기가 존재하지만 유근은 발생하지 않았고 다만 신초의 기저에서 잠아와 구분되는 부정아가 비록 수는 적으나 연속적으로 생겨났다. 그러나 이들 소식물체는 3개의 소엽이 잘 발달되어 있고 경과 엽병의 구분이 확실한 소식물체가 많았는데 기내 화기는 모두 경의 정단조직에서 분화발달하였다.

Shoot primordium 유래의 소식물체는 엽병과 소엽은 있으나 경, 유근, 잠아, 화기가 없는 것이 특징이었으며 특히 신초의 기저에서 무수히 많은 shoot primordium이 생겨나기 때문에 소엽은 형태가 부정형으로 매우 다양하고 무성하였다.

In direct somatic embryo는 치상 절편으로부터 캘러스가 유기되어 분화되었고 단지 유근과 자엽이 있을 뿐으로 형태적으로 가장 불완전하였다.

Table 2. Characters of organ of plantlets according to path way of regeneration in embryo culture

Path way of regeneration	Stem	Petiole	Leaflet	Rootlet	New bud	In vitro flower	Whole plant
Adventitious bud	○	○	○	×	×	○	×
Shoot primordium	×	○	○	×	×	×	×
In direct somatic embryo	×	×	×	○	×	×	×
Direct somatic embryo	○	○	○	○	○	×	○

* O : organ forming X : organ non-forming

마지막으로 direct somatic embryo의 경우는 기내화기만 발달하지 않을 뿐 기타 경, 소엽병, 소엽, 유근, 잠아 모두를 가지고 있는 완전한 식물체이었다.

부정아 유래의 기내화기 출현에 대하여 조직형태적 관점에서 보고된 바 있는데(정 등, 1995b) 인삼에서 이들 화기의 기내출현은 3년생 이상의 삼포에서 나타나는 화기와는 전혀 다른 특이적 현상이라 하겠다. Direct somatic embryo 유래의 소식물체를 60일간 저온처리한 후 경화처리하여 pot에 이식하였던 바 잠아 발달은 물론 발근 및 생육도 정상이었다. 지금까지 인삼에서 기내소식물체 유도에 성공한 예는 있으나 본 연구 결과와 같이 CO₂ 처리를 통한 기내환경 조절에 의한 direct somatic embryo 유래의 식물체 작출은 인삼의 새로운 분화 기술 모델에 응용 될 수 있을 것으로 생각한다.

摘 要

인삼조직배양에서 배양환경 조절방법의 필요성을 검토코자 성장조절물질 IBA, BA, GA 각 3mg/l 첨가한 MS배지에 CO₂(2500ppm)를 강제 통기방식에 의해 기내에 처리하여 기관분화 유형별로 특성을 조사하였던 바 결과를 요약하면 다음과 같다.

저장종자의 분화능은 저온처리 60일 종자에서 적출한 배에 비하여 80일 정도 저온처리한 성숙된 배의 자엽조직이 양호하였다. 기관발생 유형에서 CO₂처리 효과는 부정아 형성보다 shoot primordium의 성장과 발달에 현저한 효과가 있었고 1개의 배로부터 shoot primordium을 통해 수백 개의 신초분화가 가능하였다.

배발생 유형에서 CO₂처리는 무처리에 비해 indirect somatic embryo와 direct somatic embryo 분화 모두에 효과가 있었다. Indirect somatic embryo는 대체로 유관속 중심주와 상배축이 미분화된 관계로 신초가 분화 성장하지 못하였다. 그리고 direct somatic embryo는 자엽 이면의 하단부에서 분화 발달하였고 지상부와 지하부 그리고 잠아를 갖는 완전한 식물체로 성장하였다.

LITERATURE CITED

- Alexander A., R. Cheetham and P. Weathers. 1992. Carbon dioxide improves the growth of hairy roots cultured on solid medium and in nutrient mist. Appl Microbiol Biotechnol 37 : 463-467.
- Aoki M., I. Horiguchi, C. Itoh, G. Yang, T. Harata, and T. Yakuwa. 1992. Development of an aseptic plant tissue culture vessel system enabling ventilation air composition control and addition of nutrient solution. J. Agr. Met 48(1) : 29 - 37.
- Arya S., I. Arya and T. Erikson. 1993. Rapid multiplication of adventitious somatic embryos of *Panax ginseng*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34 : 157-162.
- Asaka I., I. Yoshikawa, T. Hirotoni and T. Furuya. 1993. Embryoid formation by high temperature treatment from multiple shoots of *Panax ginseng*. Planta Med. 59(4) : 293-390.
- Cellarova E., M. Rychlova and E. Vranova. 1992. Histological characterization of in vitro regenerated structures of *Panax ginseng*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 30 : 165-170.

- Choi Y. E. and W. Y. Soh. 1994. Origin of direct somatic embryos from cultured cotyledon segments of Korean ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). Korean J. Plant Tissue Culture. 21 (3) : 177 - 182.
- Chung C. M. 1992. Studies on callus induction and organ differentiation in *in vitro* embryo culture of Korean ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). Doctor, s Thesis of Chungnam National University
- Chung C. M., J. Y. Kang and J. S. Jo. 1995a Histomorphological characteristics in organ differentiation from embryo culture of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). Korean J. Breed. 27 (3) : 284 - 289.
- Chung C. M., Y. Y. Chung and J. S. Jo. 1995b Characteristics of *in vitro* flower emergence in embryo culture of *Panax ginseng* C. A. Meyer. Korean J. Breed. 27 (4) : 398-405.
- Conger B. V., G. E. Hanning, D. J. Gray and J. K. Mcdaniel. 1983. Direct embryogenesis from mesophyll cells of Orchardgrass. Science 221 : 850-851.
- Kozai T., Y. Koyama and I. Watanabe. 1988. Multiplication of potato plantlets *in vitro* with sugar free medium under photosynthesis photon flux. Acta Horticulture 230 : 121-127.
- Kozai T., C. Kubota, and I. Watanabe. 1988. Effects of basal medium composition on the growth of carnation plantlets in auto- and mixo-trophic tissue culture. Acta Horticulture 230 : 159-166.
- Lim B., Y. Hew, S. Wong and C. Hew. 1992. Effects of light intensity, sugar and CO₂ concentration on growth and mineral uptake of dendrobium plantlets. J. Horticultural Sci. 67 (5) : 601-611.
- Pedroso M. C. and M. S. Pais. 1993. Direct embryo formation in levels of *Camillia japonica* L. Plant Cell Report 12 : 639-643.
- Ribo D. and J. Danielle. 1993. *In vitro* hardening of red raspberry by CO₂ enrichment and reduced medium sucrose concentration. HortScience 28 (10) : 1048-1051.
- Ulrich G., G. Franziska and B. Ludwig. 1993. The influence of sucrose and an elevated CO₂ concentration on photosynthesis of photoautotrophic peanut (*Arachis hypogaea* L.) cell culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33 : 143-150.