식물학회지 제36권 제1호 (1993)
Korean J. Bot. 36(1) : 75~81

# *Agrobacterium rhizogenes*에 의하여 형질전환된 인삼 모상근의 세포 유전학적 및 조직학적 특성

高 庚 珉·宋 在 眞*·黃 稻·康 榮 羲*
(전남대학교 생물학과, *연세대학교 생물학과)

# Cytogenetic and Histological Characteristics of Ginseng Hairy Root Transformed by *Agrobacterium rhizogenes*

**Ko, Kyeong Min, Jae Jin Song*, Baik Hwang and Young Hee Kang***
(*Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju and *Department of Biology, Yonsei University, Seoul*)

**ABSTRACT**

Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) hairy root transformed with *Agrobacterium rhizogenes* (strain $A_4$) was examined cytogenetically and histologically to assess its characteristics. The optimum growth of hairy root obtained in hormone-free MS medium (sucrose 30 g/L, pH 5-6) for long period cultures. All hairy root strains (HB1, HB2, HB3) had the 2n diploid number (2n=48) of chromosomes in root tip cells. There were no alteration in chromosome structure except in one cell of HB3 strain. Results of SDS-PAGE showed a few difference in pattern and number of bands between normal and hairy root of ginseng. The root anatomy of normal root and hairy root differed each other. The hairy root had a clearly defined vascular strand, and the morphology of cortical cells were disorganised with large intercellular spaces.

## 서 론

식물의 조직배양 과정에서 나타나는 체세포 변이(somaclonal variation)가 식물의 육종과 개량을 위해 몇몇 식물에서 유용하게 사용되기 시작한 이래 (Larkin and Scowcroft, 1981), 배양세포및 재분화 식물체에서 염색체의 수적, 구조적인 변이가 감자(Karp, 1988), 담배(Kim and Kim, 1987; Woo *et al*., 1990), 밀(Bang, 1990), 쪽파(Seo *et al*., 1988; Kim *et al*., 1990) 등을 포함한 여러 식물에서 나타나고 있다. 배양된 세포에서 나타나는 체세포 변이의 가장 큰 원인은 genome의 불안정성에 따른 것으로 여겨지고 있는데, 이는 배양세포가 정상의 기능을 가지는 완전한 식물체에서 분리되어 배지라는 비자연적인 환경하에서 배양되기 때문에 나타나는 현상으로 보고 있다(Sunderland, 1977). 또한 배양 과정에서의 유전자의 증폭, 재배열, MCO (mitotic crossing over)에 의한 자매 염색분체간의 교환, DNA의 methylation, 돌연변이에 따른 특정 유전자의 활성화 등이 영향을 주는 것으로 보고되고 있다(Scowcroft *et al*., 1987).

이러한 체세포군 변이를 응용하여 식물의 유전육종학 연구에 이용한 예는 사탕수수에서 시작하였는데(Heinz *et al*., 1969; Heinz and Mee, 1971), 우량형질을 지닌 개체를 선발하여 작물의 개량에 이용할 목적이었으며, 최근들어서는 상업적으로 2차 대사산물(carotenoid, shikonin, scopolamine 등)의 생산에 이용하고 있다(Kim and Yu, 1991; Jung *et al*, 1991). 그러나 세포배양은 변이가 우발적이며, 재현성이 낮고, 우량형질 선발 체계의 개발 미진 등 여러 가지 문제점들이 지적되고 있다. 따라서 세포배양에 비하여 유전적으로 안정하고, 재어가 용이하며, 생장속도가 빠른

본 연구는 1992년도 연세대학교 학술연구비에 의하여 수행되었습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

형질 전환된 기관을 이용하면 특정 형질의 지속적 보존에 의한 기내 동종 clone의 번식, 식물 육종, 2차 대사산물의 안정적 공급 등에 있어서 매우 유리하다.

*Agrobacterium rhizogenes*가 감염된 조직은 숙주식물의 genome내로 Ri-pasmid의 T-DNA가 도입되어 감염 부위에서 형질이 전환된 뿌리(모상근)를 만들어 내게 된다 (Beach and Gresshoff, 1988). 이러한 모상근은 외부에서 식물호르몬의 공급이 없이도 활발하게 생장하며, 어떤 식물종에 있어서는 개체의 분화가 자발적으로 또는 적절한 생장 호르몬의 첨가에 의해 일어난다(Ramsay and Kumar, 1990). 또한 모상근은 굴지성 반응을 보이지 않으며, opine (mannopine, agropine 등)이라는 특이한 아미노산 유도체를 합성하여 이러한 특징에 의해 쉽게 형질전환 여부를 확인할 수 있으며(Guellec *et al.*, 1990), 모상근 세포는 유전학적으로 매우 안정하기 때문에(Aird *et al.*, 1988) 특정 대사경로의 조작과 같은 연구에 있어서 매우 매력적이다. 그러나 만일 유도된 모상근이 배양과정에서 비정상적 현상을 야기 한다면 생리, 생화학적 연구에 있어서 모상근의 이용은 문제가 될 수 있다. 따라서 모상근의 기본 특징을 규명하여 정상조직과의 비교 연구가 선행되어야 한다. 또한 식물체에 따라서 이러한 현상은 약간의 차이를 보여 줄 수 있으므로 경제적으로 중요한 식물체의 선정이 우선 고려되어야 한다.

본 연구에서는 의약품, 식품, 화장품 등에 있어서 널리 사용되고 있는 고려 인삼을 이용하여 인삼의 각 부위에 *A. rhizogenes*를 감염시켜 모상근을 유도시키고, 이와 같은 모상근을 기내에서 배양하는데 있어 최적 배양 조건을 찾고, 유전적 안정성을 염색체의 수와 구조분석으로 검토하였다. 또한 모상근 조직의 특징을 정상조직과 비교하였다.

## 재료 및 방법

**모상근의 유도.** 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 종자, 줄기, 뿌리로부터 모상근을 유도하기 위하여 다음과 같은 세 가지 방법을 사용하였다. 1). 종자의 과피를 제거하고 70%(v/v) 에탄올로 5분, 7%(v/v) NaOCl 용액으로 15분간 표면 살균한 후 무균적으로 배(embryo)를 절취하여 날카로운 칼으로 상처를 주고, 48시간 배양한 *Agrobacterium rhizogenes* $A_4$ strain 현탁액과 48~72시간 co-culture하여 모상근을 유도하였다. 2). 1)의 방법으로 절취한 배를 배 배양 배지(1 mg/L의 2,4-D와 0.01 mg/L의 kinetin을 조합한 MS 배지)로 옮겨 캘러스를 유도하고, 이를 재분화 배지(1 mg/L의 BA와 1 mg/L의 $GA_3$를 첨가한 1/2 MS 배지)로 옮겨 캘러스로부터 재분화 식물체를 유도한 후 이 식물체의 줄기 부위에 direct infection 방법으로 균을 접종하고 또한 줄기를 1~1.5 cm로 잘라 균 현탁액과 co-culture하여 모상근을 유도하였다. 3). 인삼 재배지역에서 자경종 수삼(5 년근)을 구입하여 70%(v/v) 에탄올로 10분, 7%(v/v) NaOCl 용액으로 18분간 표면 살균한 후 1~2 cm 두께로 잘라 그 자른 면위에 균 현탁액을 접종시켜 모상근을 유도하였다.

**모상근의 배양.** 위의 조건에서 유도된 각각의 모상근을 조직으로부터 채취해 내어 carbenicillin, vancomycin 등의 항생제가 들어 있는 호르몬 무첨가 MS(MSO) 고형배지로 옮겨 균을 제거한 다음, 항생제가 들어 있지 않은 동일한 배지로 옮겨 30~60일간 배양하였다. 아울러 생장이 활발한 모상근을 선별하여 동일한 액체 배지로 옮겨 회전진탕기(50 rpm)에서 암배양(26℃) 하였다.

**호르몬 첨가에 의한 모상근의 생장 효과.** 식물 호르몬인 IBA, NAA, kinetin의 첨가가 모상근의 생장에 미치는 효과를 알아보기 위하여 MSO 액체배지 (sucrose 30 g/L, pH 5.8)에서 생장하고 있는 모상근 1 g(생중량)을 0, 0.5, 1, 2 mg/L의 IBA와 0, 0.5 mg/L의 kinetin을 조합하여 첨가한 배지, 0, 0.5, 2, 4 mg/L의 NAA와 0, 0.5 mg/L의 kinetin을 조합하여 첨가한 배지로 옮긴 후 30일 동안 암소에서 배양하면서 10일 간격으로 모상근의 생장율을 측정하였다.

**염색체의 수 및 구조적 변이 조사.** MSO 액체 배지에서 활발하게 생장하는 모상근의 근단을 채취하여 Choi와 Bang(1990)의 방법에 따라 염색체 분석을 수행하였다. 즉 새로운 배지 첨가 후 3~4일이 경과하면 바로 근단을 채취하여 염색체 관찰을 위해 1-bromonaphthalene 포화수용액에서 5~6시간 전처리한 다음 acetic acid-alcohol(1 : 3) 용액에서 24시간 고정하여 냉장고에 넣어 보관하면서 재료로 사용하였다. 고정시킨 근단을 1 N HCl(60℃)에서 5분간 해리한 후 Feulgen 염색액을 이용하여 압착법으로 프레파라아트를 제작 하였으며, 각 모상근 strain에서 10개 이상의 세포로부터 염색체를 관찰하여 염색체의 수 및 구조적 변이를 분석하였다. 또한 염색체의 배열은 Levans 등(1964)의 방법에 따라 염색체상의 동원체의 위치로 분류하여 길이가 긴 것으로부터 짧은 순으로 정리하였다.

**단백질 양상 분석.** SDS-PAGE는 Laemmli(1970)의 방법을 변형한 9~12% linear gradient gel을 사용하였으며, 전기영동 시료는 5년근 수삼과 인삼 캘러스, 그리고 모상근의 동결 건조 시료 2 g씩을 사용하였다. 단백질 추출 완충용액 조성은 6.25 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluroride(PMSF, Sigma)이며, 25 mA로 약 5시간 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel은 0.25% Coomassie brilliant blue R-250(Sigma)이 용해된 염색 용액에서 2시간 염색한 후, 탈색용액(methanol : acetic acid, glacial : D.W = 4 : 1 : 5)으로 탈색하여 단백질 양상을 분석하였다. 이때 표준 단백질로는 bovine serum albumin(M.W. 66 kD), ova-

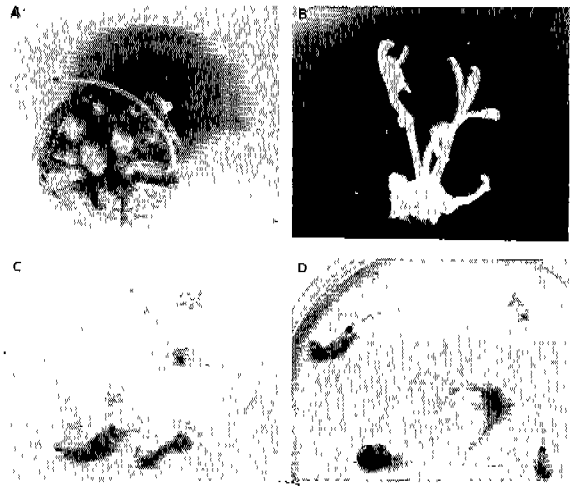


Fig. 1. Hairy root induced from root segment (A), stem (B), stem segment (C), and embryo (D) of ginseng.

lbumin(M.W. 45 kD), trypsinogen(M.W. 24 kD), β-lactoglobulin(M.W. 18.4 kD) 및 lysozyme(M.W. 14.3 kD)을 사용하였다.

**조직학적 분석.** 조직학적 분석을 위해 채취한 재료를 4% glutaraldehyde (0.2 M phosphate buffer, pH 7.4)에 넣어 4℃에서 3일 정도 고정하여, 5% 불화수소로 12시간 미리 염색한 후에 n-butanol로 탈수시켰다. Paraffin에 매몰된 재료들은 rotary microtome에서 10 μL의 두께로 section한 후, Meyer's hemalium 염색액으로 염색하여 영구조직 표본을 만들어 관찰 하였으며, 사용재료는 6개월 이상 배양된 성숙한 뿌리와 근단으로부터 2~3 mm 하단부위를 사용하여 비교하였다.

## 결과 및 고찰

**모상근의 배양.** 균 접종 후 배와 줄기로부터는 7-8주, 뿌리 절편으로부터는 12주가 경과하여 모상근이 유도 되었으며(Fig. 1), 이렇게 유도된 각각의 모상근 중 생장이 활발한 모상근을 MSO 액체배지에 배양하여, 뿌리로부터 유도된 모상근은 외부 형태와 생장 속도에 의해 HB1과 HB2로 구분하고(Hwang *et al.*, 1991) 줄기로부터 유도된 모상근은 HB3, 배로부터 유도된 모상근은 HB4 strain으로 구분하였다. 이중 HB3 strain은 근단을 제외한 모든 부위의 직경이 2-3 mm이며, 분지 형성능이 양호하여 HB1과 HB2 strain의 중간 형태를 보여 주었고(Fig. 2), 시간의 경과에 따른 모상근의 생장율은 HB1에 비하여 2.7배, HB2에 비하여 1.5배 증가하였다(Fig. 3).

**호르몬 첨가에 의한 모상근의 생장 효과.** Fig. 4는

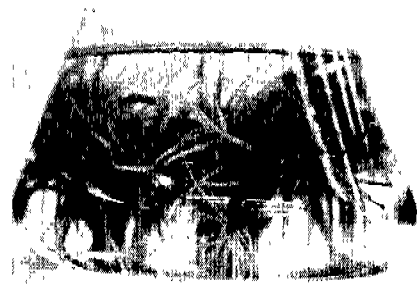

Fig. 2. Hairy root (HB3 strain) grown in hormone-free MS liquid medium.

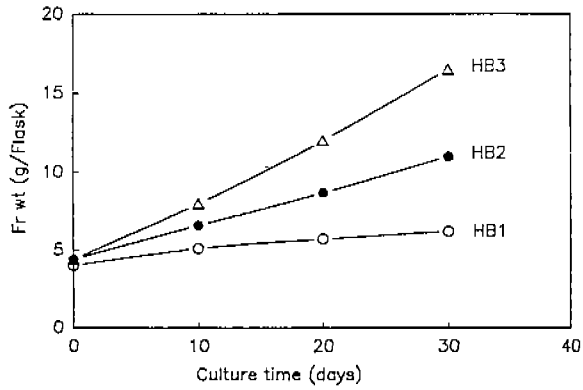


Fig. 3. Growth rate of three different hairy root strains in hormone-free MS liquid medium.

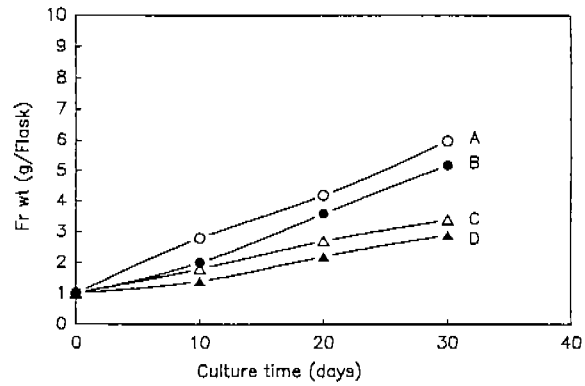


Fig. 4. Effects of IBA and kinetin combination on growth of hairy root in MS liquid medium. A, hormone-free; B, IBA 0.5, kinetin 0.5 mg/L; C, IBA 1, kinetin 0.5 mg/L; D, IBA 2, kinetin 0.5 mg/L.

IBA와 kinetin을 조합하여 모상근의 생장에 미치는 효과를 비교한 것으로, 30일 동안 배양한 결과 0.5 mg/L의 IBA와 0.5 mg/L의 kinetin을 조합한 배지에서 5.2 g(생중량)을 보

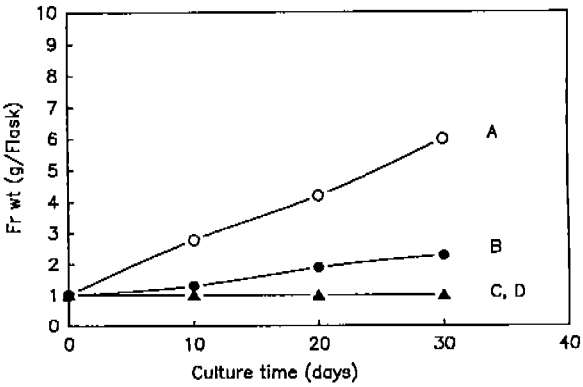


Fig. 5. Effects of NAA and kinetin combination on growth of hairy root in MS liquid medium. A, hormone-free; B, NAA 0.5, kinetin 0.5 mg/L; C, NAA 2, kinetin 0.5 mg/L; D, NAA 4, kinetin 0.5 mg/L.

여주어 생장율이 다른 농도보다 높았으나 호르몬 무첨가 배지에서 6 g(생중량)을 보여 생장률이 가장 높게 나타났다. 그리고 NAA와 kinetin을 조합하여 모상근의 생장에 미치는 효과를 비교한 결과(Fig. 5), 0.5 mg/L의 NAA와 0.5 mg/L의 kinetin을 조합한 배지에서 2.3 g(생중량)의 생장률을 보여주었고, 2 mg/L와 4 mg/L의 NAA 첨가 배지에서는 모상근의 생장을 관찰 할 수 없었다. 또한 IBA, NAA 농도를 단독으로 첨가 하였을 때는 0.5 mg/L의 IBA 첨가 배지에서 모상근의 초기 생장을 증가 시켰으나, 6개월 이상의 장기간 배양시 오히려 호르몬 무첨가 배지보다 더 낮은 생장률을 보였으며, NAA 첨가 배지에서는 생장률이 감소하였다(자료 미제시). Yoshikawa와 Furuya(1987)는 인삼 캘러스에서 유도된 모상근의 경우 2 mg/L의 IBA와 0.1 mg/L의 kinetin 첨가 배지에서 가장 높은 생장률을 보인다고 하였으며, Ko 등(1990)은 leaf disk 개량법으로 유도된 인삼 모상근의 생장률이 호르몬 무첨가 배지에서 가장 높다고 하였는데, 본 실험 결과는 초기 모상근의 배양시 0.5 mg/L의 IBA 첨가 배지가 호르몬 무첨가 배지보다 모상근의 높은 생장률을 보여 주지만 장기간 배양시 모상근의 생장률이 감소하여, 호르몬 무첨가 배지에서 모상근이 잘 분지하며 생장한다는 Ko 등(1990)의 결과와 유사하였다.

**염색체의 수 및 구조적 변이 조사.** 인삼의 염색체 수는 2n=48이며, 이중에서 대를 이룬 염색체는 23쌍(A-chromosome)이고 대를 이루지 못한것이 1쌍 (B-chromosome)으로 B-chromosome은 하나의 큰 염색체(a)와 작은 염색체(b)로 구성되어 있는데(Lee and Hong, 1980), 모상근 각각의 strain의 염색체 수는 2n=48로 확인되어 염색체 수에는 변화가 없었다(Fig. 6). 그리고 모두 23쌍의 A-chromosome과 1쌍의 B-chromosome을 가지고 있었다. 그러나,

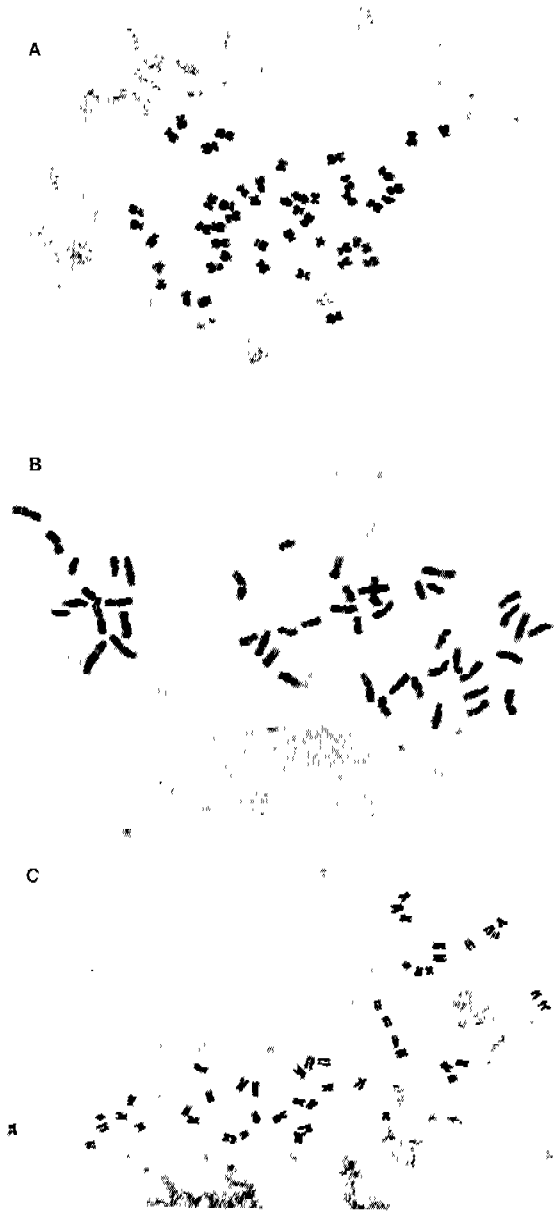


Fig. 6. Photomicrographs of somatic metaphase chromosomes of ginseng hairy root. A, HB1 strain; B, HB2 strain; C, HB3 strain.

HB3의 10개의 세포중 1개의 세포에서 B-chromosome이 관찰되지 않았으며, 이 경우에는 24쌍의 A-chromosome으로만 구성되어 있었다(Fig. 7). Aird 등(1988)은 서로 다른 7종의 식물로부터 유도한 모상근을 장기간 배양하여 세포학적 분석을 실시한 결과 염색체의 수와 구조적 변이가 전혀 관찰되지 않았다고 하였다. 그러나 Webb 등(1990)은

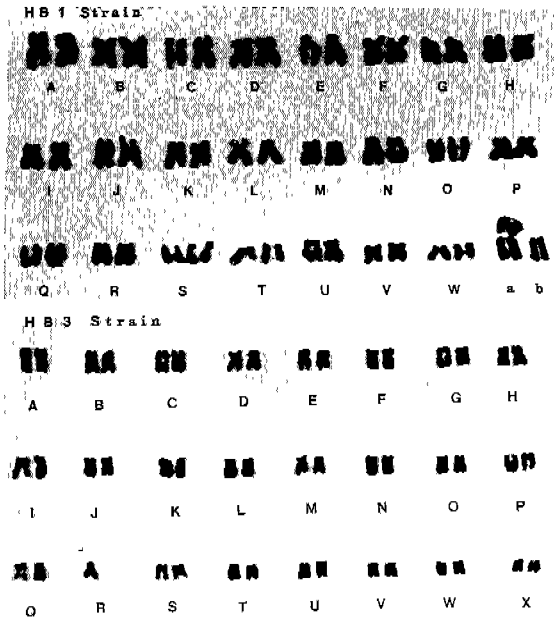


Fig. 7. Karyotypes of somatic metaphase chromosomes of ginseng hairy root (HB1, HB3 strain). A-W, A-chromosomes; a and b, B-chromosomes.

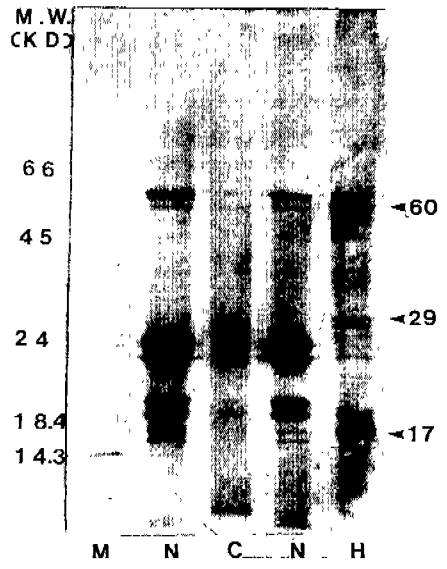


Fig. 8. Electrophoregrams of one dimensional gradient gel electrophoresis (9-12%, SDS-PAGE) in ginseng proteins. Lane M, marker protein; Lane N, 5-year old ginseng root; Lane C, ginseng callus; Lane H, hairy root (HB2).

*Trifolium prantense*의 모상근과 모상근으로부터 재분화된 *Lotus corniculatus*의 경우에서, Ramsay와 Kumar(1990)는 *Vicia faba*의 모상근의 경우에서 모식물체와는 다른 염색체의 수와 구조적 변이를 나타낸다고 하였는데, 본 실험의 결과는 Aird 등과 일치하여 , 장기간 배양된 모상근의 세포학적 안정성이 계속 유지됨을 알 수 있었다. 또한 HB3의 경우에 관찰된 B-chromosome 의 부재는 염색체의 구조적 재배열로 사료되며 추후에 유전적 성질이 규명되어야 할 것으로 안다.

**단백질 양상 분석.** Fig. 8은 모상근의 단백질 양상을 알아보기 위해 SDS-PAGE로 전기영동한 것이다. 각각의 분자량을 추정해 본 결과 5년근 수삼의 경우 24 kD와 22.5 kD의 단백질이 주밴드로, 62 kD, 20 kD, 19 kD의 단백질이 부밴드로 나타났다. 그러나 모상근의 경우에는 뚜렷하게 주밴드라 할 수 있는 밴드가 없었으며, 60 kD, 29 kD, 17 kD의 단백질이 부밴드로 나타나고 기타 미소밴드의 수가 모근에 비하여 다소 많았다. 또한 단백질의 함량은 모근과 모상근 모두에서 g당 약 11 mg으로 거의 비슷하였다.

**조직학적 분석.** 정상뿌리와 모상근(HB1, HB2 strain)의 조직학적 분석 결과, 근단으로부터 2~3 mm 하단 부위는 매우 유사한 세포배열 양상을 보여 주고 있었으며(Fig. 9), 성숙한 모상근의 뿌리구조는 정상뿌리와 다소 다르게

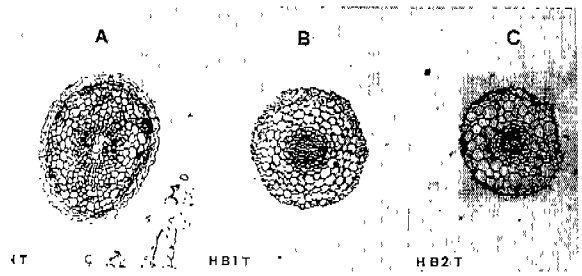


Fig. 9. Transverse section of 3-4 mm below region from ginseng root tip. A, native root; B, hairy root (HB1); C, hairy root (HB2). ×65.

나타났다. 즉 정상 뿌리의 세포들은 체계적인 유관속계와 분비구조를 가지며 피층 유세포의 크기가 작고 균일하게 배열되어 있으나 모상근은 제한된 영역의 유관속계와 피층과의 경계가 뚜렷하고 분비구조가 발달되어 있지 않으며, 피층 유세포들의 형태와 배열이 불균등하고 세포간극이 매우 크게 발달되어 있었다(Fig. 10).

모상근의 HB1과 HB2 strain의 비교에서는 HB1이 HB2에 비하여 더욱 분화되어 있었으며, 분지 양상은 정상 뿌리에서와 동일하였다(Fig. 11). Webb 등(1990)은 *Trifolium repens, Trifolium pratense, Lotus corniculatus*의 경우는

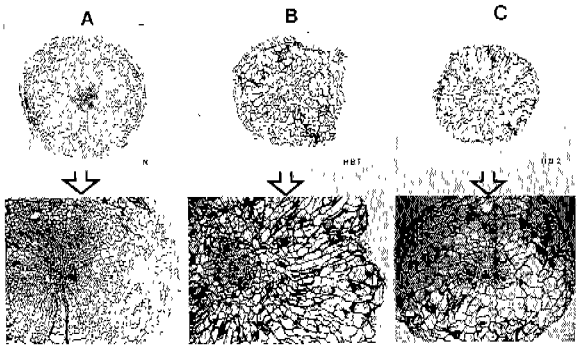


Fig. 10. Transverse section of mature ginseng root. A, native root; B, hairy root (HB1); C, hairy root (HB2). ×25(upper), ×65 (lower).

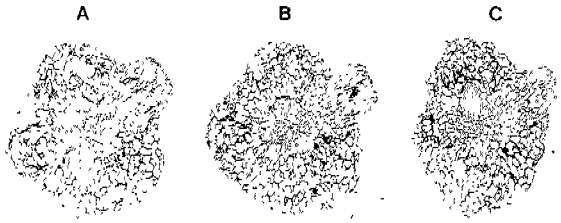


Fig. 11. Developmental stages of lateral branch formation in hairy root (HB2). A, during of lateral branch formation; B, finish of lateral branch formation; C, new premodia for another branching. ×25.

정상 뿌리와 모상근의 해부구조가 차이를 나타내며, *L. corniculatus*의 경우에는 유사한 구조를 보여준다고 하였는데, 본 실험 결과는 *T. repens, T. pratens*와 같은 양상으로서 식물 종에 따라서 정상 뿌리와 모상근 조직구조가 서로 차이가 남을 알 수 있었다.

## 적 요

*Agrobacterium rhizogenes*(strain $A_4$)에 의하여 형질전환된 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer) 모상근의 세포 유전 및 조직학적 특성들을 조사하였다. 모상근을 액체배지에서 장기간 배양 하였을 때, 모상근은 호르몬 무첨가 MS 배지(sucrose 30 g/L, pH 5-6)에서 최적 생장율을 나타내었으며, 근단세포의 염색체 수는 모든 모상근 strains(HB1, HB2, HB3)이 동일한 2n=48을 보유하고 있었다. 또한 HB3 strain 중 하나의 세포를 제외하고, 모상근에 있어서 염색체의 구조적 변이를 관찰 할 수 없었다. 모상근의 단백질 양상을 알아보기 위하여 SDS-PAGE로 전기영동한 결과 인삼 모근과 모상근은 단백질 양상과 밴드 수에 있어서 약간의 차이를 나타내었다. 이들의 조직학적 분석에서도 인삼 모근과 모상근은 다소 차이를 보여 주었으며, 모상근의 경우 제한된 영역의 유관속계와 피층과의 경계가 뚜렷하고, 피층 유세포들의 형태와 배열이 불균등하며, 세포 간극이 매우 크게 발달되어 있었다.

## 참 고 문 헌

Aird, E.L.H., J.D. Hamill and M.J.C. Rhodes. 1988. Cytogenetic analysis of hairy root cultures from a number of plant species transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **15**: 47-57.

Bang, J.W. 1990. Chromosome variation in suspension cells derived from cultured immature embryo of *Triticum* spp. *Korean J. Bot.* **33**: 189-196.

Beach, K.H. and P.M. Gresshoff. 1988. Characterization and culture of *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots of forage legumes. *Plant Science* **57**: 73-81.

Choi, H.W. and J.W. Bang. 1990. Cytogenetic studies of *Scilla scilloides* complex from Korea. I. Distribution of genomes and composition and frequencies of B-chromosome. *Korean J. Bot.* **33**: 237-242.

Guellec, V., C. David, M. Branchard and J. Tempe. 1990. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of grapevine (*Vitis vinifera* L. ). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **20**: 211-215.

Heinz, D.J., G.W.P. Mee and L.G. Nickell. 1969. Chromosome numbers of some *Saccharum species* hybrids and their cell suspension cultures. *Am. J. Bot.* **56**: 450-456.

Heinz, D.J. and G.W.P. Mee. 1971. Morphologic, cytogenetic, and enzymatic variation in *Saccharum* species hybrid clones derived from callus tissue. *Am. J. Bot.* **58**: 257-262.

Hwang, B., K.M. Ko, K.H. Hwang, S.J. Hwang and Y.H. Kang. 1991. Production of saponin by hairy root cultures of ginseng transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Korean J. Bot.* **34**: 289-296.

Jung, K.H., S.S. Kwak, S.W. Kim, C.Y. Choi and J.R. Liu. 1991. Improvement of indole alkaloid productivity by optimization of medium concentration and cell inoculum size in suspension cultures of vinca (*Catharanthus roseus*). *Korean J. Plant Tissue Culture* **18**: 263-269.

Karp, A. 1988. Origins and causes of chromosome instability in plant tissue culture and regeneration. Kew Chromosome Conference III. HMSO. pp. 185-191.

Kim, H.H., B.B. Seo and J.Y. Lee. 1990. Chromosomal study on the genetic variants regenerated from tissue culture of *Allium wakegi*. *Korean J. Genet.* **12**: 104-112.

Kim, S.G. and D.J. Kim. 1987. Chromosomal and phenotypic variation in plants regenerated from tobacco protoclone

callus. *Korean J. Genet.* **9**: 189-194.

Kim, S.G. and H.J. Yu. 1991. Production of shikonin derivatives by cell lines of *Lithospermum erythrorhizon*: Selection for high shikonin production in lines of single cell origin. *Korean J. Plant Tissue Culture* **18**: 313-321.

Ko, K.S., I.O. Heo, J.S. Ko and W.J. Lee. 1990. Ginsenoside production by hairy root cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **5**: 201-205.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure protein during the assemble of the head of bacteriophage $T_4$. *Nature* **227**: 680-685.

Larkin, P.J. and W.R. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation-a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* **60**: 197-214.

Lee, C.D. and S.S. Hong. 1980. Study on breeding of Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). Sungkyunkwan University Thesis **27**: 1-11.

Levan, A., K. Fredga and A.A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* **52**: 201-220.

Ramsay, G. and A. Kumar. 1990. Transformation of *Vicia faba* cotyledon and stem tissues by *Agrobacterium rhizogenes*: Infectivity and cytological studies. *J. Exp. Bot.* **41**: 841-847.

Scowcroft, W.R., I.S. Bretell, S.A. Ryan, P.A. Davis and M.A. Pallotta. 1987. Somaclonal variation and genomic flux. *In*, Plant Tissue and Cell Culture. Alan R. Liss, Inc. pp. 275-286.

Seo, B.B., H.H. Kim and C.H. Yoo. 1988. Karyological variation of the callus cultures in shallot *Allium wakegi*. *Korean J. Genet.* **10**: 184-190.

Sunderland, N. 1977. Nuclear cytology. *In*, Plant Tissue and Cell Culture, H. E. Street, (ed. ). Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 177-205.

Webb, K.J., S. Jones, M.P. Robbins and F.R. Minchin. 1990. Characterization of transgenic root cultures of *Trifolium repens, Trifolium pratense and Lotus corniculatus* and transgenic plants of *Lotus corniculatus*. *Plant Science* **70**: 243-254.

Woo, J.C., D.W. Choi, Y.M. Yoo and S.G. Kim. 1990. Variation of chromosome number in tobacco plants regenerated from protoplast transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. *Korean J. Genet.* **12**: 26-32.

Yoshikawa, T. and T. Furuya. 1987. Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports* **6**: 449-453.

(1992. 12. 26 接受)