

# 인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 기내 화아형성 빈도와 cytokinin 구조와의 관계

이행순 · 김윤성 · 권석윤 · 곽상수 · 유장렬\*  
생명공학연구소 제2연구부

## Correlation between *In vitro* Flowering Frequency and the Structure of Cytokinins in Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer)

LEE, Haeng Soon · KIM, Youn Sung · KWON, Suk Yoon · KWAK, Sang-Soo · LIU, Jang-Ryol\*

Research Division of Biotechnology, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O.Box 115,  
Yusong, Taejeon, 305-606, Korea

**ABSTRACT** To elucidate the relationship between *in vitro* flowering and the structure of cytokinins in ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer), zygotic embryos, seedlings, and cotyledonary nodes were cultured on MS medium supplemented with 5  $\mu$ M of various cytokinins (BA, kinetin, 2-iP, and zeatin) with or without GA<sub>3</sub> (5  $\mu$ M). The frequency of *in vitro* flowering was the highest when explants were cultured on the medium containing BA regardless of the kinds of explants, followed by kinetin, 2-iP, and zeatin. Flowering frequency of cotyledonary node explants was significantly increased by the combined treatment of cytokinin and GA<sub>3</sub>. Flowering frequency was highly correlated with the logP of cytokinins, indicating that the lipophilicity of each cytokinin may involved in the *in vitro* flowering of ginseng.

**Key words:** Cotyledonary node, gibberellic acid, lipophilicity, logP, plant growth regulator

### 서 론

기내 화아형성 시스템의 이용은 환경요인, 영양분, 성장조절제 등의 조건을 목적에 따라 용이하게 달리할 수 있을 뿐만 아니라, 식물체의 일부분을 적출하여 배양함으로써 화아형성에 있어서 식물체의 기관간의 상호영향을 최소화할 수 있다 (Scorza 1982). 또한 기내 화아형성은 영양생장에서 생식생장으로의 변화를 추적 가능하게 하므로 포장에서 연구할 수 없었던 발생학적 분화를 연구하는 시스템을 제공해 주는 중요한 이점이 있다. 기내 화아형성의 연구는 외부 식물생장조절제에 의한 *in situ* 혹은 단일 성장조절제를 처리한 경우가 대부분이며 극히 일부에서 2종류 이상의 성장조절제의 상호관

계를 밝히고 있다 (Scorza 1982). 성장조절제에 의한 기내 화아형성은 담배 (Mohnen et al. 1990), 토마토 (Liu and Li 1989), 대나무 (Nadgauda et al. 1990) 등 많은 식물체에서 이루어졌다.

인삼에 관한 연구는 기관발생 (Lim et al. 1997)과 체세포배발생에 의한 식물체 재분화, 형질전환 식물체 개발 (Lee et al. 1995), 기내 화아형성 등의 조직배양이 이루어졌으며 화아 관련 유전자 분리 및 기능 연구가 보고되었다 (Kim et al. 1995; 1998). 접합자배 (Lee et al. 1990), 유식물체 (Lee et al. 1991) 및 체세포배 유래 원형질체 (Arya et al. 1991)에서 체세포배발생에 의한 식물체재분화와 기내 화아형성이 보고된 바 있다.

특히 인삼의 기내 화아형성은 포장에서 3년이라는 유년기를 극복할 수 있는 이점이 있다 (Chang and Hsing 1980; Lee et al. 1990; 1991). 발아한 지 7일 된 인삼 유식물체를 BA, GA<sub>3</sub>, ABA가 조합 처리된 배지에 배양하여 화아형성을 유도

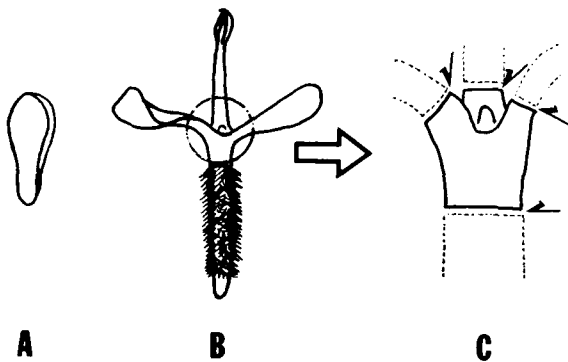
\*Corresponding author. Tel 042-860-4432  
E-mail sskwak@mail.kribb.re.kr

하였을 때 cytokinin이 주된 역할을 하며, ABA는 저해작용을 하고, GA는 저해제의 작용을 극복하여 cytokinin의 작용을 허용하는 역할을 하였으며 (Lee et al. 1991), 기내 화아형성은 cytokinin 함유배지에서 10일간의 배양기간을 요구하는 것으로 나타났다 (Lee et al. 1994). 일반적으로 GA<sub>3</sub>가 화아형성에 영향을 미치는 가장 중요한 성장조절제로 알려져 있는 반면 인삼의 경우 cytokinin이 화아형성에 필수적인 요인으로 작용하였다. 이와 같은 연구결과는 담배의 화기발달 (Escruch et al. 1993)과 애기장대 (Venglat and Sawhney 1996)에서도 보고되었는데, BA가 애기장대의 화아발달과 관련이 있는 것은 물론이며 perianth 조직으로부터 이차적인 화아를 유도함으로써 꽃의 발달과 화기분화에 영향을 미치는 성장조절제로 작용하였다 (Venglat and Sawhney 1996). 또한 잎이 4개 형성되는 단계에 뿌리의 발달이 멈추면서 수많은 측근을 형성하는 애기장대 돌연변이체에 cytokinin을 처리하면 정상적인 shoot와 꽃이 형성되었다 (Boerjan et al. 1992). 이와 같은 연구결과들로부터 cytokinin이 식물체의 화기 발달과 관련이 있는 성장조절제임을 짐작할 수 있다. 본 연구에서는 인삼의 기내 화아형성을 유도하는 필수 성장조절제로 알려진 cytokinin의 다양한 구조가 기내 화아형성 빈도에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

개입된 인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer) 종자의 외피를 벗겨낸 후 70% 에탄올로 5분, 10% 상업용 표백제 (NaOCl 함유량 4% 이상)로 20분 동안 표면살균한 다음 멸균증류수로 3회 이상 세척하였다. 화아형성을 위한 식물재료는 모두 3 종류의 절편체를 사용하였다 (Figure 1). 무균상태에서 종자의



**Figure 1.** Diagrams of ginseng explants employed as materials. A: Zygotic embryo; B: Seedling germinated on White medium after one week of culture; C: Cotyledonary node explant excised from seedling by removing epicotyl, cotyledon, and root. Enlargement of the circle in B showed the cotyledonary node in C.

배유로부터 꺼낸 접합자배와, 접합자배를 1주일 동안 무균발아시킨 유식물체, 유식물체의 상배축, 자엽 및 뿌리 부위를 제거하고 남은 자엽마디를 포함하는 절편체 (이하 '자엽마디 절편체'라 함)를 화아형성의 재료로 사용하였다.

### 배지조성 및 배양

기본배지는 MS (Murashige and Skoog 1962)의 무기염에 sucrose 30 g/L, myo-inositol 100 mg/L, thiamine · HCl 0.4 mg/L, phytagel 4 g/L를 첨가한 것을 사용하였다. 이때 질소 화합물은 1/2 농도로 하였다. 0.1 N NaOH로 배지의 pH를 5.8로 맞추고 121°C에서 15분 동안 멸균하여 Petridish (87 × 15 mm)당 25 mL씩 넣었으며 재료는 페트리디쉬 당 5개씩 치상하였고 처리당 10개의 페트리디쉬를 반복하였다. 유식물체를 재료로 하고자 할 때에는 접합자배를 White (1943)의 무기염에 100 mg/L myo-inositol, 0.4 mg/L thiamine · HCl, 20 g/L sucrose를 첨가한 배지에 치상한 후 25°C의 암소에서 1주일 동안 발아시켰다.

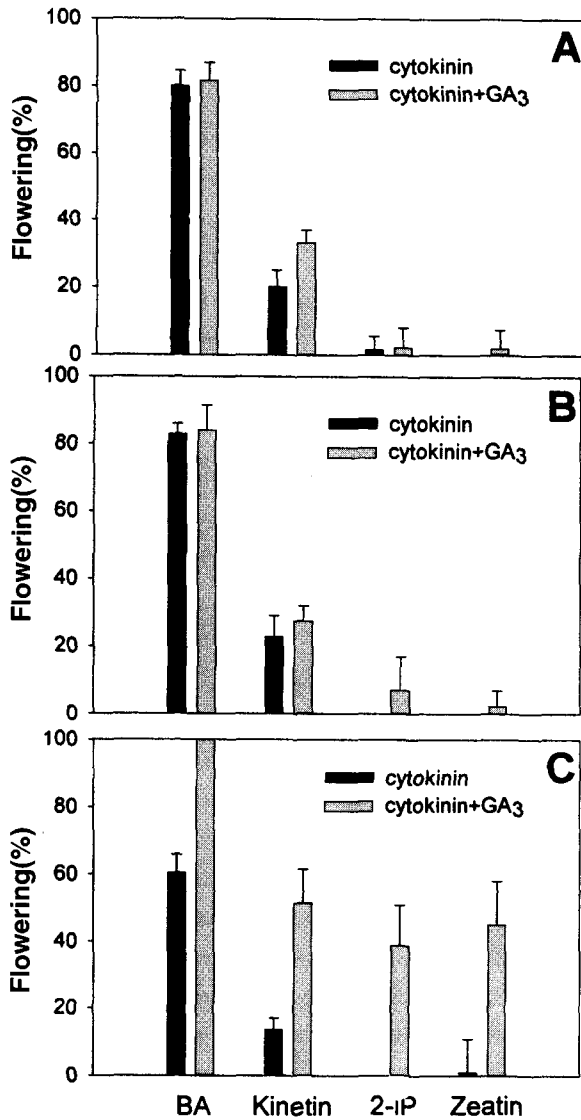
인삼의 화아형성에 영향을 미치는 cytokinin의 효과를 조사하기 위하여 BA, kinetin, 2-iP, zeatin을 각각 5 μM씩 배지에 첨가하거나 5 μM GA<sub>3</sub>를 함께 첨가하였다. 사용된 성장조절제 중에서 zeatin, 2-iP 및 GA<sub>3</sub> 등은 멸균된 0.2 μm membrane으로 여과하여 고압멸균 후 45°C로 식힌 배지에 첨가하였다. 배양은 25°C, 16 (광) : 8 (암) 시간의 광주기로 하여 약 15 μmol m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>로 조사된 항온기에서 10주간 수행하였다. 화아형성의 빈도는 해부현미경으로 관찰하여 전체 재료 중에서 화아형성이 이루어진 것의 백분율로 표시하였다.

### Cytokinin의 logP 조사

LogP는 물과 옥탄올간의 분배계수로, O2 (R5000) workstation을 사용하여 SYBYL 프로그램으로 한국화학연구소에서 조사하였다.

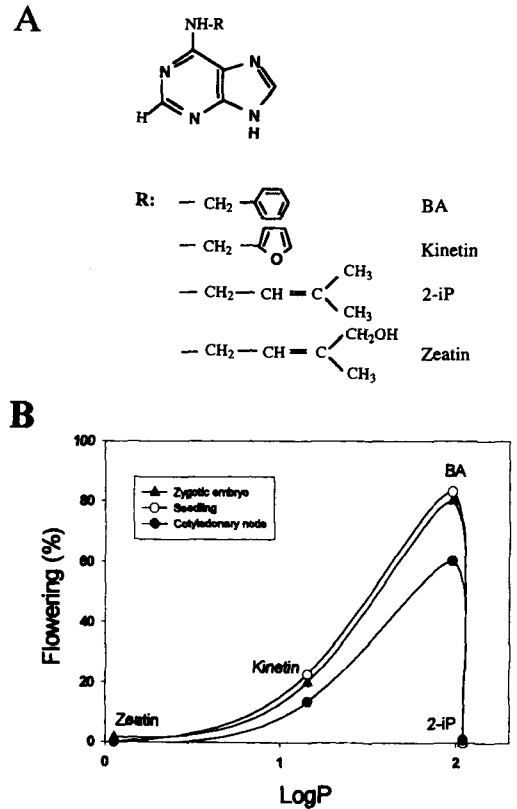
## 결과 및 고찰

재료에 관계없이 사용한 cytokinin 중에서 인삼의 기내 화아형성에는 BA가 가장 효과적인 성장조절제로 나타났다. 접합자배 (zygotic embryo)를 재료로 하였을 경우 BA 처리구에서는 80%로 가장 높은 화아형성 빈도를 보였다. Kinetin의 처리구에서는 BA의 1/4 정도 낮은 화아형성 빈도를 나타냈으며 2-iP나 zeatin의 경우에는 화아형성이 아주 낮은 빈도로 일어나거나 관찰되지 않았다 (Figure 2A). 여기에 5 μM의 GA<sub>3</sub>를 첨가시켰을 경우 화아형성 빈도가 약간씩 증가하였지만 cytokinin 단독 처리시와 같은 경향을 나타내어 전체적인 화아형성 빈도에는 큰 영향을 미치지 않았다. 유식물체



**Figure 2.** Effect of various cytokinins in MS medium on the flowering response of ginseng zygotic embryos (A), seedlings (B), and cotyledonary nodes (C). The MS medium contained half volume of nitrogen compounds. The concentration of cytokinin and GA<sub>3</sub> is 5 μM, respectively. Data were collected after 10 weeks of culture. Error bars represent SD.

(seedling)를 재료로 하였을 경우에도 접합자배에서 처럼 BA 처리구에서 83%로 가장 높은 화아형성 빈도를 나타내었으며, kinetin, 2-iP, zeatin 처리구 및 cytokinin과 GA<sub>3</sub>를 함께 처리한 경우 모두 접합자배와 비슷한 경향을 나타냈다 (Figure 2B). 자엽마디 절편체 (cotyledonary node)의 경우에는 cytokinin 단독 처리시 화아형성 빈도가 접합자배나 유식물체에서 보다는 다소 낮았지만 GA<sub>3</sub>를 함께 처리하였을 경우 화아형성 빈도가 모든 처리구에서 높게 나타났다. 즉, BA의 경우 화아형성 빈도가 60%에서 100%로 향상되었으며 kinetin 처리구에서는 3배정도 증가하였다. 특히 2-iP와 zeatin은 각각 단독으로 존재할 때 전혀 화아형성이 일어나지 않았거나 아주 낮았지만 GA<sub>3</sub>를 첨가하여 주므로 인해 40% 전후의 화아형



**Figure 3.** Structures of cytokinins (A) and the relationship between flowering frequency and logP of cytokinins (B).

성 빈도를 보였다 (Figure 2C). 자엽마디 절편체는 위 4가지 cytokinin 단독 처리 배지에서 axillary bud의 생장이 일어나지 않은 채 배양초기 상태로 머물러 있었으며 이러한 현상은 zeatin 처리구에서 가장 심하였고 특히 37% 정도는 생장이 일어나지 않았다. 그러나 GA<sub>3</sub>를 첨가시킴으로써 axillary shoot의 생장이 이루어졌으며 이때 GA<sub>3</sub>는 재료 자체의 영양 성장에 영향을 미쳐 화아형성 빈도가 증가된 것으로 생각된다. 이처럼 GA<sub>3</sub> 효과가 자엽마디 절편체에서 가장 현저하게 나타난 것은 자엽, 뿌리 등의 기관이 제거되었기 때문이라 생각되며 접합자배와 유식물체는 내생 ABA의 저해작용으로 인해 GA<sub>3</sub> 효과가 감소된 것으로도 이해될 수 있겠으나 자세한 원인조사가 내생호르몬 분석 측면에서 요구된다 (Lee et al. 1991). 인삼의 기내 화아형성에 사용한 cytokinin중 BA와 kinetin은 합성화합물이며 2-iP와 zeatin은 내생호르몬이다. 이들은 adenine 기본골격에 다양한 측쇄구조 (-R)를 갖는다 (Figure 3A). Cytokinin의 기본골격을 갖는 4종의 화합물이 인삼의 기내 화아형성에 미치는 영향은 현저히 다르기 때문에 사용한 화합물의 구조와 활성관계를 검토한 결과, 화합물의 지용성이 화아형성에 관여함을 알 수 있었다 (Figure 3B). 지용성의 성질을 나타내는 logP가 2-iP (2.04), BA (1.98), kinetin (1.16), zeatin (0.05) 순으로 높았다. Figure 3B에서와 같이 적절한 지용성을 갖는 화합물 (BA)에서 높은 활성을 나타내고 지용성이 너무 낮은 화합물 (zeatin)과 너무 높은

화합물 (2-iP)에서 낮은 활성을 나타내었다. 또한 중간적인 지용성을 갖는 화합물 (kinetin)은 중간정도의 활성을 나타내었다. 사용한 화합물의 수가 적어 구조와 활성관계를 정확하게 결론을 내리기는 어려우나 본 연구에서 사용한 화합물의 지용성과 기내 화아형성과는 극히 높은 상관관계가 있어, cytokinin의 지용성의 정도가 인삼의 기내 화아형성에 중요하게 관여하고 있을 것으로 생각되었다. 활성이 높은 BA와 kinetin는 각각 benzen과 furan의 고리구조를 가지는데 비해 활성이 낮은 2-iP와 zeatin은 그렇지 않은 구조적인 특징이 있다. 네 종류의 cytokinin 중 zeatin은 분자내의 수소결합으로 다른 cytokinin류와 구조적인 차이가 있다.

화합물의 약리작용 혹은 생리활성은 몰과 올리브유와의 분배계수 ( $\log P$ )와 직선적인 관계가 아니라 일반적으로 포물선적이라고 주장하였다 (Kim 1989; Hansch and Fujita 1964). 즉, 한 계열의 물질에 있어 분배계수가 증가하면 생리작용도 증가하나 어떤 점에 도달하면 오히려 감소하여 결국에는 생리작용이 없어질 것이라고 하였다. 인삼의 기내 화아형성과 cytokinin의  $\log P$ 는 Hansch와 Fujita (1964)가 주장하는 것과 같이 포물선의 관계를 보여주고 있다. 즉, cytokinin의 기내 화아형성 활성과  $\log P$ 는 높은 상관관계를 가짐을 알 수 있다.  $\log P$ 는 일반적으로 약물이 작용부위까지 도달하는 과정과 밀접히 관련되어 있으므로 cytokinin이 그 수용체 (receptor)에 도달하는 과정이 각 cytokinin이 인삼의 기내 화아형성 유도활성에 영향을 미치는 중요한 요인이라 생각되었다.

또한 cytokinin류의 구조와 활성관계에 있어서는 화합물의 특성 (지용성과 입체구조)이 세포막에 존재할 것으로 생각되는 cytokinin 수용체의 구조와 깊은 관련이 있을 것이다. 수용체에 cytokinin이 결합하는 부위에는 아마도 지용성의 아미노산이 분포할 것으로 예상되며 그 입체구조는 BA의 벤젠고리 정도일 것으로 추측된다. BA가 이 수용체에 결합하면 수용체의 구조변화를 유도하여 수용체가 활성화되고 이어 적절한 신호가 전달되어 화아형성을 유도하는 반면 2-iP는 지용성이 높지만 측쇄의 입체구조적인 특징이 BA보다 약하게 수용체에 결합할 것으로 예상되어 활성이 낮은 것으로 추측된다. Kinetin과 zeatin의 활성도 이러한 관점에서 설명될 수 있다. Cytokinin은 물질대사, shoot 형성, 잎과 측지의 팽창과 노화 등 식물체의 성장과 발달 과정을 조절한다. 그러나 cytokinin의 생합성과 작용기작에 관해서는 아직까지도 정확하게 알려져 있지 않다. 최근 애기장대에서 cytokinin signal transduction에 관련된 유전자인 *cki1*이 cytokinin receptor 일 가능성이 높은 것으로 보고되고 있어 (Kakimoto 1996), cytokinin의 정확한 작용기작이 밝혀질 것으로 기대된다. 또한, 벤젠고리를 가진 benzoic acid 만을 처리하였을 경우 화아형성을 관찰할 수 없어 cytokinin의 측쇄구조가 인삼의 기내 화아형성에 있어 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었다 (결과 미제시). 이러한 관점에서 보다 다양한 cytokinin 화

합물을 사용하여 구조와 활성관계를 자세히 조사할 필요가 있다고 생각된다.

이러한 cytokinin의 효과는 담배캘러스 생장에 미치는 효과와 유사하다 (Matsubara 1980). Kinetin의 측쇄구조를 여러 소수성기로 치환한 유도체 중 BA가 담배캘러스 형성에 가장 효과적이었으며, 측쇄구조의 편평도 (planarity)가 가장 중요하다고 보고하였다 (Matsubara 1980). 그러나 본 실험에 사용한 cytokinin류는 모두 측쇄구조가 평면구조를 가지고 있어서 적어도 인삼의 기내 화아형성에는 측쇄구조의 편평도만으로 해석할 수 없음이 시사된다. 천연 성장조절제인 2-iP 나 zeatin을 보다 고농도 (40  $\mu M$ )로 처리하였을 경우 5  $\mu M$ 를 처리하였을 때보다 화아형성 빈도가 더 이상 향상되지 않았다 (결과 미제시). 이러한 결과는 2-iP와 BA에 대한 수용체의 친화력 차이가 적어도 10배 이상임을 시사하는 것이다.

재료에 관계없이 화아가 형성되는 위치는 axillary bud에서 신장된 측지였다. 또한 BA 처리구에서는 꽃, 꽃받침, 약이 발달된 꽃을 관찰할 수 있었지만 kinetin 처리구에서 유도된 꽃은 발달단계가 BA 처리구의 것에 비해 각 기관이 충분히 발달하기 이전의 어린 단계인 꽃눈이 관찰되었다 (결과 미제시). 형성된 꽃은 처리구와 개체에 따라서 형성된 꽃의 수와 발달 정도의 차이를 보였으며 보통 포장에서 성장한 2~3년생의 식물체에서 맺는 수에 해당하는 1~20개 정도이고 2 mm 이하의 작은 크기의 꽃들이 관찰되었으며 이러한 현상은 이전에 보고된 인삼의 기내 화아형성 결과와 마찬가지로였다 (Lee et al. 1994).

이로써 인삼의 기내 화아형성에 필수적인 성장조절제로 작용하는 cytokinin 중에서 화합물의 소수성이 큰 BA가 화아형성에 가장 효과적이었으며, kinetin, 2-iP, zeatin순으로 나타났다. 이러한 결과는 인삼의 기내 화아형성에는 cytokinin류의 적절한 지용성이 중요하게 관여하고 있음을 시사한다.

## 적 요

인삼의 기내 화아형성과 cytokinin과의 관계를 조사하기 위하여 접합자배, 유식물체, 자엽마디 절편체를 cytokinin (BA, kinetin, 2-iP, zeatin) 5  $\mu M$  단독 혹은 GA<sub>3</sub> 5  $\mu M$ 와 함께 MS 배지에서 배양하였다. 화아형성은 재료에 관계없이 BA 처리구에서 가장 높게 나타났으며, kinetin, 2-iP, zeatin순으로 나타났다. Cytokinin과 GA<sub>3</sub>를 함께 첨가한 경우에는 특히 자엽마디 절편체 재료에서 화아형성 빈도가 현저히 증가하여 BA와 함께 처리하였을 때는 100% 화아형성을 나타내었다. 사용한 cytokinin은 adenine 기본골격과 다양한 측쇄구조 (-R)로 이루어져 있는데 이 측쇄구조의 분배계수 ( $\log P$ )가 인삼의 기내 화아형성과 높은 상관성을 나타내어 cytokinin류의 지용성이 화아형성에 중요하게 관여함이 시사되었다.

사사 - 화합물의 logP측정을 하여준 한국화학연구소 김수경  
씨와 원고에 세심한 논평을 해준 김재훈박사에게 감사  
한다.

## 인용문헌

- Arya S, Liu JR, Eriksson T (1991) Plant regeneration from protoplasts of *Panax ginseng* (C.A. meyer) through somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* **10**:277-281
- Boerjan W, den Boer B, van Montagu M (1992) Molecular genetic approaches to plant development. *Int J Dev Biol* **36**:59-66
- Chang WC, Hsing YH (1980) *In vitro* flowering of embryoids derived from mature root callus of ginseng (*Panax ginseng*). *Nature* **284**:341-342
- Estruch JJ, Granell A, Hansen G, Prinsen E, Redig P, Van Onckelen H, Schwarz-Sommer Z, Spena A (1993) Floral development and expression of floral homeotic genes are influenced by cytokinins. *Plant J* **4**:379-384
- Hansch C, Fujita T (1964)  $\rho$ - $\sigma$ - $\pi$  Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. *J Amer Chem Soc* **86**:1616-1626
- Kakimoto T (1996) Cki1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* **274**:982-985
- Kim DH (1989) Correlation of quantitatively chemical structure-biological activity. In: Medicinal Chemistry Focussed on Development of New Drugs. Tongmyun Press, pp 341-363
- Kim YS, Lee HS, Lee SH, Yoo OJ, Jung WI, Liu JR (1995) The cDNA sequence of two MADS box genes in *Panax ginseng* (PGR95-060). *Plant Physiol* **109**:339
- Kim YS, Lee HS, Lee MH, Yoo OJ, Liu JR (1998) A MADS box gene homologous to AG is expressed in seedlings as well as in flowers of ginseng. *Plant Cell Physiol* **39**(8):836-845
- Lee HS, Liu JR, Yang SG, Lee YH, Lee K-W (1990) *In vitro* flowering of ginseng plants regenerated from zygotic embryos-derived somatic embryos of ginseng (*Panax ginseng* C.A. meyer) by growth regulators. *HortSci* **25**:1652-1654
- Lee HS, Lee K-W, Yang SG, Liu JR (1991) *In vitro* flowering ginseng (*Panax ginseng* C.A. meyer) zygotic embryos induced by growth regulators. *Plant Cell Physiol* **32**:1111-1113
- Lee HS, Lee K-W, Liu JR (1994) Measurement of determination time of *in vitro* flowering in ginseng (*Panax ginseng*). *Kor J Plant Tiss Cult* **21**:347-351
- Lee HS, Kim SW, Lee K-W, Eriksson T, Liu JR (1995) *Agrobacterium*-mediated transformation of ginseng (*Panax ginseng*) and mitotic stability of the inserted  $\beta$ -glucuronidase gene in regenerants from isolated protoplasts. *Plant Cell Rep* **14**:545-549
- Lim HT, Lee HS, Eriksson T (1997) Regeneration of *Panax ginseng* C.A. Meyer by organogenesis and nuclear DNA analysis of regenerants. *Plant Cell Tiss Org Cult* **49**:179-187
- Liu KB, Li SX (1989) *In vitro* flower formation in leaf explants of tomato: Effect of NaCl. *Planta* **180**:131-133
- Matsubara S (1980) Structure-activity relationships of cytokinins. *Phytochemistry* **19**:2239-2253
- Mohnen D, Eberhard S, Marfa V, Doubrava N, Toubart P, Gollin DJ, Gruber T, Nuri W (1990) Control of root, vegetative shoot and flower morphogenesis in tobacco thin-cell-layer explants. *Development* **108**:191-201
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* **15**:473-497
- Nadgauda RS, Parasharami VA, Mascarenjas AF (1990) Precocious flowering and seedling behaviour in tissue-cultured bamboos. *Nature* **344**:335-336
- Scorza R (1982) *In vitro* flowering. *Hort Rev* **4**:106-127
- Venglat SP, Sawhney VK (1996) Benzylaminopurine induces phenocopies of floral meristem and organ identity mutants in wild-type *Arabidopsis* plants. *Planta* **198**:480-487
- White PR (1943) Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient for cultivation of excised tomato roots. *Growth* **7**:53-65

(접수일자 1999년 2월 8일)