

인삼 캘러스 현탁배양에 있어서의 염색체 이상

박종범

신라대학교 생물학과

(2006년 7월 19일 접수; 2006년 12월 1일 채택)

Chromosome Aberration in Suspension Culture of Ginseng(*Panax ginseng* C. A. Meyer) Callus

Jong-Bum Park

Department of Biological Sciences, Silla University, Busan 617-736, Korea

(Manuscript received 19 July, 2006; accepted 1 December, 2006)

This study was to examine the variations of chromosome number and the ranges of variety in the suspension culture of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) callus cell, and the effect of plant hormones for the chromosome aberration. Plant hormones added with MS medium in the suspension culture were 2,4-D, kinetin, and 2,4-D+kinetin and concentration of the plant hormones were 1000 μ M, 10 μ M and 0.1 μ M respectively. As a result of these experiment the following conclusion has been obtained. Media contained with 2,4-D+kinetin in 10 μ M concentration was very effective in the suspension culture result from 26.4% mitosis frequency, and found the various variation of chromosome number. Variety of chromosome number was diversified (9~110), especially frequency of hypohaploid and hyperhaploid cells were very higher than hyperdiploid cells. In this experiments, it is suggested that 10 μ M 2,4-D+kinetin added with medium in the suspension culture of ginseng callus was effect in the variations of chromosome number.

Key Words : Chromosome aberration, Suspension culture, Ginseng, Callus

1. 서론

In Vitro에서 배양된 식물세포는 염색체 수나 구조의 차이가 나타난다는 것이 여러 연구자들에 의하여 보고되어 있다¹⁻⁵⁾. 특히 Partnen¹⁾은 현탁배양의 방법이 핵 이상에 상당한 연관이 있는 것으로 보고하였다. Torrey⁶⁾와 Venketeswaran⁷⁾ 등은 배양된 식물조직에서의 염색체 수의 차이는 인위적인 배지, 특히 생장물질과 핵산을 포함하고 있는 배지에 의하여 일어난다고 보고하였고, Mitra와 Steward⁸⁾는 coconut milk를 첨가한 배지에서 현탁배양된 *Haplopappus* 세포에서 염색체 이상을 관찰하였다. Torrey 등⁹⁾도 완두 캘러스 조직의 현탁배양에서 염색체 수의 변이를 관찰하였으며, Heinz 등¹⁰⁾도 액체 배지에서 현탁배양된 사탕수수 세포에서 이수체를

많이 관찰하였다. 또한 DeTorok과 White¹¹⁾도 *Picea glauca* (2n=22)의 wood tumor를 오랜 기간 동안 배양하면 그 염색체 수는 3~70개 사이의 커다란 변이 폭을 나타냈고, Nishiyama와 Taira¹²⁾도 역시 담배 (2n=48)의 수 조직을 조직배양했을 때 4개월 후에 배양세포의 염색체수는 25~192개로 다양했으며, 대부분 이수체였음을 보고하였다. Kao 등⁴⁾은 *Triticum* 2종, *Glycine max*, *Meililotus alba*, *Haplopappus gracilis*를 현탁배양하는 동안 염색체 변이가 일어나는가를 조사하여 *H. gracilis*를 제외한 모든 배양 조직에서 염색체 수의 변화를 관찰하였으며, Singh와 Harvey¹³⁾는 한천배지와 액체배지에서 배양된 *H. gracilis* 세포에서 염색체 수의 변이를 관찰, 보고하였다. 이상의 연구들 이외에도 많은 학자들이 각기 다른 실험재료를 사용하여 식물조직의 현탁배양에서 관찰된 핵 이상을 보고한 바 있다^{14,15)}.

고려인삼의 세포학적 연구는 1935년 Morinaga에 의하여 화분모세포의 염색체 수가 n=24임이 최초로

Corresponding Author : Jong-Bum Park, Department of Biological Sciences, Silla University, Busan 617-736, Korea
Phone: +82-51-999-5472
E-mail: jbpark@silla.ac.kr

보고되었고, 그 후 Takenaka¹⁶⁾도 역시 같은 결과를 보고하였다. Lee와 Hong¹⁷⁾은 인삼의 체세포에서 염색체 수가 2n=48임을 재확인하였고, 인삼 핵형도 작성하였으며 성장물질, X-선 및 colchicine처리를 하였을 때 나타나는 염색체 이상을 조사하여 보고하였다.

본 연구는 이러한 연구 결과들을 바탕으로 하여 인삼 캘러스조직을 현탁배양하였을 때 나타나는 염색체의 수적 변이에 식물 호르몬이 어떠한 영향을 끼치며, 또 염색체 이상의 변이 폭이 어느 정도 다양한가를 조사하기 위하여 실시하였다.

2. 실험재료 및 방법

김포 삼포에서 채취한 4~5년생 인삼의 뇌두를 Lee와 Hong¹⁸⁾의 방법에 의하여 조직배양하여 수집된 캘러스 세포를 무균조작으로 떼어내어 MS 기본 배지에 2,4-D, kinetin 및 2,4-D와 kinetin을 혼합한 용액을 각각 0.1 μM, 10 μM, 1000 μM 농도로 첨가시킨 배양액에 넣고, 진탕배양기에서 60 RPM으로 진탕시키면서 현탁배양하였다. 모든 배지는 15 lb.에서 20분간 고압 멸균시켰으며 25±1°C로 조절된 항온항습기내에서 2주 간격으로 계대배양하였다.

이렇게 약 4주간 현탁배양된 캘러스 세포를 0.2% colchicine과 0.002 M 8-hydroxyquinoline을 1:1로 혼합한 용액에서 3시간 처리하여 Carnoy용액으로 고정하였다. 고정된 세포를 60°C 1 N HCl에서 약 7~8분간 가수분해한 후 Feulgen시약으로 3시간동안 염색하였다. 그 후 0.5% pectinase와 0.5% cellulase를 1:1로 혼합한 용액에서 2시간 처리하고, aceto-lacto-orcein으로 약 10분간 염색한 후 cover slip하여 손톱으로 적절히 도말하여 검경하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 식물호르몬에 따른 유사분열상 빈도

인삼 캘러스 세포를 3가지 종류의 식물호르몬이 각각 다른 농도로 첨가된 배지에서 현탁배양하여 관찰된 유사분열상의 빈도를 측정한 결과, 2,4-D와 kinetin을 혼합하여 첨가한 배지에서 캘러스 세포의 유사분열상 빈도가 대체로 높게 나타났으며, kinetin을 첨가한 배지에서는 낮게 나타났다. 2,4-D를 첨가한 배지에서의 유사분열상 빈도는 2,4-D와 kinetin을 혼합하여 첨가한 배지와 kinetin을 첨가한 배지의 중간정도로 나타났다(Fig. 1). 일반적으로 인삼으로부터 캘러스조직을 유도하고 배양하는데에는 10 μM 농도의 2,4-D와 kinetin을 혼합한 식물호르몬을 첨가한 한천배지가 적절한 배지임이 보고¹⁸⁾되어 있는데, 본 실험에서도 2,4-D와 kinetin을 혼합하여 첨가한 배지가 현탁배양에서도 효과적이었음을 알 수

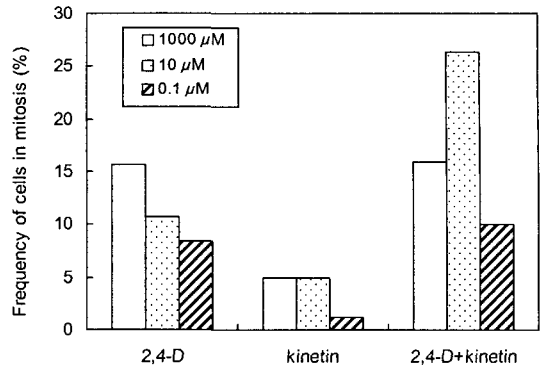


Fig. 1. Frequency of cells in mitosis of Korean ginseng in the cell suspension culture.

있었다. 본 실험에서는 kinetin을 첨가한 배지에서 현탁배양된 인삼 캘러스 세포가 낮은 유사분열상의 빈도를 나타내고 있는데, Masuda¹⁹⁾는 *Jerusalem artichoke*에서 kinetin (1 ppm) 단독처리하는 세포분열에 별로 효과가 없었음을 보고하였다. Ogura²⁰⁾도 담배의 배양에서 kinetin (10 mg/L) 단독처리하는 세포분열상의 빈도가 낮아서 캘러스 생장이 저해되었음을 보고하였으며 그 외 여러 연구자들도 이와 유사한 연구 결과를 보고하였는데,^{21,22)} 본 실험 결과와 일치하는 것으로 생각된다.

1000 μM 농도에서 각 식물호르몬에 대한 염색체의 수적 변이의 분산을 살펴보면, 2,4-D를 첨가한 배지에서 염색체 수의 변이 폭이 가장 넓게 나타났고 세포 수도 많이 관찰되었다. 다음으로 2,4-D와 kinetin을 혼합하여 첨가한 배지이며, kinetin을 첨가한 배지에서는 염색체 수의 변이 폭이 좁게 나타났고 관찰된 세포수도 적게 나타났다(Fig. 2). 10 μM 농도에서도 역시 2,4-D를 첨가한 배지에서는 염색체의 수적 변이 폭이 가장 넓으나 관찰된 세포 수는

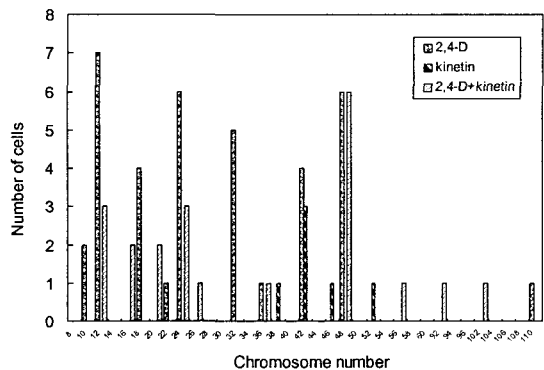


Fig. 2. Variation of chromosome number at 1000 μM concentration of various plant hormones.

많지 않았다. 대신 2,4-D와 kinetin을 혼합하여 첨가한 배지에서는 염색체의 수적 변이 폭이 2,4-D를 첨가한 배지에서보다 좁아졌으나 세포 수는 압도적으로 많이 관찰되었다(Fig. 3). 0.1 μM 농도에서는 10 μM 농도나 1000 μM 농도에서 보다 3종류의 배지 모두에서 염색체의 수적 변이 폭이 비교적 좁으며 세포 수도 적게 관찰되었다. 그러나 0.1 μM 농도에서도 2,4-D를 첨가한 배지에서 염색체의 수적 변이 폭이 kinetin을 첨가한 배지나 2,4-D와 kinetin을 혼합하여 첨가한 배지에 비해 넓게 나타났으며 세포 수도 많이 관찰되었다(Fig. 4).

상기한 결과로 미루어보아 1000 μM 농도의 2,4-D 첨가배지에서 염색체의 수적변이가 크다는 것을 알 수 있었다. Prasad와 Das²²⁾는 *Vicia faba*의 근단에 여러 가지 생장물질(gibberellic acid, 2,4-D, indol-butyric acid)을 처리하였을 때 2,4-D는 그 농도와 처리기간이 증가함에 따라 염색체 이상이 증가하였음을 보고한바 있는데, 본 실험의 결과도 이와 비슷하다. 일반적으로 10 μM 농도의 2,4-D와

kinetin이 대부분 식물의 조직배양에서 켈러스 유도 및 배양에 적절한 농도로 알려져 있는데, 본 실험 결과에서도 10 μM 농도의 2,4-D와 kinetin이 첨가된 액체배지가 현탁배양에서도 가장 효과적인 배지임을 알 수 있었다. 그런데 식물 호르몬이 저농도(0.1 μM)일 때는 현탁배양에 있어서 세포분열상도 적고, 염색체 수의 변이 폭도 좁았다. 따라서 식물 호르몬 중에서도 특히 2,4-D가 고농도(1000 μM)일 때는 현탁배양에 있어서 세포분열상의 빈도도 약간 높고 염색체 수 이상의 폭도 넓었다. 반면 적절한 농도(10 μM)에서는 2,4-D와 kinetin을 혼합하여 첨가한 배지에서 세포분열상의 빈도가 가장 높았으나 염색체 수 이상의 폭은 좁았으며, 식물 호르몬이 저농도(0.1 μM)일 때는 세포분열상의 빈도도 적고 염색체 수 이상의 폭도 좁았음을 본 실험에서 알 수 있었다.

3.2. 현탁배양에 있어서의 염색체 수의 변이

본 실험에서 관찰된 염색체 수를 살펴보면, 정상적인 인삼 체세포의 염색체 수인 48개의 배수체가 관찰된 세포는 10 μM 농도의 2,4-D와 kinetin을 혼합하여 첨가한 배지에서 11개 세포로 가장 많이 관찰되었고, 1000 μM 농도의 2,4-D와 kinetin을 혼합하여 첨가한 배지와 1000 μM 농도의 2,4-D를 첨가한 배지에서 각각 6개 세포가 관찰되었다(Fig. 2, 3, 4). 염색체 수가 24개인 반수체가 관찰된 세포도 10 μM 농도의 2,4-D와 kinetin을 혼합하여 첨가한 배지에서 7개가 관찰되었고, 다음으로 1000 μM 농도의 2,4-D를 첨가한 배지에서 6개 세포가 관찰되었다(Fig. 2, 3, 4). 본 실험에서 가장 특징적인 현상은 염색체 수가 12개인 1/2 반수체가 나타난 세포가 많이 관찰된 것인데, 이러한 1/2 반수체 세포도 1000 μM 농도의 2,4-D를 첨가배지에서 7개 세포가 관찰되었고, 다음으로는 10 μM 농도의 2,4-D와 kinetin을 혼합하여 첨가한 배지에서 6개가 관찰되었다(Fig. 2, 3, 4). 이러한 실험 결과는 배수체, 반수체 및 1/2 반수체 세포가 많이 관찰된 배지에 첨가된 식물호르몬과 농도가 거의 유사함을 나타내고 있다. 또한 염색체 수가 24개인 반수체와 48개인 이배체 및 12개인 1/2 반수체 등과 같은 배수체성 세포들 이외에도 다른 여러 가지 이수체성 세포들이 무방향성으로 분산되어 나타나고 있음이 관찰되었다(Fig. 2, 3, 4). 그런데 배수체는 3가지 농도의 2,4-D와 kinetin을 혼합하여 첨가한 모든 배지와 1000 μM 농도의 2,4-D를 첨가한 배지에서 많이 관찰되는데 반하여 반수체나 1/2 반수체는 거의 대부분의 모든 배지에서 관찰되고 있음이 특징적이다. 따라서 본 실험에 사용한 대부분의 배지에서 염색체 수가 hyperdiploid세포보다 hypohaploid세포와 hy-

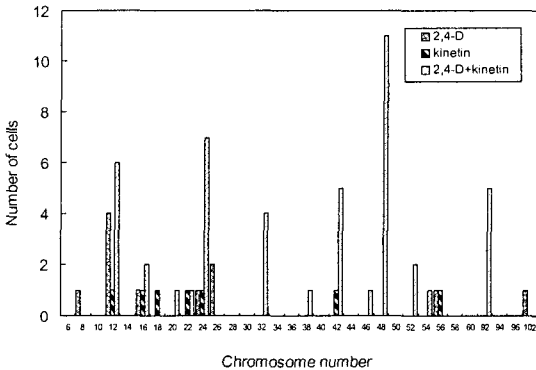


Fig. 3. Variation of chromosome number at 10 μM concentration of various plant hormones.

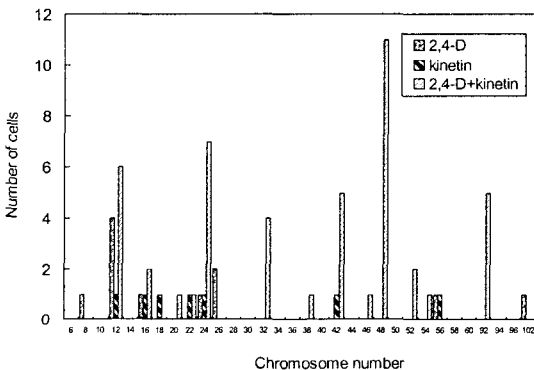


Fig. 4. Variation of chromosome number at 0.1 μM concentration of various plant hormones.

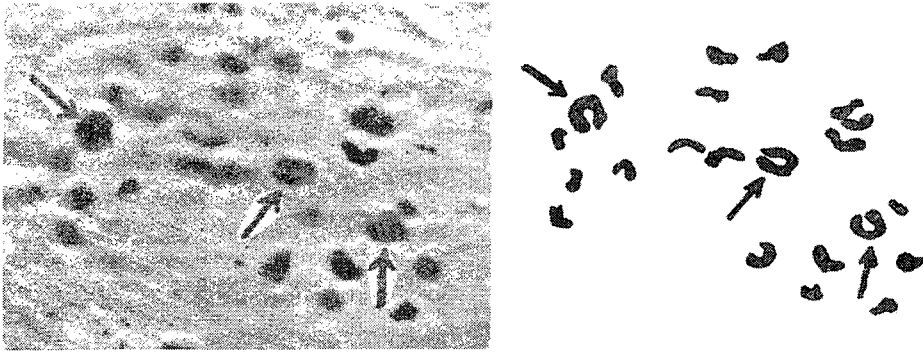


Fig. 5. Haploid, 24 chromosomes with ring chromosome (indicated by arrows). A; Photomicrographs of smear figures(x 500), B; Camera-lucida reproductions of smear figures of photomicrographs.

perhaploid세포의 출현빈도가 훨씬 높다는 것을 알 수 있었다(Fig. 2, 3, 4). 여러 종류의 배지에서 현탁 배양된 인삼 캘러스 세포에서 관찰된 염색체 수는 8 개에서부터 110개로 폭넓게 분산되어 있는데, Lee와 Hong¹⁷⁾은 한천을 첨가한 고행배지에서 배양된 인삼 캘러스 세포의 염색체 수가 24개에서부터 102개로 분산되어 나타났고, hyperhaploid세포보다 hyperdiploid세포와 tetraploid세포가 훨씬 많이 관찰되었음을 보고하였다. 따라서 본 실험 결과 현탁배양에서의 염색체 수적 변이는 한천 고행배지에서 보다 변이 폭이 훨씬 다양하고 다배수체 세포의 출현 빈도는 감소하였음을 알 수 있었다. Singh과 Harvey¹³⁾는 *Haplopappus gracilis*를 실험재료로 사용하여 한천배지와 액체배지에서 조직배양하였을 때, 한천배지에서는 시간이 경과함에 따라 다배수체 세포의 출현 빈도가 증가하였으나 현탁배양에서는 감소하였음을 보고하였는데, 본 실험 결과도 이와 일치하는 것으로 생각된다.

3.3. 염색체 이상의 유도 기작

식물 조직배양에서 염색체 변이를 일으키는 기작에는 Venketeswaran⁷⁾, Vig²³⁾, Prasad and Das²²⁾ 등 여러 연구자들이 보고한 바 있는 chromosome bridge, chromosome fragment, dicentric chromosome, ring chromosome, lagging chromosome 등의 현상이 있는데 본 실험에서는 다만 dicentric chromosome과 ring chromosome (Fig. 5)만이 관찰되었다. 이러한 실험 결과는 인삼 캘러스 조직의 현탁배양에서 염색체 변이를 일으키는 기작은 dicentric chromosome과 ring chromosome이 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

4. 결 론

본 연구는 인삼 캘러스조직의 현탁배양에서 나타

나는 염색체의 수적 변이와 그 변이의 폭을 관찰하고, 배지에 첨가한 식물 호르몬 및 농도가 염색체 이상에 미치는 영향을 조사하였다. 인삼 캘러스 조직의 현탁배양에 사용한 액체배지에 첨가한 식물 호르몬은 2,4-D, kinetin, 2,4-D와 kinetin을 혼합한 것이며, 이들을 각각 1000 μ M, 10 μ M, 0.1 μ M의 농도별로 첨가한 MS배지를 현탁배양 배지로 사용하였다. 본 실험 결과 10 μ M 농도의 2,4-D와 kinetin을 혼합하여 첨가한 배지에서 세포의 유사분열 빈도가 26.4%로 가장 높게 나타나 이 배지가 현탁배양에 가장 효과적인 배지임을 알 수 있었고, 염색체의 수적 변이도 다양하게 나타났다. 염색체 수는 9 개에서부터 110개까지 다양하였는데, 특히 염색체 수가 반수체인 24개보다 많거나 적은 hypohaploid세포와 hyperhaploid세포가 배수체인 48개보다 많은 hyperdiploid세포보다 훨씬 많이 관찰되었다. 이러한 연구 결과는 인삼 캘러스 조직을 현탁배양하였을 때 나타나는 염색체 수의 변이는 배지에 혼합하여 첨가한 10 μ M 2,4-D와 kinetin이 상당한 영향을 끼친 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Partanen, C. R., 1963, Plant tissue culture in relation to developmental cytology, Intern. Rev. Cytol., 15, 215-243.
- 2) Murashige, T. and R. Nakano, 1967, Chromosome complement as a determinant of the morphogenic potential of tobacco cells, Amer. J. Bot., 54(8), 963-970.
- 3) Yazawa, S., 1967, Cytological and morphological observations on the callus tissue of *Crepis capillaris*, Bot. Mag., 80, 413-420.
- 4) Kao, K. N., R. A. Miller, O. L. Gamborg and

- B. L. Harvey, 1970, Variations in chromosome number and structure in plant cells grown in suspension culture, *Can. J. Genet. Cytol.*, 12, 297-301.
- 5) Sacristan, M. D., 1971, Karyotypic changes in callus cultures from haploid and diploid plants of *Crepis capillaris* Wallr., *Chromosoma*, 33, 273-283.
 - 6) Torrey, J. G., 1959, Experimental modification of development in the root, *Symp. Soc. Study Develop. Growth*, 17, 189-222.
 - 7) Venketeswaran, S., 1963, Tissue culture studies on *Vicia faba*, II. *Cytology, Caryologia*, 16, 91-100.
 - 8) Mitra, J. and F. C. Steward, 1961, Growth induction in cultures of *Haploppus gracilis*, II. The behaviour of the nucleus, *Amer. J. Bot.*, 48, 358-368.
 - 9) Torrey, J. G., J. Reinert and M. Merkel, 1962, Mitosis in suspension cultures of higher plant cells in a synthetic medium, *Amer. J. Bot.* 49, 420-425.
 - 10) Heinz, D. J., G. W. P. Mee and L. G. Nickell, 1969, Chromosome number of some *Saccharum* species hybrids and their cell suspension cultures, *Amer. J. Bot.*, 56(4), 450-456.
 - 11) DeTorok, D. and P. R. White, 1960, Cytological instability in tumor of *Picea glauca*, *Cytochem.*, 17, 266-272.
 - 12) Nishiyama, I. and T. Taira, 1966, The effect of kinetin and indol acetic acid on callus growth and organ formation in two species of *Nicotiana*, *Jap. J. Genetics.*, 41, 357-366.
 - 13) Singh, B. D. and B. L. Harvey, 1975, Cytogenetic studies on *Haplopappus gracilis* cells cultured on agar and in liquid media, *Cytologia*, 40, 347-354.
 - 14) Cooper, L. S., D. C. Cooper, A. C. Hildebrandt and A. J. Riker, 1964, Chromosome numbers in single cell clones of tobacco tissue, *Amer. J. Bot.*, 31, 284-190.
 - 15) Shimada, T. and M. Tabata, 1967, Chromosome numbers in cultured pith tissue of tobacco, *Jap. J. Genet.*, 42, 195-201.
 - 16) 竹中要(Y. Takenaka), 1937, 人蔘細胞の染色体に關よる研究, *朝鮮博物誌*, 22, 53-61.
 - 17) Lee, C. D. and S. S. Hong, 1980, Study on breeding of Korean ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer), *Sung Kyun Kwan Univesity Journal*, 27, 1-11.
 - 18) Lee, C. D. and S. S. Hong, 1978, Studies on callus cultures of medical plant in vitro, II. On the callus culture of *Panax ginseng* C. A. Meyer, *Sung Kyun Kwan Univesity Journal Natural Science*, 6, 5-11.
 - 19) Masuda, Y., 1965, RNA in relation to the effect of auxin, kinetin and gibberellic acid on the tuber tissue of Jerusalem artichoke, *Physiol. Plant.*, 18, 15-22.
 - 20) Ogura, H., 1975, Morphactin-kinetin interaction on growth and shoot formation in tobacco callus cultures, *Plant Physiol.*, 16, 563-569.
 - 21) Torrey, J. G., 1961, Kinetin as trigger for mitosis in mature endomitotic plant cells, *Exper. Cell Res.*, 23, 281-299.
 - 22) Prasad, G. and K. Das, 1977, Effects of some growth substances on mitosis, *Cytologia*, 42, 323-329.
 - 23) Vig, B. K., 1969, Relationship between mitotic events and leaf spotting in *Glycine max*, *Can. J. Genet. Cytol.*, 11, 147-152.