

## 한국 인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 자엽절편 배양으로부터 형성되는 체세포배의 기원

최용의 · 소웅영\*  
전북대학교 생물학과

### Origin of Direct Somatic Embryos from Cultured Cotyledon Segments of Korean Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer)

Yong Eui CHOI and Woong Young SOH\*

Department of Biology, Chonbuk National University, Chonju, 560-756. \*Corresponding author.

Cotyledon segments of korean ginseng produced somatic embryos when cultured on MS basal medium, whereas plumule or excised axis explants did not. Histological examination revealed that the cells in proximal region of cotyledon turned meristematic and densely cytoplasmic and gave rise to somatic embryos. Each somatic embryo originated from single epidermal cells in the region which epidermis was composed of smaller and more densely cytoplasmic cells than the subepidermal cells. However, in the case both epidermal and subepidermal cells were almost the same in size and cytoplasmic density, the embryo originated from multiple cells.

**Key words:** anthocyanin, proembryo

배양조직으로부터 체세포배의 발생에는 성장조절제의 역할이 중요하며(Ammirato, 1983) 이와 같은 경우 2,4-D가 일반적으로 사용된다. 그런데 배양조직으로부터 직접 체세포배가 발생될 경우에는 그 조직이 이미 배형성능을 갖고 있기 때문에 성장조절제는 체세포배 발생을 자극해 주는 역할을 한다는 의견이 널리 받아들여지고 있다(Pence et al., 1980; Sharp et al., 1980). 그러나 성장조절제를 첨가하지 않은 배지위에서 체세포배가 발생하는 경우도 있는데 그 예로서 *Petroselinum hortens*의 배유조직이나(Masuda et al., 1977), 굴나무의 주심조직(Button et al., 1974), 또는 *Ilex aquifolium*의 미숙배(Hu and Sussex, 1971), 당근의 접합자배 등을 들 수 있다(Smith, and Krikorian, 1989). 인삼 접합자배의 경우도 성장조절제를 첨가하지 않은 배지위에서엽상체가 발생된다는 보고가 있었고(Ham and Lee, 1974) 또한 체세포배가 발생된다는 보고(Lee et al., 1989)도 있었으나 이 체세포배의 기원에 대한 구체적인 연구는 이루어지지 않았다.

배양재료로부터 직접 체세포배가 발생될 때 이들의 기원을 추적하여 보면 표피의 단세포로부터 발생하는 경우가 있고(Konar and Nataraja, 1965; Street and Withers, 1974; Jones and Rost, 1989), 부정아와 같이 다세포로부터 발생되기도 하며(James et al., 1984). 또는 같은 배양재료에서 이들 두 가지 기원이 같이 관찰되기도 한다(Pence et al., 1980; Williams and Maheswaran, 1986).

따라서 본 연구에서는 인삼 접합자배의 자엽을 MS (Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에 배양하여 체세포배를 유도하였고 그 발생과정에서 체세포배의 기원을 조직학적으로 밝혔다.

#### 재료 및 방법

인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer) 종자를 모래에 묻고 4개월동안 약 10°C의 습한 상태에서 개갑을 유도하였다. 채

종직후 접합자배는 약 250  $\mu\text{m}$  크기의 어린 구형단계에 있고 개갑 직후라도 약 1 mm 크기의 미숙한 단계에 있으므로 충분히 성숙시키기 위하여 앞에서와 같은 조건 하에 약 2개월 정도 더 두었다. 접합자배가 약 4 mm로 충분히 성숙되었을 때 종자를 70% 에탄올로 1분간 그리고 1% 차아염소산나트륨 용액에서 약 20분간 표면살균시킨 다음 멸균된 증류수로 3-4회 수세하였다. 배유를 제거하고 접합자배를 적출한 다음 완전한 배자체로 배양하거나 또는 부위별로 자엽, 유경 및 하배축을 포함한 유근으로 구분하여 절단해서 배양하였다. 배지는 MS (Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에 3% 설탕과 0.7% 한천을 첨가하였으며 pH 5.8로 조정된 다음 120°C에서 15분간 습열 멸균하였고 유리 페트리접시(10 × 15 cm)에 약 30 mL씩 분주하여 사용하였다. 배양재료는 완전한 접합자배를 배양할 경우는 페트리접시당 10개로 치상하였으며 접합자배를 부위별로 절단하여 배양할 경우는 15개를 배양하였다. 각 실험구당 배양한 재료의 수는 50개 이상으로 3번 이상 반복하였다. 배양실 조건은 1,900 Lux 백색형광 등으로 16/8시간(명/암)으로 그리고 온도는 24°C로 유지하였다. 배양 결과는 각 실험에서 모두 배양한지 약 5주가 경과된 후에 실험 결과를 조사하였으며, 배양된 재료에서 체세포배 발생률은 배양재료에서 1개 이상의 체세포배를 발생시킨 배양재료의 수를 세어 백분율을 구하였다. 또한 배양중인 재료의 일부를 FAA에 고정한 다음 에틸 알코올로 탈수한 후 파라핀으로 매몰하였다. 이를 10  $\mu\text{m}$ 로 회전식 마이크로톰으로 박편절단한 다음 헤마톡실린으로 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

결 과

체세포배의 발생 부위

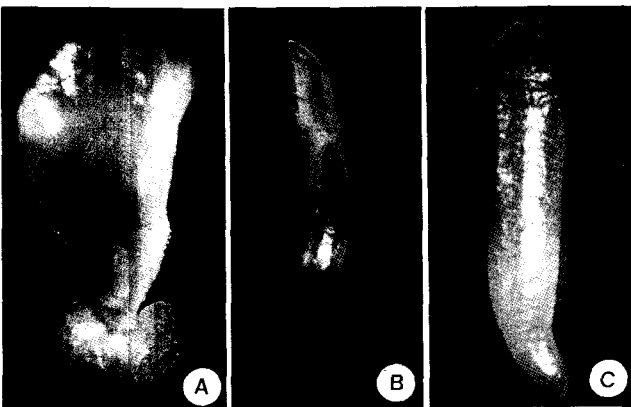


Figure 1. Somatic embryo development from various parts of ginseng zygotic embryos cultured on MS basal medium. Cotyledon segments produced numerous somatic embryos (A), whereas plumule and radicle did not (B,C).

Table 1. Effect of cotyledon orientation on somatic embryo production from ginseng cotyledon explants cultured on MS basal medium.<sup>a</sup>

Orientation	Production rate(%) <sup>a</sup> producing	Portion of cotyledon somatic embryos(%)		
		proximal	middle	distal
Abaxial side down	67.8 ± 5.6	98.7	0.6	0.7
Adaxial side down	32.2 ± 5.6	98.4	0.9	0.7

<sup>a</sup>Data represent the mean values (± SD) of three replicates containing 50 explants each.

성숙한 접합자배를 완전한 상태로 배양하였을 때는 모두 발아되었고 유경, 하배축을 포함한 유근 및 자엽의 3부분으로 절단하여 배양하였을 때는 자엽에서만 체세포배가 발생되었으며(Fig. 1-A), 유경이나 배축을 포함한 유근은 절단면 주변이 약간 부풀었을 뿐(Fig. 1-B, 1-C) 전혀 체세포배가 발생되지 않았다. 한편 자엽의 향측면 또는 배측면을 배지에 접하게하여 배양했을 경우 전자는 배발생률이 67.8%였고, 후자는 이보다 절반수준에 불과하였다(Table 1). 자엽을 3등분으로 구분하였을 때 체세포배가 발생하는 부위는 대부분 자엽의 기부 절단면 주변에 국한되었다(Table 1, Fig. 3).

체세포배의 기원

자엽으로부터 체세포배의 발생을 배양시간별로 조직학적인 관찰을 해본 결과(Fig. 2) 배양직전은 헤마톡실린에 염색 정도의 차이없이 모든 세포가 연하게 염색되었다(Fig. 2-A). 배양 이틀 후에는 자엽의 절단면 기부쪽의 표피나 하표피 세포에 국한되어 핵과 세포질이 헤마톡실린에 진하게 염색되는 특징을 보였으며(Fig. 2-B, arrow), 배양 후 7일 경에는 이들 세포에서 체세포배의 발생이 시작되었고(Fig. 2-C, arrow) 약 30일 경과되었을 때에 자엽시기의 배로 성숙하였다(Fig. 2-D).

자엽을 배양하였을 때 자엽표면에 안토시아닌으로 추정되는 붉은 색소가 농후하게 축적되는 경우와 배양기간이 경과되어도 연한 녹색을 띠는 경우로 구분되었는데 전자의 경우는 대부분 체세포배가 각각 단독적으로 발생되었으며(Fig. 3-A), 후자의 경우는 여러 개의 배가 서로 융합되어서 발생되었다(Fig. 3-C, D). 단독배의 발생빈도는 54.8%였고 여러 개가 융합된 다배의 발생빈도는 45.2%로 관찰되었다. 이들 단독배와 다배의 발생을 조직학적으로 관찰한 결과

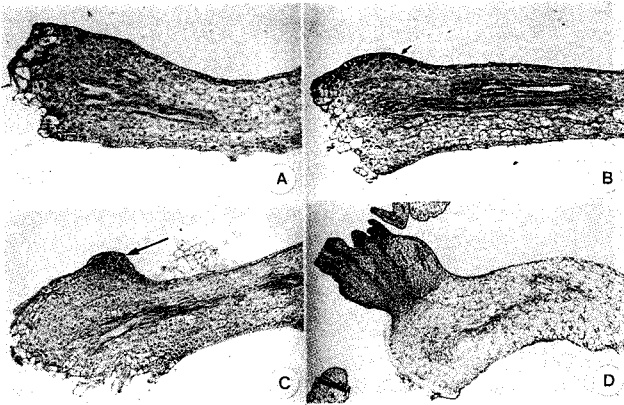


Figure 2. Anatomy of somatic embryos derived from cotyledon explants cultured on MS basal medium. A: longitudinal section of cotyledon before culture, B: epidermal cells became densely cytoplasmic (arrows) after 2 days of culture, C: globular somatic embryos formed on cotyledon surface after 10 days of culture, D: two embryos at cotyledonary stage formed cotyledon surface after 30 days of culture (arrows: procambial strands).

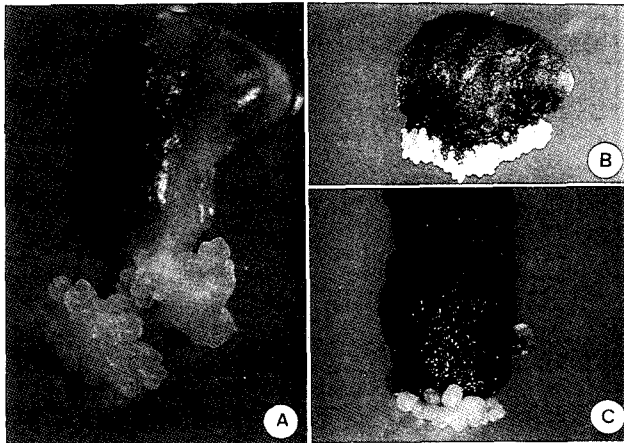


Figure 3. Single and poly-embryo formation from cotyledon explants. A: green cotyledon producing poly-embryos, B-C: cotyledon containing anthocyanin-like substance produced a single embryo and turned black.

단독배는 단세포로부터(Fig. 4) 그리고 다배는 다세포로부터 기원되었다(Fig. 4). 표피세포의 세포질이 농후하고 세포 대비 핵의 크기가 큰 반면에 하표피세포가 심하게 액포화되었을 경우에는(Fig. 4-A) 표피의 단세포에서 체세포배가 기원되었으며 표피세포의 최초 분열 방향은 수층분열에(Fig. 4-B, arrows) 이어서 병층 분열을(Fig. 4-B, arrowheads) 하는 경우가 많았다. 세포분열이 더욱 진행된 후에 전배의 구조를 이루었고(Fig. 4-C) 구형단계를 지나 어뢰형의 배로 성숙하였다(Fig. 4-D, E).

한편 자엽의 표피 및 하표피세포의 세포질이 비슷하게

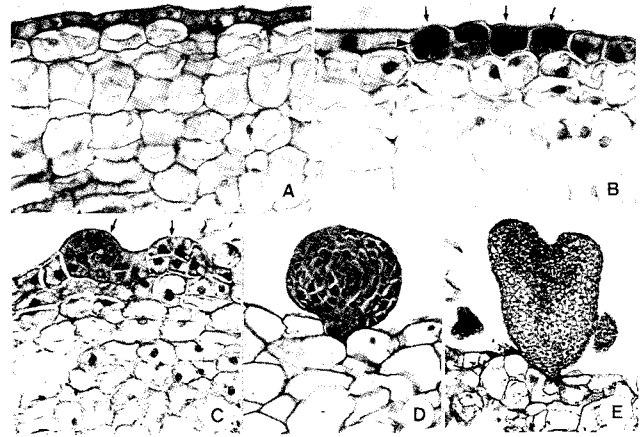


Figure 4. Anatomy of somatic embryos from epidermal single cells of cotyledon. A: epidermal cells are smaller and more densely cytoplasmic than subepidermal cells, B: first (arrows) or second (arrowheads) cell division of epidermal single cells during somatic embryogenesis, C: early globular somatic embryos (arrows), D: globular somatic embryos, E: torpedo-stage somatic embryo.

농후한 경우에는(Fig. 5-A) 표피 및 하표피의 구분없이 다세포에서 체세포배가 기원되었다. 표피세포는 먼저 수층분열을(Fig. 5-B, arrowheads) 반복하고 하표피 세포들은 일정한 방향없이 보조를 맞춰 분열하여(Fig. 5-B, arrows) 작은 분열조직적인 구조로 되었다. 이 결과 자엽 절단면에 인접한 부위에서 돌기가 형성되기 시작하였고(Fig. 5-C, E) 자엽의 절단면주위 이외의 세포에서는 분열이 관찰되지 않았다. 다세포에서 유래된 초기 배는 집합자배에서 관찰되는 전배나 초기 구형배의 구조와는 달리 대부분 돌기와 같은 반구형의 배로 되었다(Fig. 5-E). 반구형배의 기부는 배양 자엽편과 밀접하게 연결되어 있어서(Fig. 5-E) 그 경계가 뚜렷하게 구분되지 않았다. 반구형의 배가 더욱 커진 후 이로부터 여러 개의 배로 구분되면서 각각 자엽원기가 형성되었고 각각의 배의 배측 내부에는 전형성층이 분화되었다(Fig. 5-F, G). 한편 다세포로부터 체세포배가 유래되더라도 물개는 단일배로 발생되기도 하였다(Fig. 5-H, I).

## 고 찰

배양재료로부터 체세포배를 유도하기 위해서는 배지에 성장조절을 첨가하는 것이 일반적이다(Ammirato, 1983). 그러나 본 실험에서와 같이 성장조절을 전혀 첨가하지 않고서 절단과 같은 물리적 처리만으로도 자엽에서 높은 빈도로 체세포배가 발생된다는 것은 배양조절으로부터 체세포배의 발생에 필요한 요인이 식물재료마다 각각 다른

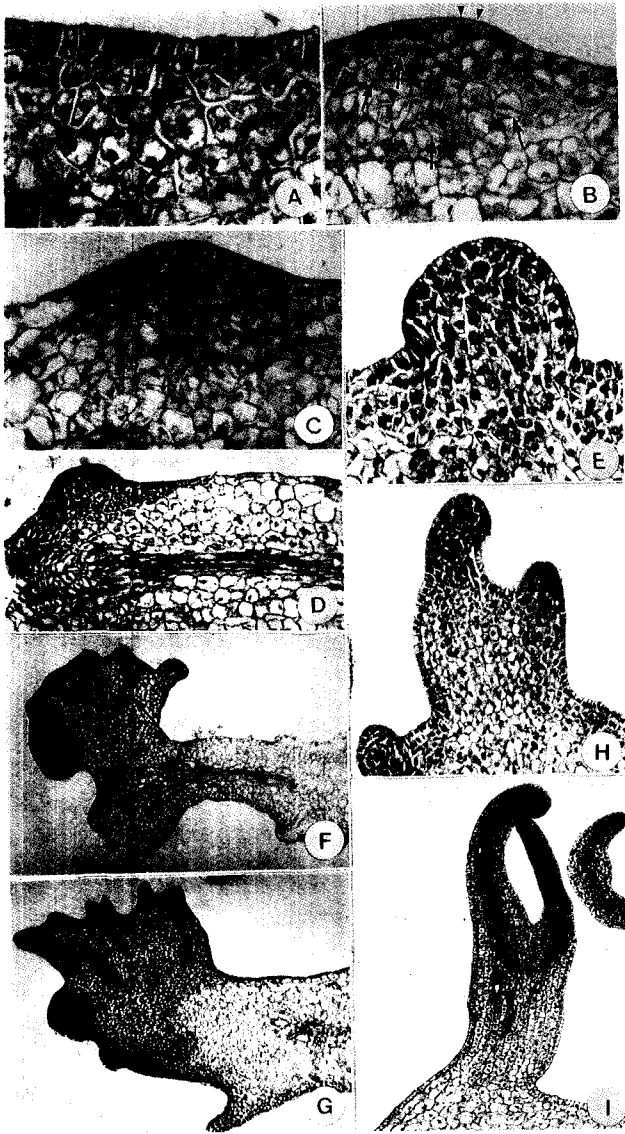


Figure 5. Somatic embryogenesis from multiple cells of epidermis and subepidermis of cotyledon. A: epidermal and subepidermal cells were densely cytoplasmic, B: initiation of somatic embryogenesis by division of epidermal (arrowheads) and subepidermal (arrows) cells, C-D: epidermis and subepidermis of the excised portion of cotyledon become meristematic, E: hemispherical embryo was formed, F: polyembryo with procambial strand (arrow), G: torpedo-stage polyembryos, H: torpedo-shaped embryos, I: cotyledonary single embryos.

것으로 볼 수 있다. 그러므로 인삼 접합자배의 경우는 부분 절단과 같은 물리적인 자극만으로도 체세포배의 발생이 유도되는 실례로 볼 수 있다. 인삼 접합자배를 완전한 배 자체로 배양하면 체세포배가 전혀 발생되지 않았지만 부위별로 절단하여 배양하였을 때 자엽에서 높은 빈도로 체세포배가 발생되었다. 이 결과는 접합자배의 자엽기부에 배발생

능을 갖추고 있을 지라도 완전한 배의 상태 하에서는 그 발현이 억제되어있는 것으로 생각되며 접합자배를 절단하였을 때 이에 수반되는 생리적 변화가 체세포배 발생의 발단이 된 것으로 보인다. 절단에 따른 생리적 변화가 체세포배 발생을 어떻게 유도했는 지는 아직 분명치 않으나 몇 가지 요인이 관여되었을 것으로 추측된다. 그 하나는 절단부위의 생리적 변화이며, 절단면 주변에 오옥신이나 에틸렌의 증가가 일어나서 발생분화에 영향을 준다는 연구결과가 있다 (Moncousin et al., 1989). 본 실험에서도 인삼 자엽에서 체세포배의 발생은 주로 자엽기부 절단면 주변에서 일어났으며, 조직학적으로도 절단주변부위의 세포들로부터 체세포배 발생이 확인된 것은 절단하는 자극이 배발생과 관련된 것으로 보인다. 다른 하나는 배축이 자엽으로부터 체세포배의 발생을 억제할 가능성이 있는데 자엽을 절단하여 배양함으로써 배발생 억제로부터 해방되어 체세포배가 발생된 것으로 추정된다. 그 이유는 접합자배 자체를 배양하였을 때는 모두 발아되었지만 자엽만을 배양했을 경우 체세포배가 발생되었기 때문이다. 다른 연구 보고에서도 접합자배의 발아와 체세포배의 발생과는 현저한 반비례 관계가 있었다 (Pence et al., 1980; Williams and Maheswaran., 1986).

배양재료에 따라 체세포배의 기원은 대부분 단세포에서 이루어지고(Konar and Nataraja, 1965; Street and Withers, 1974; Jones and Rost, 1989) 또는 다세포에서 기원되기도 하며(James et al., 1984) 이들 두 기원이 같이 관찰되기도 한다(Pence et al., 1980; Williams and Maheswaran, 1986). 본 실험에서는 단세포 및 다세포의 두 가지 기원이 관찰되었는데 이와 같이 기원이 다른 점은 자엽의 생리적 상태나 자엽마다 세포의 분화정도에 차이에 기인되었다고 생각된다.

체세포배가 단세포에서 발생되는 경우는 구형, 심장형 및 어뢰형 단계를 거쳐 자엽단계로 성숙되며 유경과 유근의 발생이 분명하다(Street and Withers, 1974; Jones and Rost, 1989). 그런데 본 실험에서와 같이 체세포배가 성숙했을 지라도 기부가 배양재료와 밀접하게 융합되었거나 여러 개의 배가 융합된 채로 발생되기도 한다(James et al., 1984; Choi and Soh, 1993). 이와 같이 배의 기원이나 발생 유형이 아주 다양해서 배양재료의 다세포로부터 직접 체세포배로 발생되기도 하고(Pence et al., 1983; Williams and Maheswaran., 1986) 배양재료에서 일단 분열조직이 형성된 후 이 조직의 일부에서 직접 배로 발생되기도 하며 (Schwendiman et al., 1988; Quinn et al., 1989), 단세포에서 일단 세포피가 형성된 후 이로부터 체세포배가 발생되기도 하는(Trigiano et al., 1989) 예가 있다.

또한 다세포에서 체세포배가 발생된 경우 배의 기부가 배양재료와 밀접하게 연결된 단일 배로 발생되기도 하고 (Schwendiman et al., 1988; Quinn et al., 1989), 본 실험에서의 경우와 같이 대부분 다배로 발생되어 배축부위가 합쳐져 있는 경우도 있다. 이와 같은 경우 체세포배가 발생되는

세포괴를 전배로 보았고 이 전배로부터 다배가 발생된 것이라고 해석한 바 있다(Haccius, 1978). Trigiano 등(1989)과 Schwendiman 등(1988)의 연구에서는 배양조직에서 분열조직대가 형성되고 이들 일부에서 직접 체세포배가 발생되었는데 이 경우 분열조직대를 전배로 보았다. 자연상태 하에서도 수정란으로부터 배가 발생하는 도중에 다배가 발생되기도 하는데 이는 성장조절제인 2,4-D나 X-ray처리 등에 의해 심한 자극을 받았을 때 주로 일어난다(Ferguson et al., 1979; Morgan and Rappleye, 1961). 그러나 본 실험과 같이 인삼 자엽의 다세포에서 배가 발생하는 경우는 다세포집단으로부터 발생되기 때문에 단세포유래인 접합자배가 발생도중 다배로 분리되는 현상과는 달리 단지 배발생에 참여하는 세포가 서로 이웃하여 동시에 발생되기 때문에 독립적으로 배가 발생되지 않고 융합된 다배가 발생된다고 생각된다.

## 적 요

성숙한 인삼 접합자배를 MS 기본배지에 배양하였을 때 대부분 발아되었다. 그런데 자엽을 절단하여 배양하였더니 높은 빈도로 체세포배가 발생되었다. 그러나 유경이나 하배축을 포함한 유근과 같은 부위에서는 체세포배가 발생되지 않았다. 조직학적 관찰에서 자엽의 기부 절단면 주변이 세포질이 농후해지고 분열하는 세포로 변화된 후 이들로부터 체세포배가 발생되었다. 체세포배의 기원은 표피가 하표피에 비해서 작고 세포질이 농후한 경우는 표피의 단세포에서 이루어졌고, 만일 표피 및 하표피세포가 그 크기나 세포질이 비교적 비슷한 경우는 표피와 하표피의 다세포에서 이루어졌다

## 인 용 문 헌

- Ammirato P V (1983) Embryogenesis. In DA Evans, WR Sharp, PV Ammirato, Y Yamada, eds, Hand book of Plant Cell Culture, Vol. 1. Techniques for Propagation and Breeding, Macmillan Publishing Co., New York, pp 82-123.
- Button J, Kochba J, Bormman CH (1974) Fine structure of embryoids development from embryogenic ovular callus of Shamouti orange (*Citrus sinensis* Osb.). J Exp Bot 25: 446-457
- Choi YE, Soh WY (1993) Structural aspects of somatic embryos derived from cultured zygotic embryos in *Acanthopanax senticosus* L. Korean J Plant Tissue Culture 20: 261-166
- Ferguson JD, McEwan JM, Card KA (1979) Hormonally induced polyembryos in wheat. Physiol Plant 45: 470-474
- Haccius B (1978) Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. Phytomorphology 25: 91-94
- Ham CY, Lee YI (1974) Studies on the cotyledon culture of *Panax ginseng*. Korean J Bot 17: 171-174
- Hu CY, Sussex IM (1972) In vitro development of embryoids on cotyledons of *Ilex aquifolium*. Phytomorphology 21: 103-107
- James DJ, Passey AJ, Deeming DC (1984) Adventitious embryogenesis and the in vitro culture of apple seed parts. J Plant Physiol 115: 217-229
- Jones TD, Rost TL (1989) The developmental anatomy and ultrastructure of somatic embryos from the rice (*Oryza sativa* L.) scutellum epidermal cells. Bot Gaz 150: 41-49
- Konar RN, Nataraja K (1965) Experimental studies in *Ranunculus sceleratus* L. Development of embryos from the stem epidermis. Phytomorphology 15: 132-137
- Lee HS, Lee KW, Yang SG, Liu JR (1989) Plant regeneration through somatic embryogenesis from cultured mature zygotic embryos of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) and flowering of plantlets. Korean J Bot 32: 145-150
- Masuda K, Koda Y, Okazawa Y (1977) Callus formation and embryogenesis of endosperm tissue of parsley seed cultured on hormone free medium. Physiol Plant 41: 135-138
- Moncousin C, Favre JM, Gasper T (1989) Early changes in auxin and ethylen production in vine cuttings before adventitious rooting. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 19: 235-242
- Morgan DT, Rappleye RD (1961) Polyembryony in maize and Lily following X-irradiation of pollen. J Hered 42: 90-93
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. Physiol Plant 15: 473-497
- Pence VC, Hasegawa PM, Janick J (1980) Initiation and development of asexual embryos of *Theobroma cacao* L. in vitro. Z Pflanzenphysiol 98: 1-14
- Quinn J, Simon JE, Janick J (1989) Histology of zygotic and somatic embryogenesis in borage. J Amer Soc Hort Sci 114: 516-520
- Schwendiman J, Pannetier C, Michaux-Ferriere N (1988) Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. Ann Bot 62: 43-52
- Sharp WR, Sondahl MR, Caldas LS, Maraffa SB (1980) The physiology of in vitro asexual embryogenesis. Hort Rev 2: 268-310
- Smith DL, Krikorian AD (1989) Release of somatic embryogenic potential from excised zygotic embryos of carrot and maintenance of proembryonic cultures in hormone-free medium. Amer J Bot 76: 1832-1843
- Street HE, Withers IA (1974) The anatomy of embryogenesis in culture. In HE Street, ed, Tissue Culture and Plant Science. Proc. 3rd Internat.

Cong. Plant Tissue and Cell Culture, University of Leicester, Leicester,  
U.K. Academic Press, London, pp 71-100

**Trigiano RN, Gray DJ, Conger BV, McDaniel** (1989) Origin of direct  
somatic embryos from cultured leaf segments of *Dactylis glomerata*. Bot  
Gaz **150**: 72-77

**Williams EG, Maheswaran G** (1986) Somatic embryogenesis: factors  
influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group.  
Ann Bot **57**: 443-462

(1994년 4월 15일 접수)